



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

## "COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE LA MICRO- ALGA Tetraselmis suecica KYLIN (1935) BUTCHER EN UN CULTIVO ESTÁTICO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO"

CURSO DE TITULACION  
" BIOLOGIA MARINA "



M E M O R I A  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
OCEANOLOGO

PRESENTA

SOFIA OFELIA ECHAURI RODRIGUEZ

ENSENADA, B.C. FEBRERO DE 1988

## RESUMEN

Se llevó a cabo un experimento en el cual se cultivó durante nueve días la microalga Tetraselmis suecica en un medio de cultivo a nivel Erlenmeyer preparado con los dos medios más utilizados para estos fines, el de Guillard "f/2" para los macronutrientes, EDTA y tris y el de Mattheissen y Toner para los micronutrientes y vitaminas.

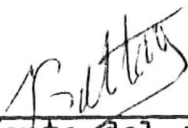
Se varió la concentración de fosfatos de 5 miligramos por litro a 4.5, 4, 3.5 y 3 miligramos por litro con la finalidad de observar si había diferencias significativas en el crecimiento de la microalga.

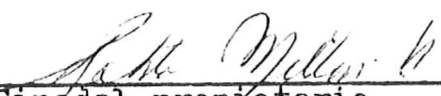
Al noveno día del experimento, en el medio control se obtuvo una densidad poblacional de  $2.253 \times 10^6$  células por mililitro y en los medios que se utilizó 4.5, 4, 3.5 y 3.0 miligramos por litro, se obtuvo respectivamente una densidad poblacional de  $2.2416 \times 10^6$ ,  $2.0773 \times 10^6$ ,  $1.93 \times 10^6$  y  $1.7508 \times 10^6$ ; encontrándose que no difieren significativamente al nivel del 5 por ciento, presentándose un comportamiento similar en las tasas de crecimiento, esto no indica que la concentración menor (3.0 miligramos por litro) utilizada en un medio de cultivo, sea el mínimo próximo más conveniente para el adecuado crecimiento de la microalga Tetraselmis suecica ya que se tiene que considerar el "pool" interno de la microalga, los compuestos polifosfatos presentes en el agua de mar utilizada en la preparación de el medio y la acción de la fosfatosa alcalina.

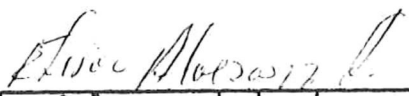
"COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE LA MICRO  
ALGA Tetraselmis suecica KYLIN (1935) BUT-  
CHER EN UN CULTIVO ESTATICO CON DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE FOSFATO"

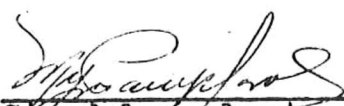
M E M O R I A  
QUE PRESENTA:  
SOFIA OFELIA ECHAURI RODRIGUEZ


Aprobada por:

  
\_\_\_\_\_  
Presidente del jurado  
OC. Enrique Baltazar Valenzuela

  
\_\_\_\_\_  
Sinodal propietario  
M.C. Roberto Millan Nuñez

  
\_\_\_\_\_  
Sinodal propietario  
OC. Eliseo Almanza Heredia

  
\_\_\_\_\_  
Sinodal suplente  
OC. Myra Pamplona Salazar

  
\_\_\_\_\_  
Sinodal suplente  
OC. Eduardo Santamaría del A.

## AGRADECIMIENTO

Por la superación personal lograda, debido a las facilidades, paciencia, confianza y estímulos brindados hasta llegar a culminar con la empresa que juzgaba difícil de realizar: a la Dirección General en Ciencia y Tecnología del Mar, a los profesores participantes en el Curso de Titulación "Biología Marina", a los Oceanólogos Enrique Baltazar. Valenzuela, Carlos Granados Machuca, Eliseo Almanza Heredia, Eduardo Santamaría del Angel, Myra Pamplona Salazar y al M.C. Roberto Millan Nuñez.

## INDICE GENERAL

	Pag.
1.- INTRODUCCION .....	1
1.1.- ANTECEDENTES .....	3
1.2.- OBJETIVO .....	5
2.- MATERIALES Y METODOS .....	6
2.1.- AGUA DE MAR FILTRADA .....	6
2.2 MEDIOS DE CULTIVO .....	7
2.2.1.- MEDIO DE GUILLARD "f/2" (1973) .....	7
2.2.2.- MEDIO MATTHIESSEN Y TONER (1966) .....	8
2.2.3.- PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO CONTROL .....	9
2.2.4.- PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO CON DIFE- RENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO .....	10
2.3.- INOCULACION .....	11
2.4.- CONDICIONES DE CULTIVO .....	12
2.5.- REGISTRO DE CRECIMIENTO DE MICROALGAS .....	12
2.6.- CALCULOS DE DENSIDAD .....	14
2.7.- PARAMETROS POBLACIONALES .....	15
3.- ANALISIS ESTADISTICO .....	16
4.- RESULTADOS .....	17
5.- DISCUSION .....	29
6.- CONCLUSIONES .....	32
7.- RECOMENDACIONES .....	33
8.- LITERATURA CITADA .....	34

## INDICE DE TABLAS

TABLA	Pag
I.- Valores promedio de las lecturas obtenidas con el hematocitómetro para cada tratamiento en cultivo estático con diferentes concentraciones de fosfato .....	17
II.- Parámetros poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer del cultivo control .....	18
III.- Parámetros poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo de 4.5 mg/l de fosfato, durante 9 días. ....	19
IV.- Parámetros poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo de 4 mg/l de fosfato, durante 9 días .....	20
V.- Parámetros poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo de 3.5 mg/l de fosfato, durante 9 días .....	20
VI.- Parámetros poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo de 3.0 mg/l de fosfato, durante nueve días .....	21

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Hematocitómetro o cámara para contar el número de células .....	14
Figura 2.- Crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en medio de cultivo con 4.5 mg/l de fosfato .....	22
Figura 3.- Crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en medio de cultivo con 4.0 mg/l de fosfato .....	23
Figura 4.- Crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en medio de cultivo con 3.5 mg/l de fosfato .....	24
Figura 5.- Crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en medio de cultivo con 3.0 mg/l de fosfato .....	25
Figura 6.- Crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en medio de cultivo con 5 mg/l de fosfato .....	26
Figura 7.- Curvas de crecimiento de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer .....	27

## I.- INTRODUCCION

El fitoplancton tiene un papel fundamental en el primer eslabón de la trama alimentaria en el medio marino. Su cultivo en condiciones controladas ha abierto numerosas posibilidades para el conocimiento del mar y el dominio de la naturaleza por el hombre. El uso de las algas planctónicas como alimento de larvas y organismos adultos de importancia comercial o de laboratorio, ha creado la necesidad de su cultivo masivo (De La Cruz y Alfonso, 1975).

Para cultivar microalgas, se han aprovechado las técnicas de esterilización, aislamiento, manipulación y siembra desarrolladas en bacteriología, empleando condiciones físico-químicas especiales (De La Cruz y Alfonso op.cit.).

Los fines que se persiguen en el cultivo de algas planctónicas pueden ser variados. Algunos investigadores los usan para estudiar la morfología, sistemática, genética, composición química de las especies, así como los distintos procesos fisiológicos de las mismas. Otros estudian las relaciones de las algas con los factores abióticos del medio con el fin de comprender el desarrollo de las poblaciones naturales o para determinar el efecto tóxico de compuestos contaminantes (De La Cruz y Alfonso op.cit.).

El enfoque que se dió a este trabajo es la utilización de las microalgas como alimento en el cultivo de organismos marinos. En las áreas de acuicultura el problema más urgente a resolver es la fuente constante de alimento vivo, esencial para la mayoría de los estadios larvales de moluscos, crustáceos y peces cultivables (Droop, 1975). Este alimento se obtiene de cultivos de microalgas y zooplancton en general.

Los cultivos de microalgas, tienen requerimientos físicos y nutritivos. Si ambos requerimientos se satisfacen, el cultivo producirá un máximo de biomasa (Ryther et al., 1972).

Dentro de los requerimientos nutritivos, se encuentran los micronutrientes (metales traza y vitaminas) y macronutrientes (fuentes de nitrógeno, fosfatos, sulfatos, silicatos para diatomeas, quelantes para mantener en suspensión a los metales traza y soluciones buffer para evitar cambios bruscos de pH).

Nuestras investigaciones estan enfocadas en el comportamiento del crecimiento de la microalga marina Tetraselmis suecica Kylin (1935), variando la concentración del macronutriente fosfato. El fosfato juega un papel sig

nificante en movimiento de procesos celulares, especialmente involucrados en la transformación de energía metabólica. Este es indispensable para el crecimiento y reproducción de organismos vivos (Kuhl, 1974).

#### I.1.- ANTECEDENTES

Los requerimientos de fósforo para el crecimiento óptimo de las algas se diferencía considerablemente de especie a especie (Kuhl op cit). Chu (1943) estudió la concentración óptima de fosfato para el crecimiento de diatomeas y algas verdes dentro de condiciones definidas. Encontrando que concentraciones abajo de  $50 \mu\text{gr}/\text{l}$  de fósforo es limitante, casi  $20 \text{mg}/\text{l}$  son inhibitorias y  $100$  a  $2000 \mu\text{gr}/\text{l}$  son óptimas.

Los niveles de fósforo dentro de las células tienen facultad de fluctuar, originando que las algas puedan crecer en condiciones más bajos del límite inferior del fósforo (Mackereth, 1953).

Scott (1945) establece que en algunas células la absorción de fosfatos es independiente de la alta concentración de luz o de la oscuridad.

Pirson et al. (1952) establece que en deficiencias de fosfato en algunos cultivos, la producción de peso seco, división celular, producción de oxígeno fotosintéti-

co y la síntesis de clorofila están inhibidas dentro de condiciones de debilidad de fósforo, pero añadiendo fosfato se recupera la producción de oxígeno (fotosíntesis), y se extiende a una razón normal de crecimiento celular. Solamente en los casos de larga duración podría la razón fotosintética no ser normal.

En todas las reacciones en que se requiere energía para el metabolismo, tales como fijación de  $\text{CO}_2$  fotosintético, transporte de iones, activación de aminoácidos para síntesis de proteínas, formación de ácidos nucleicos y síntesis de polifosfatos, puede ser sostenida por la "rica-energía" unión fosfato de ATP generado por esta especial reacción luminosa (Kuhl op. cit.).

Kuenzler y Perras (1965) cimientan la acción de la fosfatasa alcalina en disminución de fosfato en algas marinas, especialmente en *Crysophyceae* y *Bacillariophyceae*.

La síntesis de enzimas empiezan por inducción de la fosfatasa alcalina cuando aparecen deficiencias de fósforo y se detiene cuando es adicionado fosfato al medio. Estas enzimas manifiestan estar firmemente ligadas cerca de la superficie celular de las algas y tienen la facultad de proporcionar fósforo en deficiencias de éste obteniéndolo de compuestos fosforizados presentes en el agua de mar (Kuhl op. cit.).

La especie seleccionada Tetraselmis suecica ha si-

do usada frecuentemente como alimento en cultivo de crustáceos, de rotíferos, de larvas de Sciaenops ocellata (Griffith et al, 1973), de moluscos de bivalvos (Davis y Guillard, 1958) y juveniles de abulón (Imai, 1967).

Esta especie ha sido utilizada en maricultura por su valor nutritivo, por su capacidad de crecer en cultivos masivos, tener un ciclo de aproximadamente 18 horas, con una temperatura óptima de 18°C y un diámetro alrededor de 18.4  $\mu$  (Coll, 1983).

Tetraselmis suecica pertenece a la clase Prasinophyceae de la división Chlorophyta, de color verde brillante, unicelular, formada por una capa exterior con escamas y una capa más interna delgada conteniendo aminoácidos y poca celulosa, el producto de reserva (almidón) se encuentra en los cloroplastos que tienen forma de copa (Morris, 1980).

Los flagelos emergen de un poro apical o ranura (canal) de la teca (Abbott, 1976). Los flagelos son relativamente cortos, siendo sustancialmente menores que la longitud del cuerpo de la célula oval (Manton y Parke, 1965).

## I.2.- OBJETIVO

Determinar en base a cinco concentraciones diferentes de fosfato, cual de ellos es el mínimo próximo más

conveniente para el adecuado crecimiento de Tetraselmis suecica Kylin (1935) Butcher, utilizando los medios de cultivo de Guillard (1973) para macronutrientes, EDTA y tris y el de Matthiessen y Toner (1966) para micronutrientes y vitaminas.

## 2.- MATERIALES Y METODOS

Para lograr el objetivo antes mencionado se efectuó un cultivo con la microalga a experimentar llevando la siguiente secuencia:

### 2.1.- AGUA DE MAR FILTRADA

Se utilizó agua de mar filtrada del laboratorio del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la U.A.B.C. de Ensenada B.C. México. Esta agua es tratada para eliminar organismos (fitoplancton y zooplancton), detritus y basura, pasándola a través de filtros de carbón activado para finalmente esterilizarla con rayos ultravioleta (U.V) con una dosis nominal de  $30\ 000\ \mu\text{Watt seg/cm}^2$ . La desinfección del medio de cultivo con U.V. es de alta eficiencia en términos de costo y rapidez con respecto a otros métodos de esterilización.

La unidad de rayos ultravioleta tiene un voltaje de

110-120 y un consumo de 96 watts, con dos lámparas del tipo G25T8 y tubos de teflón transparente por donde corre el agua.

## 2.2.- MEDIOS DE CULTIVO

### 2.2.1.- MEDIO DE GUILLARD "f/2" (1973).

Es uno de los medios de agua de mar enriquecida más utilizados tanto para cultivar especies planctónicas como bentónicas. Se prepararon los macronutrientes con este medio debido a que el contenido de nitrógeno y fósforo se encuentra en cantidades reducidas en comparación al otro medio.

La forma de preparar las soluciones de los nutrientes mayores, EDTA y tris se describe a continuación:

$\text{NaNO}_3$                       75 mg/l

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$               5 mg/l

Tris (buffer)              200 mg/l

Secuestrante Fe EDTA 10 gr/l.

Tris (amortiguador).

Se disolvieron 50 gramos de "tris" (Hidroximetil amino-metano) en agua destilada y se aforó a 200 ml., ajustando el pH de la solución entre 7.1 a 7.3 con ácido clorhídrico concentrado.

#### 2.2.2.- MEDIO MATTHIESSEN Y TONER (1966).

La preparación de la solución stock de los metales traza es algo diferente a los macronutrientes, son compuestos en solución stock primaria, y porciones de la solución stock primaria son mezcladas al mismo tiempo para hacer la solución stock secundaria.

Las soluciones stock primaria son mezcladas con agua destilada, de la manera siguiente:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96 gr/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 gr/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0 gr/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.0 gr/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.26 gr/l

Las soluciones stock de metales traza se prepararon mezclando al mismo tiempo 1 ml. de cada solución stock primaria en agua destilada con el secuestrante férrico

(10 gr/l) aforando hasta un litro.

Las soluciones stock de vitaminas se elaboran mezclando al mismo tiempo las 3 vitaminas:

Biotina	10 mg/100 ml.
B 12	10 mg/100 ml.
Tiamina	2 mg/100 ml.

De esta solución stock primaria o concentrada se realizaron diluciones agregándole 1 ml. de esta a 100 ml. de agua destilada.

#### 2.2.3.- PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO (CONTROL).

Con la ayuda de cada solución stock se procedió a preparar este medio de la siguiente manera:

En un matraz aforado de un litro, se agregaron 500 ml. de agua de mar filtrada y pasada por luz ultravioleta (U.V.) y se agregó 1 ml. de las siguientes soluciones stock:

Solución stock de  $\text{NaNO}_3$

Solución stock de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Solución stock tris

Solución stock de metales traza con secuestrante fé

rrico.

Se aforó a un litro con agua de mar filtrada y pasada por U.V.

En dos matraces Erlenmeyer de 250 ml. se agregaron 75 ml. del medio preparado a cada uno, logrando tener un medio de cultivo con 5 mg/l de fosfato y su réplica.

#### 2.2.4.- PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO.

Se prepararon estos medios utilizando el mismo procedimiento seguido en el control, solo que en vez de agregar 1 ml. de la solución stock de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , se añadieron los siguientes ml. para obtener las concentraciones correspondientes:

0.9 ml. para obtener 4.5 mg./l

0.8 ml. para obtener 4.0 mg./l

0.7 ml. para obtener 3.5 mg./l

0.6 ml. para obtener 3.0 mg./l

Estos medios con diferentes concentraciones de fosfato se transfirieron 75 ml. (para facilitar la agitación manual y asegurar el intercambio de gases) a cada uno de los dos matraces Erlenmeyer de 250 ml. utiliza-

dos en cada concentración, logrando tener cuatro medios con una concentración diferente de fosfato a la del medio Guillard "f/2" y su réplica correspondiente.

Al final de la preparación de los medios de cultivo se tuvieron 10 matraces con 5 concentraciones diferentes de fosfato.

Se hace notar que la réplica se utilizó solamente con la finalidad de asegurar el experimento.

Los matraces con sus respectivos medios son pasados en autoclave a 115°C y 20 libras de presión durante 10 minutos, se dejaron reposar durante 12 horas, para obtener la temperatura ambiente y poder inocular.

Se midió el pH, el cual se encontraba dentro del rango requerido por el fitoplancton (7.5-8.2)

### 2.3.- INOCULACION

Antes de añadir las vitaminas al medio e inocular se desinfectó el lugar (cuarto de inoculación del Instituto de Investigaciones), limpiando las mesas con alcohol y dejando la flama de dos mecheros bunsen varios minutos.

Bajo la misma flama de los mecheros y sin corrientes de aire para prevenir la contaminación se agregó 1 ml. de cada vitamina a cada matraz Erlenmeyer con pipe-

tas lavadas y esterilizadas de 1 ml. Posteriormente bajo las mismas condiciones se inocula 1 ml. de cepa a punto de transferencia (estado de crecimiento exponencial) con una concentración de  $172.52 \times 10^4$  cel/ml de la especie Tetraselmis suecica (donada por el Instituto antes mencionado) a los 10 matraces Erlenmeyer con medio de cultivo.

#### 2.4.- CONDICIONES DE CULTIVO

Los matraces permanecieron en el cuarto de cultivo bajo condiciones físicas más importantes (iluminación, temperatura y aireación) que influyen en el crecimiento de las microalgas en un cultivo estático.

La iluminación proporcionada de 1500 pies-candela fue constante con tubos fluorescentes de luz blanca-fría por emitir longitudes de onda larga sin emisión ultravioleta.

La temperatura del cuarto frío se mantuvo entre  $18^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  por medio de un aparato de aire acondicionado.

Diariamente se agitó cada matraz en forma manual para lograr una difusión efectiva de los nutrientes, un aporte parcial de  $\text{CO}_2$  inorgánico y mantener las algas en suspensión.

#### 2.5.- REGISTRO DE CRECIMIENTO DE MICROALGAS

Después de inocular los recipientes de cultivo se llevó a cabo el registro del crecimiento, para identificar la etapa de mayor densidad de las microalgas ( fase exponencial), la cual indica el momento apropiado para cosecharlas; esta etapa también indica que el cultivo puede transferirse a un volumen mayor con medio de cultivo o diluirse si el recipiente tiene volumen disponible (Paniagua op. cit.).

Desde el día de inoculación, diariamente y a la misma hora se extrajo 1 ml de muestra de cada uno de los matraces de cultivo, utilizando pipetas esterilizadas y bajo las mismas condiciones de inoculación para evitar la contaminación de los cultivos.

El mililitro extraído se colocó en un vial, al cual se le añadió una gota de lugol para fijar las células, homogenizando nuevamente la muestra en el vial.

El conteo diario de las células se llevó a cabo por medio de un hematocitómetro Neubauer (Fig. 1).

Antes de utilizar el hematocitómetro se lavó con agua destilada, secándose perfectamente, una vez limpio se colocó un cubre objeto sobre él. Con la pipeta Pasteur se extrajo muestra del vial, tirándose para limpiar la pipeta, nuevamente se extrajo otra muestra y una gota de ella se colocó en cada extremo teniendo cuidado de no manchar los canales; se esperó dos minutos para que la

muestra se asentara, una vez asentada se empezó el conteo celular.

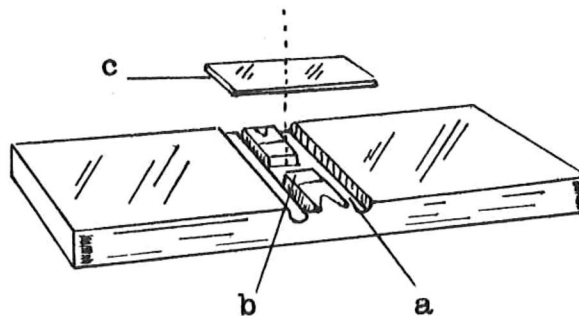


Fig. 1 Hematocitómetro o cámara para contar el número de células: a) canales, b) retícula graduada y c) cubreobjeto.

#### 2.6.- CALCULOS DE DENSIDAD (Paniagua *op. cit.*).

El número de células encontradas en la cuadrícula o en el área ( $\text{mm}^2$ ) del hematómetro se utilizó para determinar el número de células/ml aplicando la siguiente fórmula:

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

Donde:

D = Densidad del cultivo

F = Fijador (ml)

F.D = Factor de dilución (ml)

M = Mililitros de muestra utilizada

$$F.D = \frac{V_f}{V_i} \quad \text{Donde:}$$

Vf = Volumen final de la muestra (ml)

Vi = Volumen inicial de la muestra (ml)

C = Número de células promedio contadas

10 = factor de multiplicación debido a la profundidad del hematocitómetro.

1000 = Valor para convertir a mililitros.

El factor 10 lo trae cada hematocitómetro, correspondiendo a la profundidad de éste, el cual era 0.1 mm de profundidad.

## 2.7.- PARAMETROS POBLACIONALES (Paniagua op.cit.).

Se determinaron los principales parámetros poblacionales: Divisiones por día (K), tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ), tiempo medio de generación (TG) y la producción diaria de microalgas (PD) que señala el incremento de células logrado en el cultivo por unidad de tiempo. Los cálculos de estos parámetros se elaboraron utilizando los programas FORTRAN.

### 3.- ANALISIS ESTADISTICO

Con la densidad celular estimada en el noveno día de cultivo en el control como en los tratamientos se hizo un análisis de varianza no paramétrico según la prueba de Kruskall-Wallis, con su prueba a posteriori de comparaciones múltiples (Zar, 1974).

Se utilizó este método al no poderse demostrar la normalidad de las poblaciones, ya que el comportamiento de la microalga en cultivo puede variar de un día a otro, además las poblaciones eran independientes una de la otra y las muestras fueron tomadas al azar.

## 4.- RESULTADOS

La tabla I muestra los valores promedio de las 6 lecturas tomadas con el hematocitómetro, para calcular la densidad celular para cada tratamiento.

TABLA I.- Valores promedio de las lecturas tomadas con el hematocitómetro para cada tratamiento en cultivo estático con diferentes concentraciones de fosfato.

Tiempo en días	Testigo	Concentración de fosfato			
		5 mg/ l	4.5 mg/1	4 mg/1	3.5 mg/1
0	2.27	2.27	2.27	2.27	2.27
1	2.83	4.44	2.55	1.45	3.9
2	8.33	11.41	10.08	10.24	9.08
3	25.91	41.55	35.98	35.25	38.55
4	60.50	75.41	76.00	63.83	73.65
5	96.31	109.48	116.15	92.33	108.73
6	108.7	128.2	127.6	99.81	131.48
7	163.7	154.06	159.5	142.4	152.9
8	183.00	195.15	181.65	174.83	163.73
9	225.33	224.16	207.73	193.0	175.08

La tabla II muestra los resultados de los cálculos de los parámetros poblacionales de T. suecica en cultivo a nivel Erlenmeyer durante 9 días de cultivo del control

TABLA II.- Parámetros poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer del cultivo control.

DIA	DEN X 1000 (Cel./ml.)	K Nº div/día	MU $\frac{\text{Cel/ml}}{\text{día}}$	PD Cel/día	TG Días
0	22.7				
1	28.3	0.3181	0.0958	0.5600	0.9463
2	83.30	1.5575	0.4689	5.5000	0.1933
3	259.10	1.6372	0.4928	17.5800	0.1839
4	605.00	1.2235	0.3683	34.5900	0.2460
5	963.10	0.6708	0.2019	35.8100	0.4488
6	1087.00	0.1746	0.0526	12.3900	1.7241
7	1637.00	0.5907	0.1778	55.0000	0.5096
8	1830.00	0.1608	0.0484	19.3000	1.8722
9	2253.30	0.3002	0.0904	42.3300	1.0028

En las tablas III a VI se muestran los resultados de los cálculos de los parámetros poblacionales de T.

suecica a nivel Erlenmeyer en los medios de cultivo con 4.5, 4.0, 3.5, 3.0 mg./l de fosfato respectivamente.

TABLA III.- Parámetros poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo de 4.5 mg./ l de fosfato, durante 9 días.

DIA	DEN X 1000 (Cel./ml.)	K Nº div/día	MU $\frac{\text{Cel/ml}}{\text{día}}$	PD Cel/día	TG Días
0	22.70				
1	44.40	0.9679	0.2914	2.1700	0.3110
2	114.10	1.3617	0.4099	6.9700	0.2211
3	415.50	1.8646	0.5613	30.1400	0.1614
4	754.10	0.8599	0.2589	33.8600	0.3501
5	1094.80	0.5379	0.1619	34.0700	0.5597
6	1282.00	0.2277	0.0686	18.7200	1.3219
7	1540.60	0.2651	0.0798	25.8600	1.1355
8	1951.50	0.3411	0.1027	41.0900	0.8825
9	2241.60	0.1999	0.0602	29.0100	1.5055

TABLA IV.- Parámetros poblacionales de T. suecica  
a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo de  
4.0 mg./l de fosfato, durante 9 días.

DIA	DEN X 1000 (Cel./ml.)	K Nº div/día	MU Cel/ml día	PD Cel/día	TG Días
0	22.70				
1	25.50	0.1678	0.0505	0.2800	1.7939
2	100.80	1.9830	0.5969	7.5300	0.1518
3	359.80	1.8357	0.5526	25.9000	0.1640
4	760.00	1.0788	0.3248	40.0200	0.2790
5	1161.50	0.6119	0.1842	40.1500	0.4919
6	1276.00	0.1356	0.0408	11.4500	2.2193
7	1595.00	0.3219	0.0969	31.9000	0.9351
8	1816.50	0.1876	0.0565	22.1500	1.6046
9	2077.30	0.1936	0.0583	26.0800	1.5553

TABLA V.- Parámetros poblacionales de T. suecica  
a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo  
de 3.5 mg./l de fosfato, durante 9 días.

DIA	DEN X 1000 (Cel./ml.)	K Nº div/día	MU Cel/ml día	PD Cel/día	TG días
0	22.70				
1	14.50	-0.6467	-0.1947	-0.8200	-0.4655
2	102.40	2.8202	0.8489	8.7900	0.1067
3	352.50	1.7834	0.5369	25.0100	0.1688
4	638.30	0.8566	0.2579	28.5800	0.3514
5	923.30	0.5326	0.1603	28.5000	0.5652
6	998.10	0.1124	0.0338	7.4800	2.6785
7	1424.00	0.5127	0.1543	42.5900	0.5871
8	1748.30	0.2960	0.0891	32.4300	1.0170
9	1930.00	0.1427	0.0429	18.1700	2.1103

TABLA VI.- Parámetros poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo de 3.0 mg/l de fosfato, durante 9 días.

DIA	DEN X 1000 (Cel./ml.)	K Nº div/día	MU Cel/ml día	PD Cel/día	TG Días
0	22.70				
1	39.00	0.7808	0.2350	1.6300	0.3855
2	90.80	1.2192	0.3670	5.1800	0.2469
3	385.50	2.0860	0.6279	29.4700	0.1443
4	736.50	0.9340	0.2811	35.1000	0.3223
5	1087.30	0.5620	0.1692	35.0800	0.5356
6	1314.80	0.2741	0.0825	22.7500	1.0983
7	1529.00	0.2177	0.0655	21.4200	1.3825
8	1637.30	0.0987	0.0297	10.8300	3.0490
9	1750.80	0.0967	0.0291	11.3500	3.1131

Las figuras 2 a 5 muestran el crecimiento de T. suecica para cada día de cultivo con el uso de fosfato del medio de cultivo en concentraciones de 4.5, 4, 3.5, y 3 miligramos por litro respectivamente.

La figura 6 (testigo) muestra el crecimiento poblacional de T. suecica en el medio de cultivo de Guillard y Matthiessen y Toner (op cit).

La figura 7 muestra las curvas de crecimiento de T. suecica a nivel Erlenmeyer tanto del medio de cultivo con trol como de cada uno de los tratamientos.

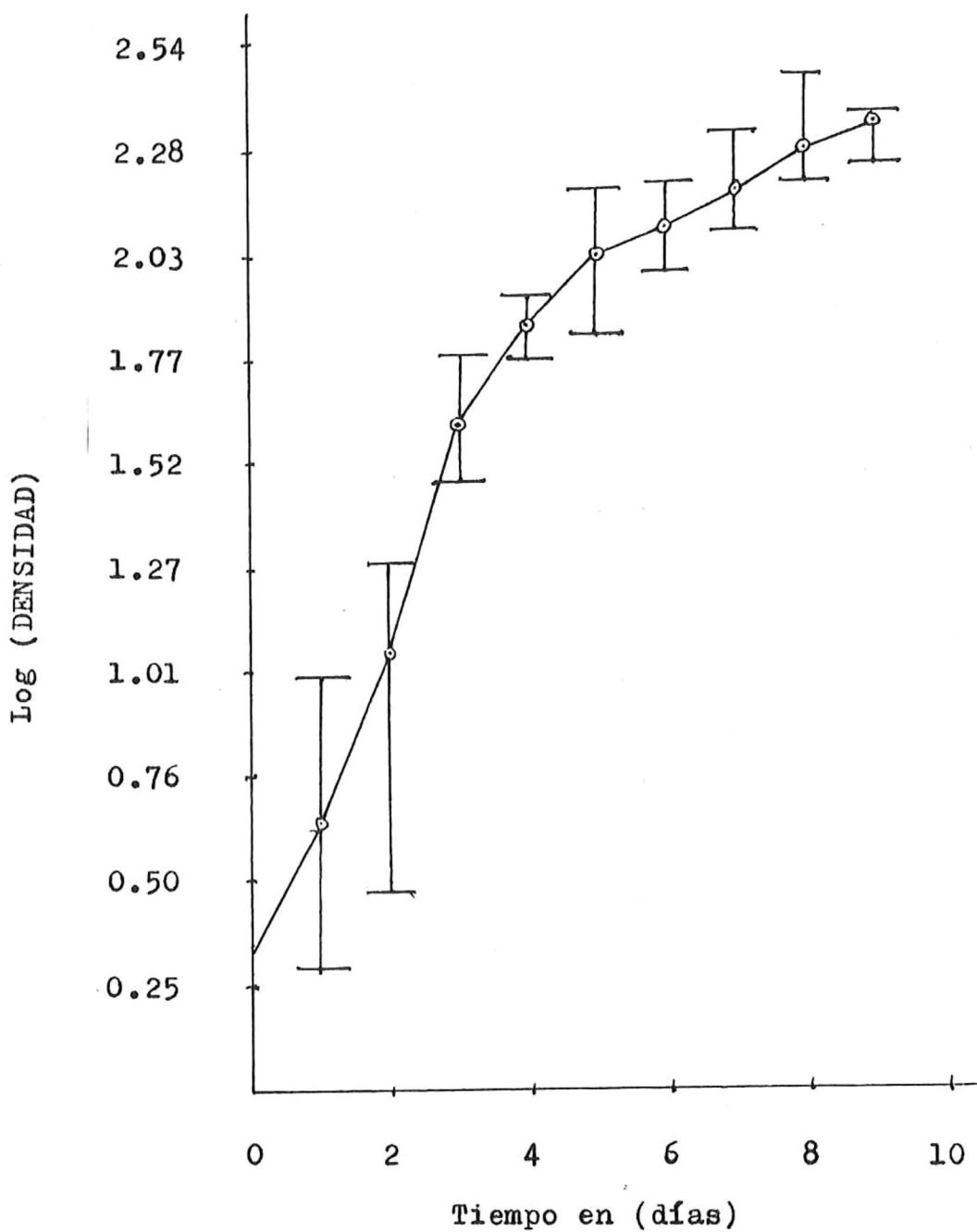


Figura 2.- Crecimiento poblacional de T. suecica en medio de cultivo con 4.5 mg/l de fosfato.

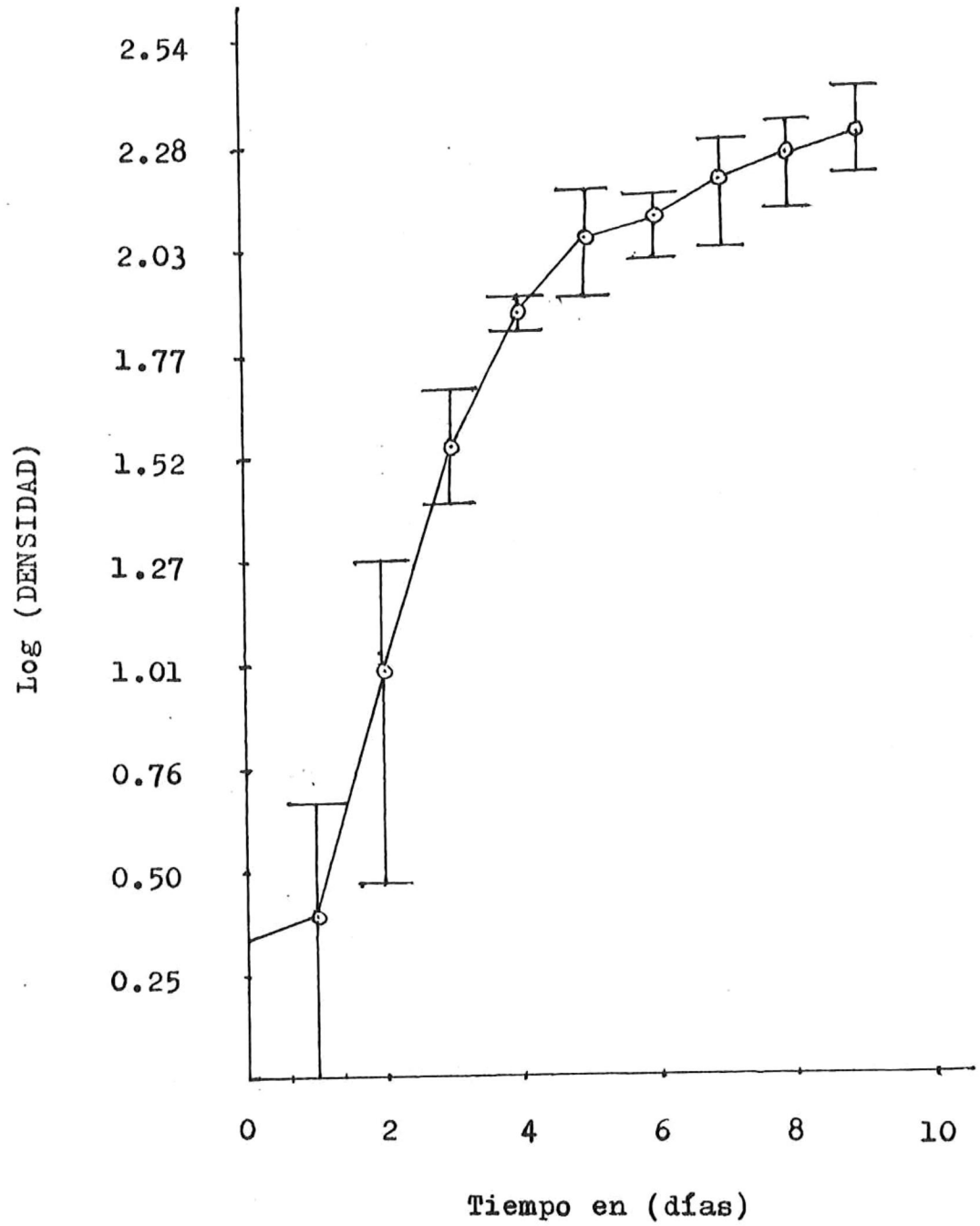


Figura 3.- Crecimiento poblacional de T. suecica en medio de cultivo con 4.0 mg/l de fosfato.

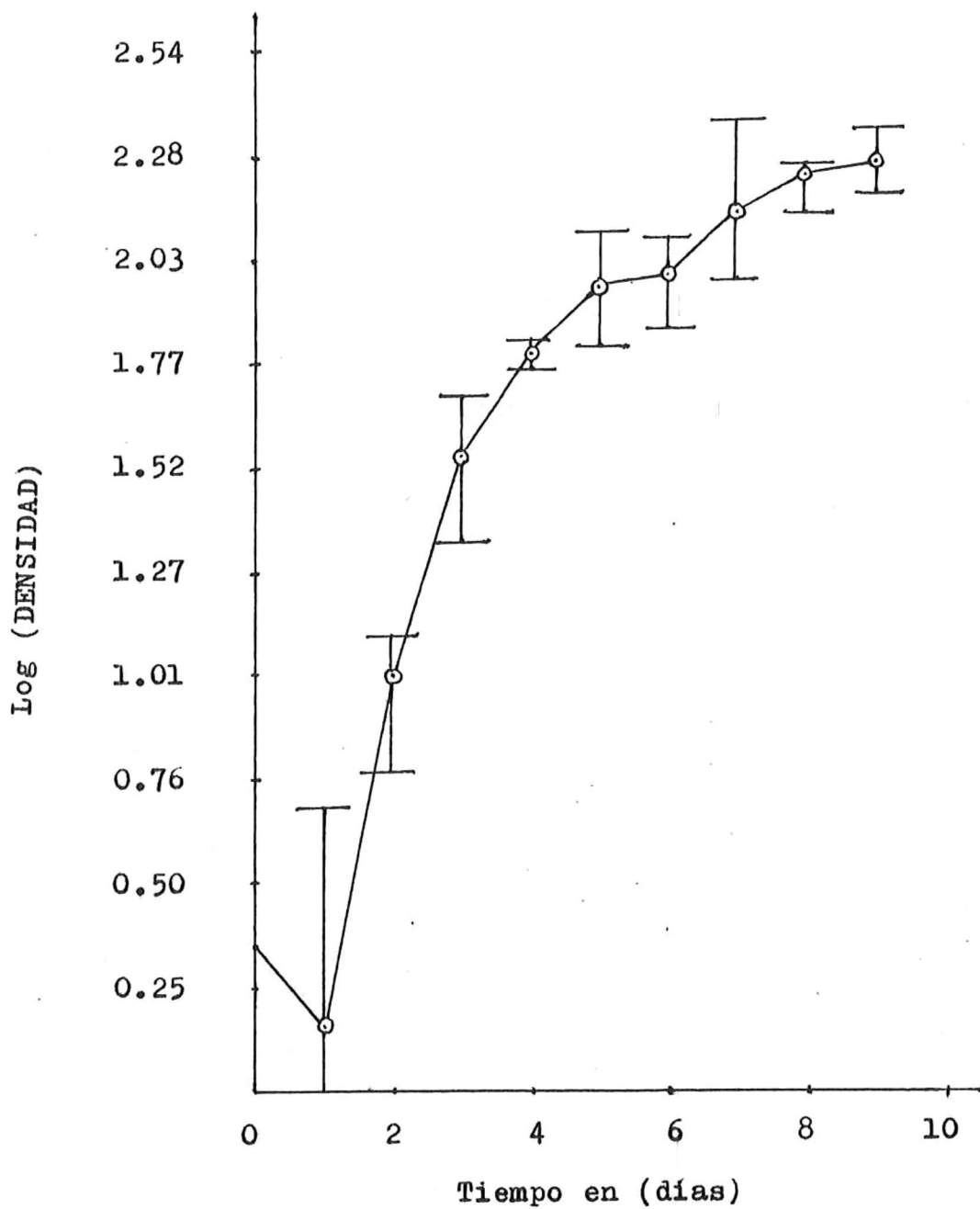


Figura 4.- Crecimiento poblacional de T. suecica en medio de cultivo con 3.5 mg/l de fosfato.

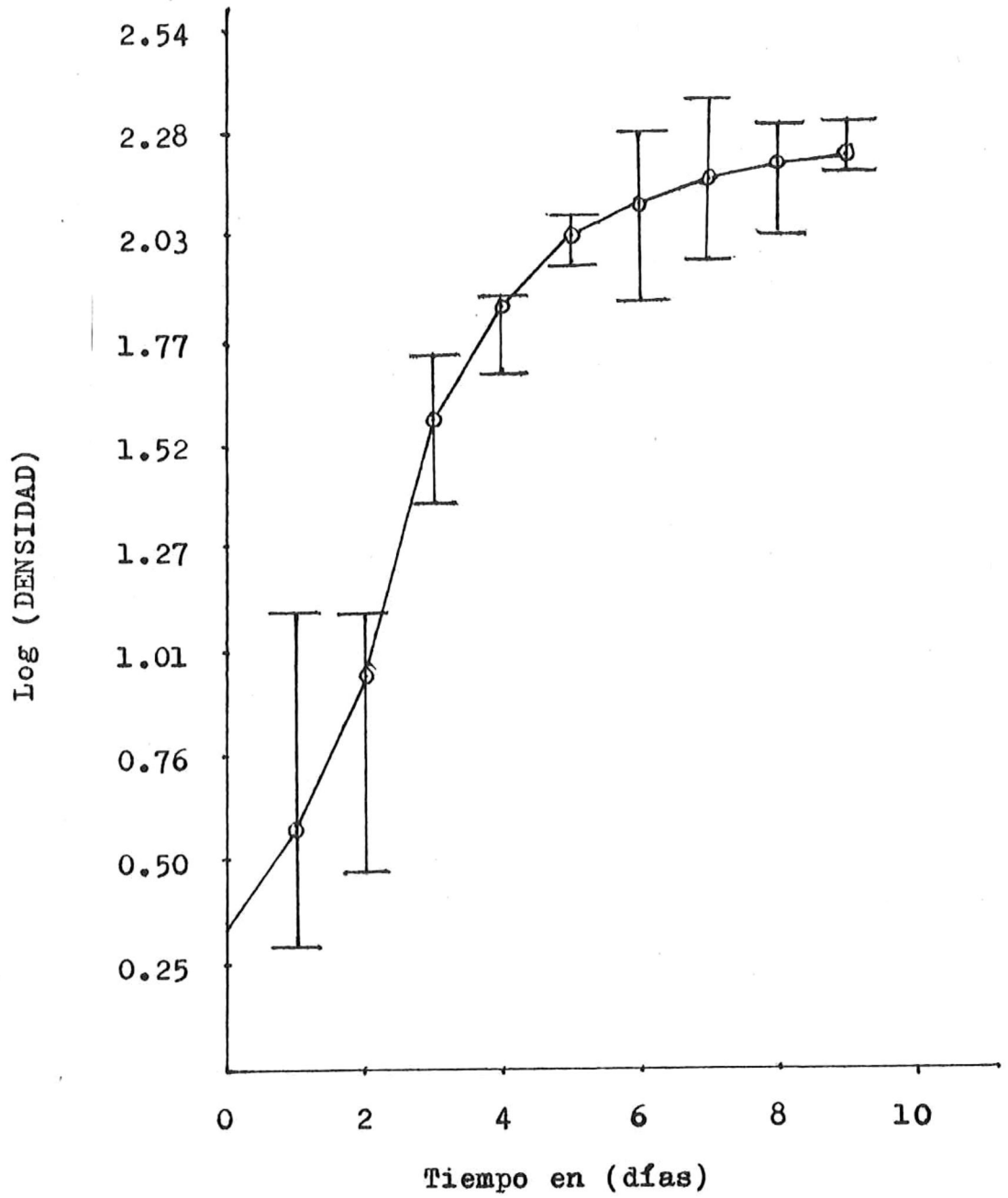


Figura 5.- Crecimiento poblacional de T. suecica en medio de cultivo con 3.0 mg/l de fosfato.

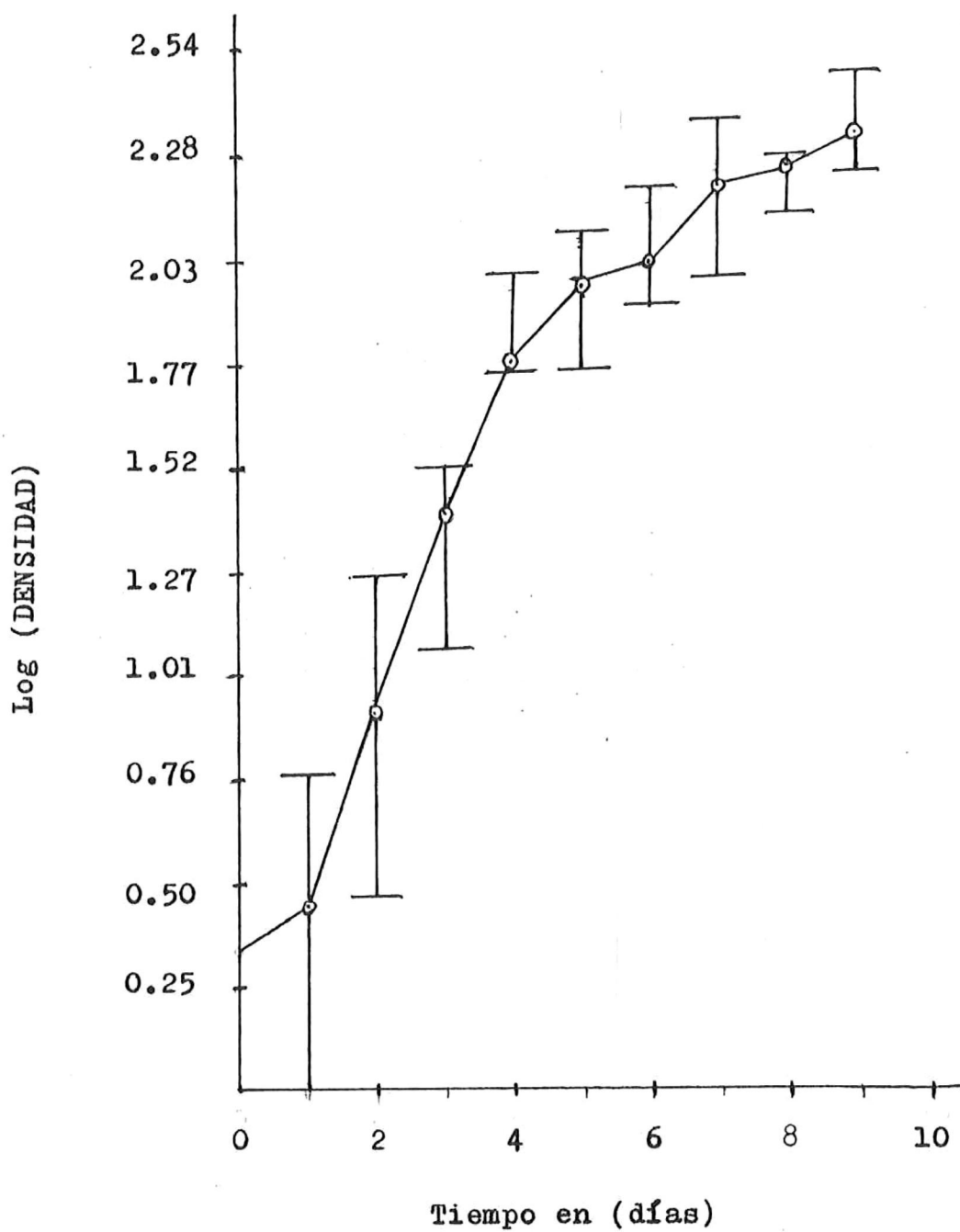


Figura 6.- Crecimiento poblacional de *T. suecica* en medio de cultivo con 5 mg/l de fósforo (testigo)

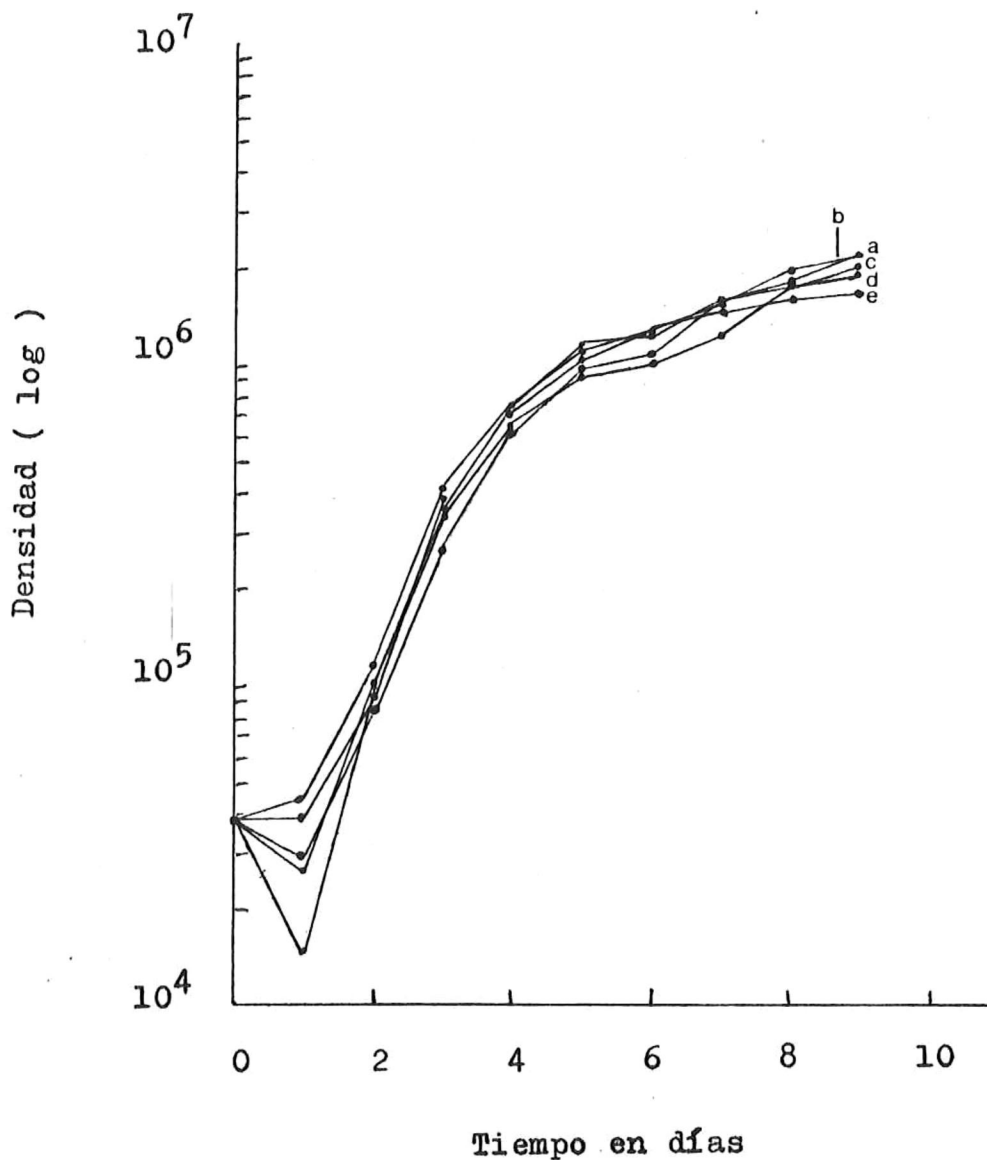


Figura 7.- Curvas de crecimiento de T. suecica a nivel Erlenmeyer. a) cultivo con 5 mg/l de fosfato. b) cultivo con 4.5 mg/l de fosfato. c) cultivo con 4 mg/l de fosfato. d) cultivo con 3.5 mg/l de fosfato. e) cultivo con 3 mg/l de fosfato.

### Resultados estadísticos.

El resultado del planteamiento de la hipótesis nula ( $H_0$ ) aplicando la prueba de análisis de varianza de Kruskal-Wallis, para ver si las distribuciones de las frecuencias son iguales entre el cultivo control y los demás tratamientos experimentales fue no rechazada al obtenerse una  $H$  calculada de 6.208 y una crítica de 7.418, además la probabilidad de observar valores tan grandes en el estadígrafo  $H$  de Kruskal-Wallis es de 0.051693 al nivel de significancia de 0.05, por lo tanto no existieron diferencias en el número de células encontradas al noveno día del experimento entre el medio de cultivo control y los tratamientos de 4.5 a 3.0 mg/l de fosfato con un 95% de confianza. Lo cual concuerda con las tendencias gráficas del crecimiento poblacional presentadas en la figura 7, donde se puede observar según las características principales de crecimiento presentadas por una microalga en cultivo con volumen limitado, la fase exponencial se encuentra entre el segundo y noveno día de cultivo en las 5 poblaciones de microalgas.

## 5.- DISCUSION

Los estudios sobre la nutrición del fitoplancton, con la finalidad de entender las condiciones ideales de su crecimiento, ha hecho que los diferentes puntos de vista de los investigadores presenten una gran variedad de proporciones nutricionales, que dificultan la comparación de los resultados (Ketchum, 1953). En base a los resultados logrados en el experimento, podemos decir que el requerimiento nutricional para el crecimiento de la microalga fue satisfactorio en todos los medios, aunque la concentración de 5 mg/l (concentración utilizada por el medio Guillard) se haya obtenido con mayor densidad celular. Sin embargo los resultados de las concentraciones utilizadas con menor cantidad de fosfato no fueron limitantes, a pesar que la más baja alcanzó una proporción de N:P de 25:1. En estudios anteriores de cultivo de microalgas se encontró que la proporción más frecuente de N:P es de 16:1 o 15:1 (Fuhs, 1972). Y una severa limitación fue la proporción 35:1 (Soeder, 1971). Y si se observa la curva de crecimiento poblacional durante los nueve días de cultivo en el comportamiento de Tetraselmis suecica en su fase exponencial, esta fue favorable, a pesar de esto no debe considerarse en cultivos la utilización de la menor concentración de fosfato (3.0 mg/l) que la usada por el medio Guillard "f/2" como fina-

lidad de un cultivo estático para inocular a recipientes con volúmenes mayores (Fernbach con 2.8 litros), hasta no realizar un experimento donde se utilice la microalga en su fase exponencial en un medio de cultivo con 3.0 mg/l de fosfato como cepa de inoculación.

Los resultados estadísticos nos indican que no existieron diferencias significativas al nivel del 5 % entre el cultivo control y los experimentos, sin embargo hay que considerar que no se tomó en cuenta el "pool" de fosfato interno de la microalga. Droop (1953) consideró la existencia de un "pool" interno de sales nutritivas, lo cual permite que los organismos sigan creciendo, aún cuando la concentración externa de la sal nutritiva llegue a un punto crítico. Según esta consideración (Droop op. cit.) la microalga en cultivo provenía de un medio rico de fosfato, por haberse utilizado una cepa en estado de crecimiento exponencial (sexto día) con la probabilidad que tuviera un "pool" muy grande, y como duró un período corto el experimento, no logró agotar su "pool" y por esto no necesitó tomar los fosfatos del medio. Otra consideración pudo ser por inducción de la fosfatasa alcalina que actúa cuando aparecen deficiencias de fósforo, logrando que las enzimas lo proporcionen después de obtenerlos del agua de mar utilizada en la preparación de los medios.

Si pudiera ser factible la utilización de una concentración menor de fosfato (3 mg/l) con respecto al medio Gui

llard, se lograría una disminución del 40 % en el gasto.

Como el precio del reactivo (fosfato monobásico hidratado) es en la actualidad de 76 360 pesos M.N. la libra, habría por cada litro de cultivo un ahorro de 33.67 centavos, por lo consiguiente, a diferentes volúmenes de cultivo el ahorro sería el siguiente:

Fernbach	(2.8 l)	94 centavos
Carboy	(18 l)	6.06 pesos
Bolsa	(60 l)	20.20 pesos
Tanques	(1000 l)	336.70 pesos
Tanques	(10 000 l)	3367.0 pesos

## 6.- CONCLUSION

Después de experimentar con 5 concentraciones diferentes de fosfato (5 mg/l a 3.0 mg/l), se encontró que no existieron diferencias significativas al nivel del 5%, pero esto no indica que la concentración menor utilizada (3.0 mg/l) sea el mínimo más conveniente para el adecuado crecimiento de la microalga Tetraselmis suecica ya que se tiene que considerar el "pool" interno de la microalga y la acción de la fosfatos alcalina y los compuestos polifosfatados que se encuentran en el agua de mar utilizada para preparar los medios de cultivo.

## 7.- RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el experimento, en que la microalga Tetraselmis suecica tuvo un crecimiento favorable con un medio de cultivo preparado con 3.0 mg/l de fosfato. Se recomienda al utilizar este medio, se cultive la microalga bajo las mismas condiciones físicas y nutritivas a la que fue sometida, y al inocular se tome en cuenta la edad de la cepa correspondiente a la del ensayo.

Considerando la existencia del "pool" interno de fosfatos en la microalga. Se sugiere realizar un experimento con un cultivo control, el cual contenga un medio con una concentración de fosfato de 3.0 mg/l, y el tratamiento con medio que no contenga fosfatos, dejando así a la microalga en inanición de fosfatos hasta que se agote el "pool" interno, y una vez agotado, enriquecer el medio con la misma concentración del control.

Para analizar la acción de la fosfatasa, se sugiere experimentar, teniendo a la par cultivos estáticos, uno de ellos cuyo medio de cultivo esté preparado con agua artificial sin fosfato y el otro medio con agua de mar no enriquecida con fosfatos.

## 8.- LITERATURA CITADA

- Abbott, I.A. y Hollenberg, G.J. 1976 Marine algae of California. Stanford, California. p 51.
- Aguirre-Muñoz, A. 1981. Estudio con un cultivo semicontinuo de Tetraselmis suecica Kylin (1935): nutrientes, vitaminas, desinfección del medio con UV y producción del sistema a largo plazo. Tesis. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada B.C. 62 pp.
- Boyd, C. C. 1980. Effects of three phosphorus fertilizers on phosphorus concentrations and phytoplankton production. Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, Auburn, Al (U.S.A.). In: Aquaculture. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. 22: p 175-180.
- Coll-Morales, J. 1983. Acuicultura Marina Animal. Ediciones Mundi-Prensa. p 328-358.
- Chu, S. P. 1943. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. J. Ecol. 31:2: p 109-148.
- Davis, H.C. y Guillard, R. 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as foods for oyster and clam larvae. Fish. Bull. U.S. Fish and Wildlife Serv. 58: 293-304.
- De la Cruz, S.A. y Alfonso, E. 1975. Cultivo masivo de al

gas planctónicas marinas mediante fertilización.  
 Ciencias. Centro de Información Científica y Técnica.  
 Universidad de la Habana. 8:17:25 pp.

- Droop, M.R. 1953. On the ecology of flagellates from some brackish and freshwater rockpools of fenland. *Acta Botanica Fennica*. 51: 1-52.
- Droop, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. In: Persoone, G. and Jaspers, E. (Eds), *Proc. 10th. Europ. Symp. Mar. Biol. Ostend, Bel. Sep. 17-23*, Universa Press, Wetteren. p 71-93.
- Eppley, R.W. and Rstrickland, J.D. 1968. Kinetics of Marine plankton growth, p 23-62. In: *Advances in microbiology of the sea* (Droop, M. R. y Ferguson, E.J., eds). Academic Press, New York. 540 pp.
- Fogg, G.E. 1975. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin Press. p 12-61.
- Fuhs, G.S., Demmerles, D., Canelli, E. and Miu C. 1972. Characterization of phosphorus-limited plankton Algae. *Am. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp.1*: 113-133.
- Griffith, G.W., Kenslow, M.A. and Ross, L.A. 1973. A mass culture method for *Tetraselmis* sp. a 4 th. Ann. Workshop Wld. Mar. Soc., Monterrey, México. J. Avault (Ed.) p 289-294.
- Guillard, R.R.L. 1973. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Biology Department. Woods

- Hole Oceanographic Institution. Massachusetts. 60 pp
- Imai, T. 1967. Mass production of molluscs by means of rearing the larvae in tanks. *Venus* . 25: 159-167.
- Ketchum, B. H. 1953. Mineral nutrition of phytoplankton. *A. Rev.Pl. Physiol.* 5: 55-74.
- Kuenzler, E.J. and Perras, J.P. 1965. Phosphatases of marine algae. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, 128, p 271-284.
- Kuhl, A. 1974. Phosphorus. *Pflanzenphysiologisches Institut der Universität, 34 Göttingen, Untere Karspüle 2, Germany* : In Stewart, W. D. P. *Botanical Monographs. Algal Physiology and Biochemistry. University of California Press* 10:23 p 636-649.
- Laing, I. and Helm, M.M. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of Tetraselmis suecica (Kyllin) butch. In 200-l Vessels. In: *Aquaculture. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.* 22: p 137-148.
- Mackereth, F.J. 1953. Phosphorus utilization by Asterionella formosa. *Hass.J. exp. Bot.* 4:p 296-313.
- Manton, I. F. and Parke, M. 1965. Observations on the fine structure of two species of Platymonas with special reference to flagellar scales and the mode or origin of the theca. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 45: 743-754.

- 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 Foundattion, Edgartown, Mass. 138 pp.
- Morris, I. 1980. The Physiological Ecology of Phytoplankton. Estudios in Ecology. University of California Press. 597 pp.
- Padilla, M.G. 1975. Crecimiento poblacional de Tetraselmis suecica (Chlorophyceae) en ambiente controlado. Rev. Biol. Mar., Valparaíso, 15(3):p 287-296.
- Paniagua-Michel, J., Buckle-Ramírez, F., Granados-Machuca C. y Loya-Salinas, D.H. 1986. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. CICESE Ensenada B.C., México. 94 pp.
- Pirson, A., Tichy, C. and Wilhelmi, G. 1952. Stoffwechsel and mineralsalzernöhrung einzelliger. Grünalgen. I. Vergleichende Untersuchueegen and Mangelkulturen Von Ankistrodesmus. Planta, 40: 199-253.
- Ryther, J.H., Dunstan, W.M., Tenore, K.R. and Huguenin, J.E., 1972. Controlled eutrophication. Increasing food produccion from the sea by recycling human waste. Biol Science, 22: 144-152.
- Scott, G.T. 1945. The mineral composition of phosphate deficient cell of Chlorella pyrenoidosa during the restoration of phosphate. I. Cell. Comp. Physiol.

26:35-42.

Soeder, C.J., 1971. Mineral nutrition of plancktonic algae: Some considerations, some experiments. *Milt. Int. Ve-rein.* 19:39-58.

Stein, J. R. 1973. *Handbook of Phycological Methods and Growth Measurements.* Cambridge at the University Press p 289-311.

Stewart, W. D. P. 1974. *Botanical Monographs. Algal Physiology and Biochemistry.* University of California Press. 10:23: p 636-649.

Wiley, J. and Sons. 1976. *Marine Ecology. A. Wiley-Interscience Publication.* Printed in Greal. Britain. London. p 410-451.

Zar, J.D.H. 1974. *Biostatistical Analysis.* Prentice-Hall.