



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EFFECTO DE LA VARIACION DE BIOTINA SOBRE
EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA Tetraselmis suecica

KYLIN (1935) BUTCHER

CURSO DE TITULACION
" BIOLOGIA MARINA "



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

PRESENTA:

ROGELIO ARIZMENDI NAVA

ENSENADA, B.C. FEBRERO DE 1988

RESUMEN

Se realizó un experimento, manteniendo durante diez días en medios de cultivo a nivel Erlenmeyer, a la microalga Tetraselmis suecica.

Se prepararon volúmenes de 75 ml de los medios de Matthiessen y Toner (1966) y f/2 de Guillard (1973) empleando los macronutrientes de Guillard y el EDTA, tris, micronutrientes y vitaminas de Matthiessen y Toner.

La concentración de biotina se varió en ordenes de 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ (control), 0.75 $\mu\text{g}/\text{l}$, 0.50 $\mu\text{g}/\text{l}$, 0.25 $\mu\text{g}/\text{l}$ y 0.0 $\mu\text{g}/\text{l}$.

La densidad inicial promedio de todos los cultivos fue de 0.0275×10^6 células por mililitro. Después de diez días de incubación los medios de cultivo alcanzaron las siguientes densidades poblacionales: en el medio que se empleó 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ (control) se obtuvo 2.30×10^6 células por mililitro; en 0.75 $\mu\text{g}/\text{l}$, 2.08×10^6 ; en 0.50 $\mu\text{g}/\text{l}$, 1.97×10^6 ; en 0.25 $\mu\text{g}/\text{l}$, 2.21×10^6 y finalmente en 0.0 $\mu\text{g}/\text{l}$, la densidad poblacional lograda fue de 1.98×10^6 células por mililitro.

Al analizar estadísticamente las densidades poblacionales, se encontró que no hay diferencias significativas entre los cinco medios de cultivo.

La disminución de la concentración de biotina en el medio de cultivo no representa una reducción significativa en el costo de producción.

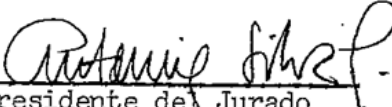
EFEECTO DE LA VARIACION DE BIOTINA SOBRE
EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA Tetraselmis
suecica KYLIN (1935) BUTCHER.

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

QUE PRESENTA:

ROGELIO ARIZMENDI NAVA

APROBADO POR:

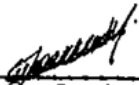

Presidente del Jurado
M.C. ANTONIO SILVA LOERA

Sinodal Propietario
OC. ELISEO ALMANZA HEREDIA

Sinodal Propietario
OC. RAUL AGUILAR ROSAS



Sinodal Suplente
OC. ENRIQUE BALTAZAR VALENZUELA



Sinodal Suplente
M.C. GUILLERMO TORRES MOYE

DEDICATORIA

A mi madre: Felipa, por su incansable esfuerzo de ofrecerme siempre lo mejor.

A mis tios: Federico y Aurelia, por la hospitalidad recibida, sabios consejos y por demostrarme que lo son en todo momento.

A mis hermanos: Gildardo, por su apoyo incondicional y orientación; --
Rosa, Enorina, Adela, Griselda, Ignacio y Juan, por el cariño y confianza que siempre me han mostrado.

A mi cuñada: Marcela, por su hospitalidad y confianza.

A mis compañeros de generación y amigos, por los grandes momentos que hemos vividos juntos.

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

Al M.C. Antonio Silva Loera, por haber aceptado la dirección de este -
trabajo y por sus críticas en la redacción.

A los Oc. Eliseo Almanza Heredia, Raúl Aguilar Rosas, Enrique Baltazar
Valenzuela y M.C. Guillermo Torres Moyé, por la revisión y su
gerencias para mejorar este escrito.

Al M.C. Roberto Millán Nuñez, por su apoyo constante durante el desarro
llo del presente trabajo.

A la Dirección General de Ciencia y Tecnología del Mar, por darme la —
oportunidad de venir a realizar este trabajo para mi supera—
ción profesional.

A la Facultad de Ciencias Marinas de la U.A.B.C. y a los Profesores que
en ella laboran por la formación recibida, amistad y consejos
hasta la obtención de este grado académico.

Al Biol. Víctor Talamantes, por las facilidades otorgadas para realizar
este trabajo.

CONTENIDO

	PAGINA
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	4
MATERIALES Y METODOS	5
MEDIOS DE CULTIVO	5
REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS	8
ANALISIS ESTADISTICO	10
RESULTADOS	11
DISCUSION	21
CONCLUSION	25
RECOMENDACIONES	26
LITERATURA CITADA	27
APENDICE	30

LISTA DE TABLAS

		PAGINA
I	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 1.0 μ g/l de Biotina (testigo). Tomando los valores promedio entre original y réplica.	12
II	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.75 μ g/l de Biotina. Tomando los valores promedio entre original y réplica.	12
III	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.50 μ g/l de Biotina. Tomando los valores promedio entre original y réplica.	13
IV	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.25 μ g/l de Biotina. Tomando los valores promedio entre original y réplica.	13
V	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.0 μ g/l de Biotina. Tomando los valores promedio entre original y réplica.	14

LISTA DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1.- Estructura de la Biotina.	2
Figura 2.- Carboxilación con factor Biotina.	2
Figura 3.- <u>Tetraselmis suecica</u>	3
Figura 4.- Curva de crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de Biotina Tomando los valores promedios entre original y réplica.	16
Figura 5.- Curva de crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 0.75 $\mu\text{g}/\text{l}$ de Biotina. Tomando los valores promedios entre original y réplica.	17
Figura 6.- Curva de crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 0.50 $\mu\text{g}/\text{l}$ de Biotina. Tomando los valores promedios entre original y réplica.	18
Figura 7.- Curva de crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 0.25 $\mu\text{g}/\text{l}$ de Biotina. Tomando los valores promedios entre original y réplica.	19
Figura 8.- Curva de crecimiento poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 0.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de Biotina Tomando los valores promedios entre original y réplica.	20

INTRODUCCION.

El estudio de las microalgas empleandose vitaminas está más limitado que el de los organismos (Droop, 1962), por esta razón se le ha dedicado mayor interés al estudio de las microalgas, principalmente aquellas de importancia acuacultural, que presentan alto valor nutritivo para criar y mantener larvas vivas, semillas y adultos de bivalvos (Laing y Helm, 1981), larvas de peces y crustáceos microhervíboros (Droop, 1975).

Para el cultivo de las microalgas de origen marino, generalmente se adiciona al agua de mar pequeñas cantidades de nutrientes orgánicos e inorgánicos y se controlan los factores fisicoquímicos para favorecer el rápido crecimiento de las células inoculadas (Fogg, 1975). Los medios de cultivo más utilizados actualmente, se basan en el medio enriquecido f de Guillard y Ryther (1962), desarrollándose posteriormente los medios f/2 de Guillard (1973) y el de Matthiessen y Toner (1966).

Dentro de los nutrientes requeridos por las microalgas se encuentran los nitratos, fosfatos, silicatos, elementos traza, agentes quelantes y vitaminas; mientras que los factores fisicoquímicos a controlar son la luz, pH, salinidad, temperatura y aireación.

Las vitaminas, como se anotó anteriormente, son factores orgánicos nutricionales requeridos para el crecimiento continuo de las especies fitoplanctónicas (Provasoli y Carlucci, 1974).

Las más importantes, empleadas constantemente en los cultivos de

microalgas son la cianocobalamina (B_{12}), tiamina (B_1) y biotina (Swift, 1980).

Estas pueden ser producidas por el propio organismo ó tomadas del medio (Swift, 1980), en forma compleja, unida a una proteína, es así - atrapada y pasada a través de la membrana celular (Latner, 1955).

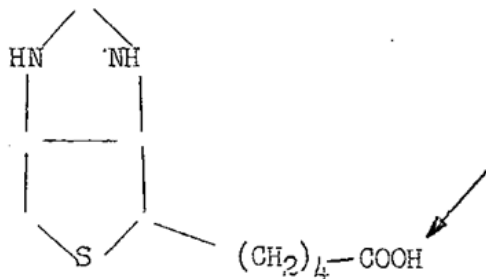


Fig. 1.-Estructura de la biotina, la flecha indica donde se une la proteína. (Bonin y Leftley, 1981).

La biotina empleada en el presente experimento juega un papel muy importante en los procesos celulares, ya que interviene como cofactor enzimático en las reacciones de carboxilación convirtiendo el acetyl - CoA a Malonil CoA por el sistema acetyl CoA carboxilasa (Fig. 2) (Lehninger, 1979).

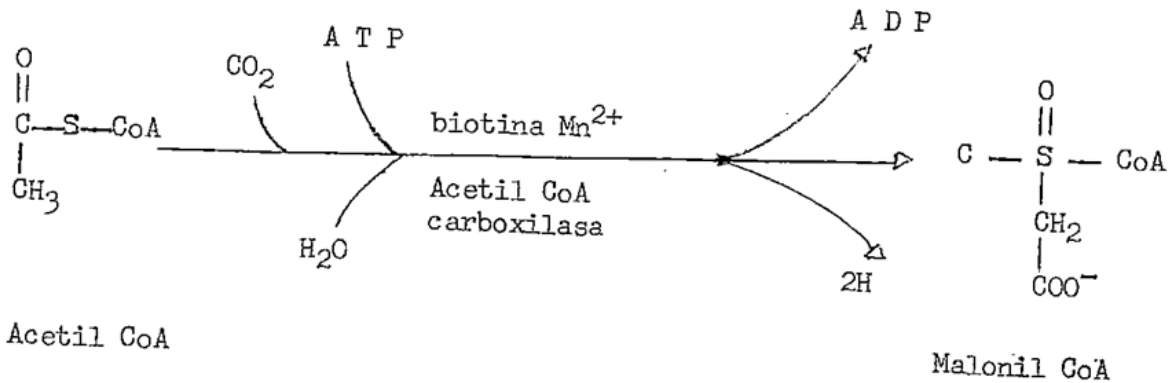


Fig. 2.- Carboxilación con factor biotina. (Bonin y Leftley, 1981).

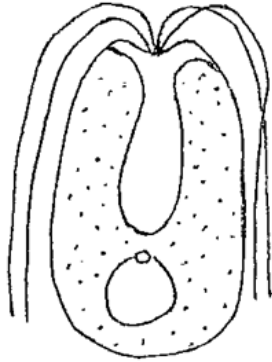


Fig. 3. Tetraselmis suecica
tomada de Paniagua-
Michel (1986).

La microalga en estudio, Tetraselmis suecica, (Fig. 3) pertenece al Phylum prasinophyta y es una microalga de forma elipsoidal comprimida, con el extremo posterior agudo y el extremo anterior de 4 lóbulos y es conocida también como platimonas sp. Tiene de 7-9 micras de diámetro y de 10 a 16 micras de largo y un color verde brillante con 4 flagelos móviles. Es una especie eurihalina, con capacidad de formar esporas cuyo límite de tolerancia a variables físicas es muy amplio. Posee una pared celular delgada formada principalmente de carbohidratos (Padi-
lla, 1975), a lo que Epifanio (1979) atribuye su lenta digestibilidad al compararla con Isochrysis galbana. Esta microalga crece bien en el rango de temperatura de 18-20° C, a pH de 7.5-8.0 y salinidad de 25-30‰. Por estas características es una especie de potencial de cultivo a gran escala.

La microalga en estudio, Tetraselmis suecica, (Fig. 3) pertenece al Phylum prasinophyta y es una microalga de forma elipsoidal comprimida, con el extremo posterior agudo y el extremo anterior de 4 lóbulos y es conocida también como platimonas sp. Tiene de 7-9 micras de diámetro y de 10 a 16 micras de largo y un color verde brillante con 4 flagelos móviles. Es una especie eurihalina, con capacidad de formar esporas cuyo límite de tolerancia a variables físicas es muy amplio. Posee

OBJETIVO.

Observar el efecto de la variación de la concentración de biotina en el crecimiento poblacional de Tetraselmis suecica y ventajas que pudieran presentarse.

MATERIALES Y METODOS.

El experimento fue realizado en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) de la Facultad de Ciencias Marinas de la U.A.B.C., Ensenada, B.C., México.

MEDIOS DE CULTIVO.

El medio de cultivo utilizado como base de esta investigación -- (Apéndice III), se formó tomando las cantidades de macronutrientes sugeridas por Guillard (1973), así mismo el EDTA, tris buffer, metales traza y vitaminas del medio propuesto por Matthiessen y Toner (1966)(Apéndice II).

De las cantidades propuestas para cada sustancia (Apéndice I) se prepararon las soluciones stock primarias, estas se diluyeron una sola vez formando las soluciones stock secundarias, de las cuales se tomaron alícuotas de 1 ml para adicionarlas al medio de cultivo.

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

MACRONUTRIENTES (Solución stock primaria)

Nitrato de sodio - - - - -	75 g/l
Fosfato monosódico - - - - -	5 g/l
EDTA Férrico - - - - -	10 g/l
Tris buffer - - - - -	200 g/l (Ajustar a - pH 7.5 con - Hcl al 30%).

METALES TRAZA (Soluciones stock primarias)

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

SECUESTRANTE (Solución stock secundaria)

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

VITAMINAS (Soluciones stock primarias)

Biotina cristalina - - - - -	10 mg/100 ml
Cianocobalamina cristalina (B ₁₂) - - - - -	10 mg/100 ml
Tiamina clorhídrica (B ₁) - - - - -	2 g/100 ml

De esta solución stock primaria ó concentrada, se tomó una alícuota de 0.075 ml para aforarla a 100 ml con agua destilada formando así la solución stock secundaria, de la cual se tomó un mililitro por cada 75 mililitros de medio de cultivo.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

Una vez preparadas las soluciones stock, se procedió a preparar el medio de cultivo en el interior del laboratorio como a continuación se describe:

En un matraz de un litro de aforación se agregaron 500 ml de agua

de mar filtrada y esterilizada, un mililitro de las soluciones stock — primaria de nitratos y fosfatos, un mililitro de la solución stock secundaria de secuestrante, un mililitro del stock primario del tris buffer y finalmente se aforó hasta el nivel de un litro con agua de mar — filtrada y esterilizada.

En diez matraces Erlenmeyer de 250 ml se transfirieron individualmente 75 mililitros de medio de cultivo. Estos se esterilizaron en la autoclave durante 15 minutos a 120°C y 20 libras/pulg² de presión de vapor. Se dejaron enfriar durante 24 horas y en el interior del laboratorio, en presencia de la flama de dos mecheros Bunsen, situados por los costados, se transfirió en cada matraz un mililitro de vitamina B₁₂ y un mililitro de tiamina. En el caso de la biotina se preparó un medio control, agregando un mililitro de la solución stock secundaria de dicha vitamina al medio de cultivo quedando una concentración de 1.0 μ g/l lo cual representa el 100% de su concentración original de acuerdo al medio de Matthiessen y Toner (1966). Posteriormente se prepararon las muestras problema agregando a los medios de cultivo 0.75 ml, 0.50 ml, 0.25 ml y 0.0 ml correspondiendo a las concentraciones de 0.75, 0.50, 0.25 y 0.0 μ g/l respectivamente.

Cabe señalar que estas soluciones vitamínicas se agregaron después de la esterilización, por lo que no hubo necesidad de ajustar el pH.

Todos los matraces con sus respectivos medios de cultivo (original y réplica), fueron inoculados con un ml de la cepa de T. suecica en su fase de crecimiento exponencial del sexto día, con una concentración de 224×10^6 cel/ml.

Los matraces inoculados se mantuvieron en el laboratorio de cultivo a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}$ C estimado con un termómetro de máxima y mínima. La iluminación se proporcionó con lámparas fluorescentes tipo luz fría de 40 Watts con 4 pies de largo, recibiendo los cultivos una intensidad luminosa a una distancia de 30 cm. Los medios de cultivo se agitaron periódicamente para favorecer la difusión de nutrientes, un mayor contacto luminoso y evitar la depositación de las células en el fondo del recipiente. La boca de los Erlenmeyer fue cubierta con tapones de algodón recubiertos de gasa para de esta forma evitar la contaminación por el aire y permitir al mismo tiempo el intercambio de gases entre el medio ambiente y el cultivo.

Las cepas de T. suecica utilizadas a lo largo del experimento, fueron obtenidas del laboratorio de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) U.A.B.C., estas a su vez fueron adquiridas en el National Marine Fisheries Service, La Jolla, Calif.

REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS.

Desde el momento de inocular a los recipientes de cultivo con la microalga, se levantó un registro diario de la densidad poblacional para identificar las fases de crecimiento. Cada 24 horas a partir de las 12:30 p.m., se tomó un ml de muestra de cada matraz, previa homogenización y en presencia de un mechero Bunsen.

Estas muestras se fijaron con dos gotas de lugol a fin de teñir e inmovilizar las microalgas para lograr un conteo más exacto. El conteo celular se realizó con ayuda de un hematocitómetro tipo Neubauer de 0.1 mm de profundidad. El error por conteo se minimizó, al obtener el

promedio del número de células observadas en las seis cámaras del original y las seis cámaras de la réplica.

ANALISIS ESTADISTICO.

Con la finalidad de estimar la respuesta de crecimiento en cada cultivo, se graficaron curvas de crecimiento promedio, para hacer comparaciones entre la concentración testigo y las que se experimentaron.

Con la densidad celular promedio del octavo día se hizo un análisis de varianza no paramétrico, según la prueba de Kruskall-Wallis -- (Zar, 1974), con el propósito de detectar si existía ó no diferencias significativas entre la densidad poblacional del cultivo control y las que se ensayaron.

Se empleó el método de Kruskall-Wallis al no poderse demostrar, la normalidad de las poblaciones mediante la prueba de Ji cuadrado y -- Kolmogorov-Smirnov (Zar, 1974).

RESULTADOS.

Los parámetros poblacionales de cada concentración se presentan en las tablas I, II, III, IV y V y son: la densidad celular, el número de divisiones por día (K), la tasa de crecimiento específico (MU), la producción diaria (PD) y el tiempo medio de generación (TG). Estos se calcularon de acuerdo a Paniagua Michel et al. (1986) (Apendice VI y VII).

La tabla I (control), muestra los valores poblacionales de T. suecica, para el medio de cultivo con una concentración de 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de biotina, la mayor densidad celular la alcanzó al décimo día. El valor máximo de K, se presentó al tercer día coincidiendo con el valor máximo de MU. La PD máxima fue al sexto día y el valor mínimo de TG, al tercer día.

La tabla II, muestra los valores poblacionales de T. suecica, para el medio de cultivo con una concentración de 0.75 $\mu\text{g}/\text{l}$ de biotina. La mayor densidad celular la alcanzó al noveno día. Los valores máximos de K y MU se presentaron al tercer día. La PD máxima fue al séptimo día y el valor mínimo de TG al tercer día.

La tabla III, muestra los valores poblacionales de T. suecica, para el medio de cultivo con una concentración de 0.50 $\mu\text{g}/\text{l}$ de biotina. La mayor densidad celular la alcanzó al décimo día. Los valores máximos de K y MU se presentaron al tercer día. La PD máxima se registró al octavo día y la TG mínima al tercer día.

La tabla IV, muestra los valores poblacionales de T. suecica, para el medio de cultivo con una concentración de 0.25 $\mu\text{g}/\text{l}$ de biotina. La mayor densidad celular la alcanzó al décimo día. Los valores máximos -

TABLA I.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 1.0 de Biotina (testigo). Tomando los valores promedio entre original y réplica.

DIA	DEN x 10000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	TG (día)	PD x 10000 (cel/día)
0	2.75				
1	3.25	0.2410	0.0726	4.1492	0.5000
2	7.91	1.2833	0.3863	0.7793	4.6600
3	30.50	1.9471	0.5861	0.5136	22.5900
4	74.50	1.2885	0.3879	0.7761	44.0000
5	111.41	0.5806	0.1748	1.7224	36.9100
6	188.88	0.7616	0.2293	1.3130	77.4700
7	197.35	0.0633	0.0191	15.8008	8.4700
8	206.98	0.0687	0.0207	14.5484	9.6300
9	227.41	0.1358	0.0409	7.3634	20.4300
10	230.44	0.0191	0.0057	52.3680	3.0300

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

DIA	DEN x 10000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	TG (día)	PD x 10000 (cel/día)
0	2.75				
1	3.16	0.2005	0.0604	4.9876	0.4100
2	9.58	1.6001	0.4817	0.6249	6.4200
3	29.25	1.6104	0.4848	0.6210	19.6700
4	62.25	1.0897	0.3280	0.9177	33.0000
5	95.92	0.6238	0.1878	1.6032	33.6700
6	131.88	0.4593	0.1383	2.1771	35.9600
7	168.83	0.3564	0.1073	2.8062	36.9500
8	190.33	0.1729	0.0521	5.7825	21.5000
9	221.91	0.2215	0.0667	4.5152	31.5800
10	208.33	-0.0911	-0.0274	-10.9762	-13.5800

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

DIA	DEN x 10000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	TG (día)	PD x 10000 (cel/día)
0	2.75				
1	3.75	0.4475	0.1347	2.2348	1.0000
2	7.83	1.0621	0.3197	0.9415	4.0800
3	31.83	2.0233	0.6091	0.4942	24.0000
4	50.10	0.6544	0.1970	1.5280	18.2700
5	74.05	0.5637	0.1697	1.7740	23.9500
6	108.54	0.5517	0.1661	1.8127	34.4900
7	140.42	0.3715	0.1118	2.6916	31.8800
8	177.58	0.3387	0.1020	2.9522	37.1600
9	185.58	0.0636	0.0191	15.7299	8.0000
10	197.00	0.0862	0.0259	11.6068	11.4200

TABLA IV.-- Valores poblacionales de *T. suecica* a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.25 g/l de Biotina. Tomando los valores promedio entre original y réplica.

DIA	DEN x 10000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	TG (día)	PD x 10000 (cel/día)
0	2.75				
1	3.25	0.2410	0.0726	4.1492	0.5000
2	9.33	1.5215	0.4580	0.6573	6.0800
3	34.42	1.8833	0.5669	0.5310	25.0900
4	67.25	0.9663	0.2909	1.0349	32.8300
5	104.00	0.6290	0.1893	1.5898	36.7500
6	152.88	0.5558	0.1673	1.7991	48.8800
7	200.50	0.3912	0.1178	2.5562	47.6200
8	198.41	-0.0151	-0.0046	-66.1458	-2.0900
9	203.25	0.0348	0.0105	28.7592	4.8400
10	221.33	0.1229	0.0370	8.1337	18.0800

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

DIA	DEN x 10000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	TG (día)	PD x 10000 (cel/día)
0	2.75				
1	3.17	0.2051	0.0617	4.8767	0.4200
2	9.16	1.5309	0.4608	0.6532	5.9900
3	36.17	1.9814	0.5965	0.5047	27.0100
4	70.75	0.9680	0.2914	1.0331	34.5800
5	114.42	0.6936	0.2088	1.4419	43.6700
6	152.13	0.4110	0.1237	2.4332	37.7100
7	195.00	0.3582	0.1078	2.7919	42.8700
8	225.50	0.2097	0.0631	4.7697	30.5000
9	207.00	-0.1235	-0.0372	-8.0972	-18.5000
10	198.35	-0.0616	-0.0185	-16.2380	-8.6500

K y MU se presentaron al tercer día. La PD máxima se registró al sexto día y la TG mínima al tercer día.

La tabla V, muestra los valores poblacionales de T. suecica, para el medio de cultivo con una concentración de 0.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de biotina. La mayor densidad celular la alcanzó al octavo día. Los valores máximos de K y MU se presentan al tercer día. La PD máxima se registró al quinto día y la TG mínima al tercer día.

Las curvas de crecimiento de T. suecica se muestran en las figuras 4, 5, 6, 7 y 8 y corresponden a los medios de cultivo cuya concentración de biotina fue de 1.0, 0.75, 0.50, 0.25 y 0.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ respectivamente. Sobreponiendo una curva sobre la otra se observan patrones de crecimiento muy similares. Notoriamente presentan las cuatro primeras fases del crecimiento microalgal en cultivos de volumen limitado descritas por Fogg (1975) (Apendice V). Las cinco curvas muestran la fase de inducción a partir del día de inoculación (cero) hasta el primer día de cultivo. La fase exponencial del día dos hasta el séptimo. La fase de declinamiento relativo del séptimo al octavo y posterior a estos días la fase estacionaria.

Las pruebas de Ji cuadrado y Kolgomorov-Smirnov, mostraron que los datos poblacionales no tenían una distribución normal. La prueba de análisis de varianza de Kruskall-Wallis, dió como resultado que la hipótesis nula (H_0) no se rechaza, es decir no existieron diferencias significativas en el número de células encontradas al octavo día del experimento entre el medio de cultivo control y los medios de cultivo experimentales a nivel de significancia del 5%.

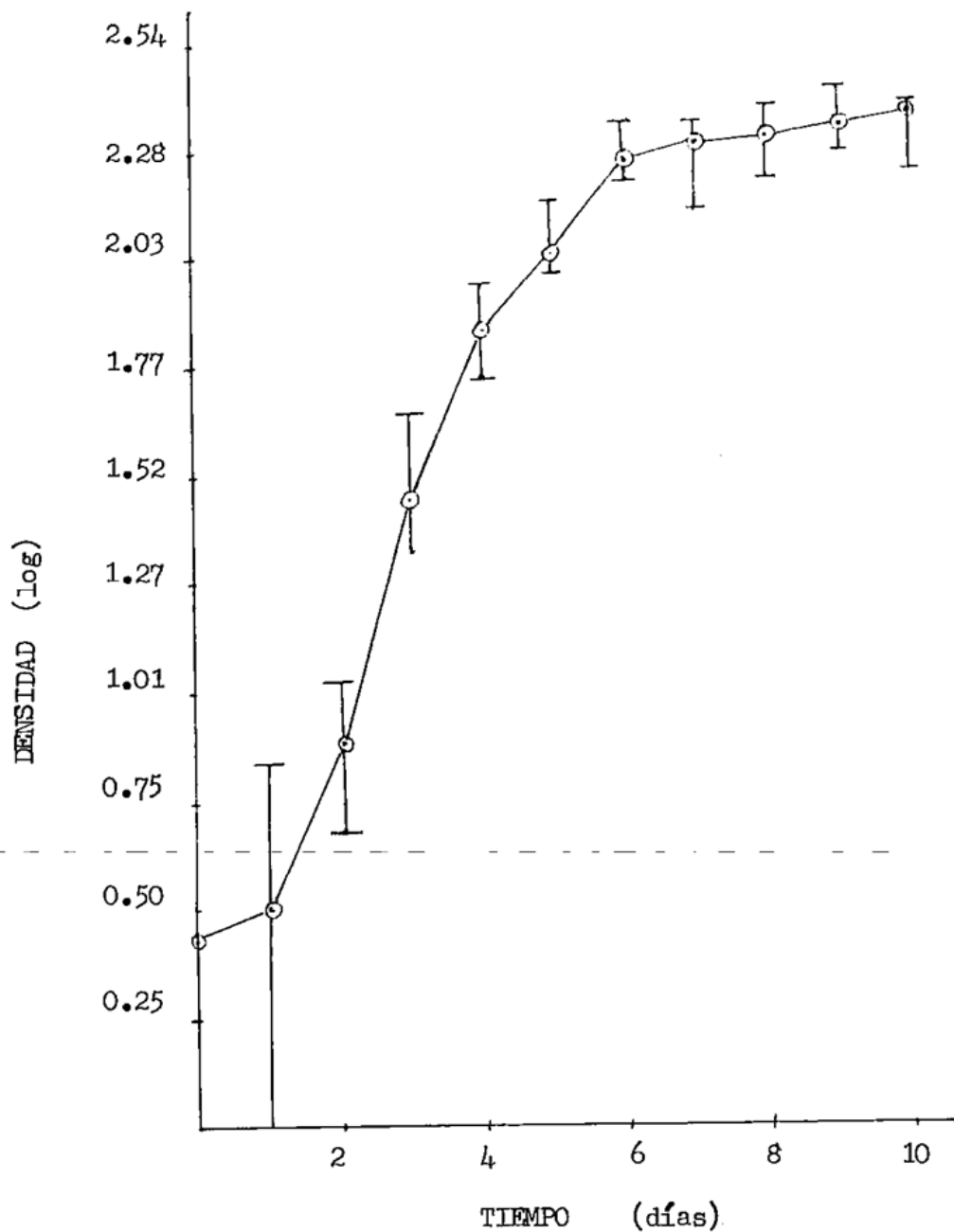


Figura 4.- Curva de crecimiento poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de biotina. Tomando los valores promedios entre original y réplica. Las barras verticales representan los intervalos de las densidades muestreadas.

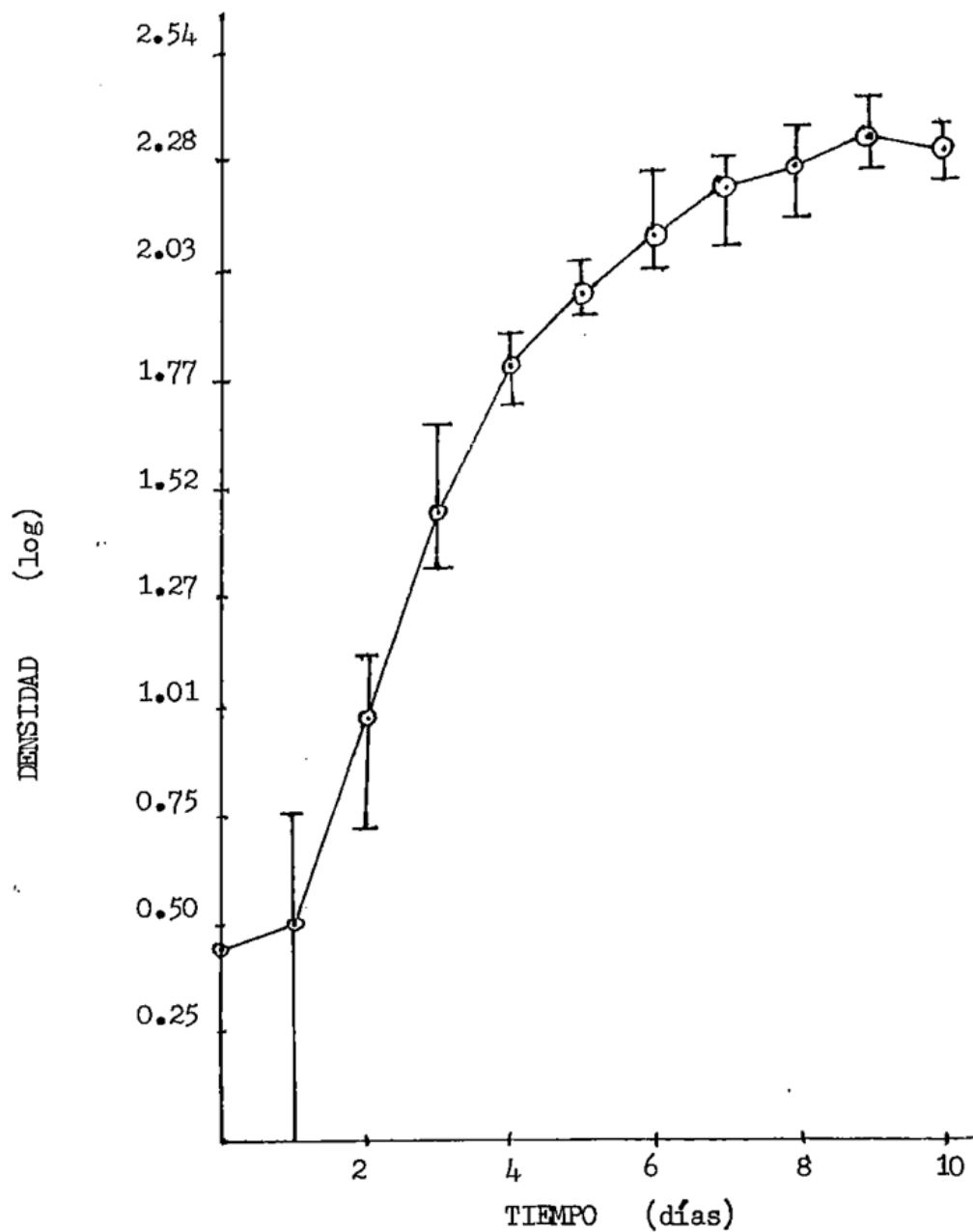


Figura 5.- Curva del crecimiento poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con $0.75 \mu\text{g}/\text{l}$ de biotina. Tomando los valores — promedios entre original y réplica. Las barras verticales representan los intervalos de las densidades muestreadas.

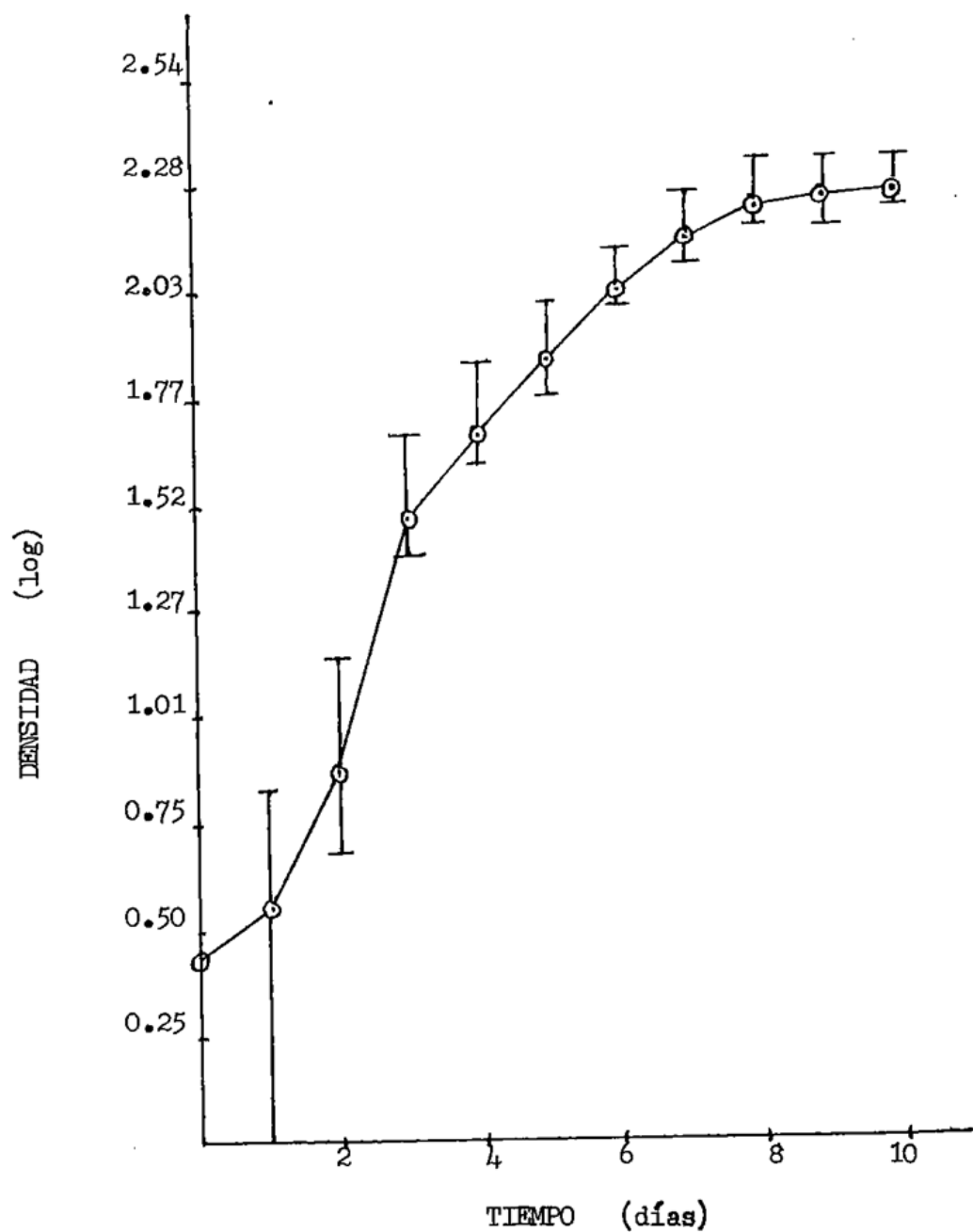


Figura 6.- Curva del crecimiento poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 0.50 $\mu\text{g/l}$ de biotina. Tomando los valores - promedios entre original y réplica. Las barras verticales representan los intervalos de las densidades muestreadas.

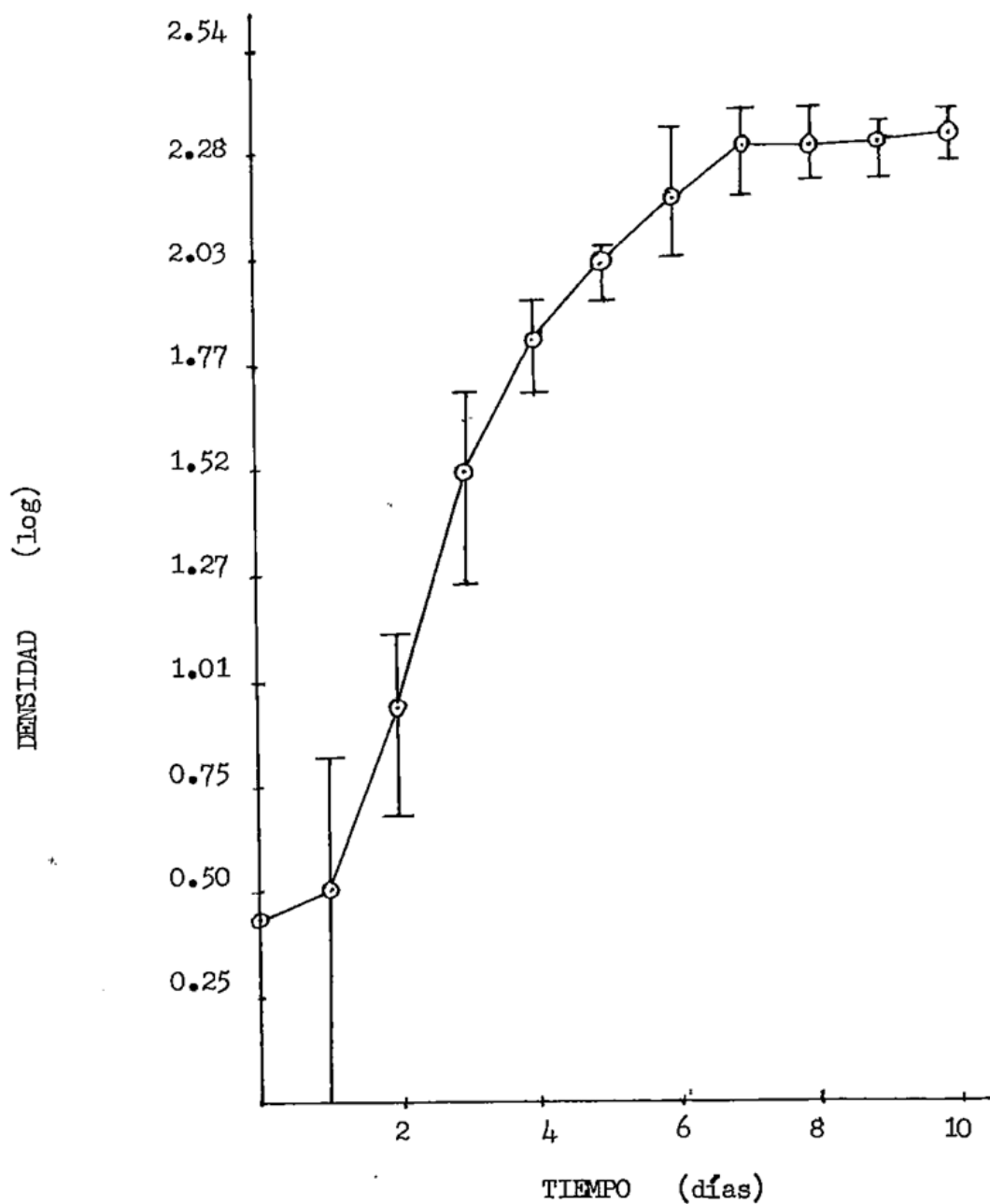


Figura 7.- Curva del crecimiento poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 0.25 $\mu\text{g/l}$ de biotina. Tomando los valores promedios entre original y réplica. Las barras verticales representan los intervalos de las densidades muestreadas.

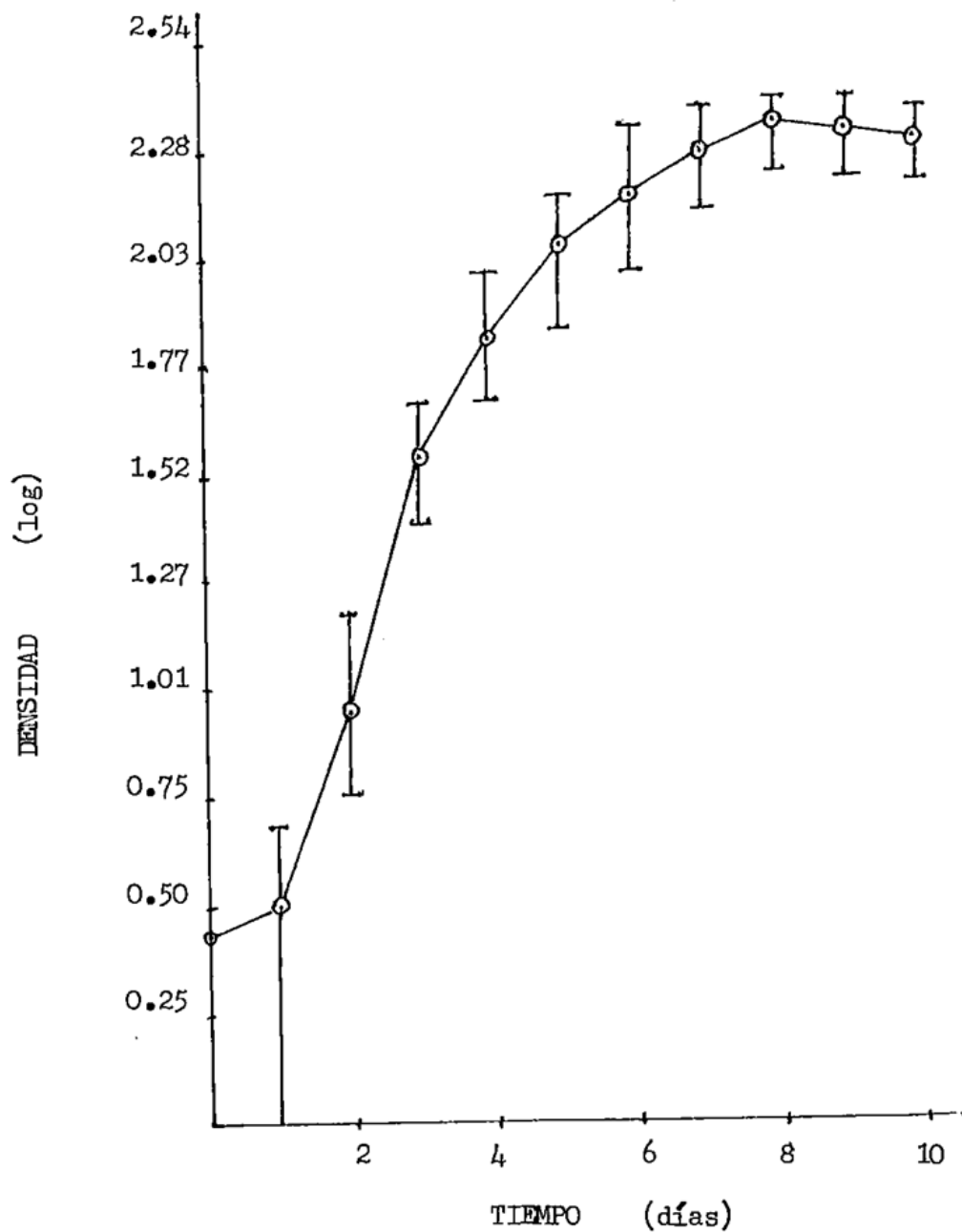


Figura 8 .- Curva del crecimiento poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 0.0 $\mu\text{g/l}$ de biotina. Tomando los valores — promedios entre original y réplica. Las barras verticales representan los intervalos de las densidades muestreadas.

DISCUSION.

La metodología empleada en el presente estudio, partió de la idea de observar un medio de cultivo favorable y más económico para T. suecica. Se tomó en consideración que esta microalga puede tener un requerimiento mínimo óptimo de nutrientes (Cheng y Antia, 1970). Por esta causa se disminuyó paulatinamente la concentración de biotina en los medios de cultivo desde 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ hasta el nivel cero.

El análisis de los valores poblacionales, presentados en las tablas I, II, III, IV y V, muestran densidades celulares muy bajas durante el primer día de cultivo debido a que la microalga inicia su fase de adaptación al nuevo medio. Las densidades se incrementan en los días posteriores porque la microalga empieza a aprovechar los nutrientes que encuentra disponibles en el medio, alcanzando valores máximos entre el octavo y décimo día de incubación. El valor máximo de divisiones por día se obtuvo el tercer día, asumiendo que es el momento en que la microalga se encuentra bien adaptada y aprovecha óptimamente los nutrientes del medio. Esto se refleja razonablemente en el valor máximo de la tasa de crecimiento específico y el valor mínimo del tiempo medio de generación, que aparecen al tercer día y que guardan una relación directa e inversamente proporcional con el valor máximo de divisiones por día. La producción máxima diaria fue variable, presentándose entre el quinto y octavo día por ser los últimos días de la fase exponencial.

Por el comportamiento de las curvas de crecimiento de T. suecica, se supone que desde el primer día de cultivo empieza a aprovechar los -

nutrientes hasta agotarlos al séptimo día que es cuando decae la fase exponencial.

En base a que el crecimiento de los cultivos experimentales respecto al medio control no presentaron diferencias estadísticamente significativas, se puede decir que todos los medios de cultivo contenían la suficiente concentración de biotina requerida por T. suecica, ya que a pesar de que no se añadió biotina a un medio de cultivo, la microalga se desarrolló en forma similar a los otros medios de cultivo. Este hecho dá la pauta para pensar que el agua de mar contiene la concentración de biotina requerida por la microalga, causa por la que se obtuvo un buen resultado. Esto es reforzado por los trabajos de Córdova Ricárdez - - (1988) y Aguirre Muñoz (1981). El primero mantuvo a T. suecica, 10 días en un medio de cultivo sin añadir B12, sin observar diferencias con las que tenían. El último, mantuvo 20 días a T. suecica creciendo normalmente en un medio de cultivo sin añadir ninguna de las tres vitaminas limitantes al crecimiento de la microalga.

Por lo anterior expuesto es probable que T. suecica sea una especie que soporta amplias variaciones tanto de factores fisicoquímicos como nutricionales. Así lo muestra también el experimento de Parés y - - Alonso (1982) quienes cultivaron esta microalga en el invierno bajo condiciones rudimentarias, sin control de temperatura y de luz. Sin lugar a dudas la respuesta al crecimiento mostrado por T. suecica en este experimento resultó favorable en todos los medios de cultivo. A esta misma conclusión llegan Laing y Helm (1981), quienes hacen notar estas características de la microalga. Por consiguiente, pudiera ser que - -

T. suecica tuviera tendencias a utilizar la vitamina B₁₂ y tiamina para producir la biotina, dadas sus características de auxotrofia mencionadas por Aguirre Muñoz (1981).

El crecimiento normal de T. suecica en el medio de cultivo que no se agregó biotina puede atribuirse a que la cepa provenía de un medio rico en nutrientes y vitaminas que pudo haberle servido como reserva durante el experimento. Esto se liga a la asunción mostrada por Droop (1953), quien sugiere que la mayoría de las microalgas poseen un pool interno de sales nutritivas que permite a los organismos seguir creciendo aún cuando la concentración externa llegué a un mínimo.

Por otro lado, si se analiza el costo y se diera por hecho utilizar un medio de cultivo sin biotina, se lograría una disminución del 100% en el gasto de esta vitamina. El precio actualizado de la biotina es de \$ 47,538.00 pesos M.N. por gramo, de aquí que por cada litro de cultivo habría un ahorro de 0.047 pesos M.N., por consiguiente a diferentes volúmenes de cultivo, el ahorro sería el siguiente:

Fernbach (2.8 l) - - - - -	0.133 pesos M.N.
Carboy (18 l) - - - - -	0.855 pesos M.N.
Bolsa (60 l) - - - - -	2.82 pesos M.N.
Tanques (1000 l) - - - - -	47.53 pesos M.N.
Tanques (10,000 l) - - - - -	475.38 pesos M.N.

A pesar de que sin haber añadido biotina al medio se haya obtenido una producción celular aceptable, sería problemático no incluir esta vitamina en los medios de cultivo hasta no ver que resultados se obten-

drian al continuar el desarrollo del experimento, disponiéndose de varias generaciones. Lo anterior se presume, porque se ha comprobado que el pool puede durar por varias generaciones en algunas especies de microalgas (Droop, 1953).

Por lo anteriormente expuesto, la biotina debe emplearse en la preparación de los medios de cultivo en cantidades tales como las que sugieren Matthiessen y Toner (1966), para asegurar la producción de microalgas, ya que si analizamos costos el ahorro por cada tanque de 10,000 litros de cultivo, resulta insignificante.

CONCLUSIONES.

- 1.- La variación de la concentración de biotina en los medios de cultivo, no afectó el crecimiento de T. suecica.
- 2.- La disminución de la concentración de biotina en el medio de cultivo no representa una reducción significativa del costo de producción.

RECOMENDACIONES.

Ampliar el experimento en tiempo de cultivo utilizando cepas de — T. suecica de medios de cultivo que no se añade biotina. Las cepas deben ser de la fase exponencial del sexto día y se deben someter a las — mismas condiciones de cultivo para tener mayor información del comportamiento de T. suecica con respecto a esta vitamina.

LITERATURA CITADA.

- Aguirre Muñoz Alfonso, 1981 . Estudios con un cultivo semicontinuo de Tetraselmis suecica KYLIN (1935): nutrientes, vitaminas, desinfección del medio con U.V. y producción del sistema a largo plazo. Tesis de Licenciatura, Escuela Superior de Ciencias Marinas de la U.A.B.C., Ensenada, B. Cfa., México. pp. 66.
- Bonin, D.J. y S.V. Maestrini Leftley, 1981 . The role of phytohormones and vitamins in species sucesion of phytoplankton. In platt (ed.), physiological bases of phytoplankton Ecology pp. 310-322. Can. Bull. Fish. Aguat. sci. 210.
- Cheng, J. Y. y Antia, 1970 . The survival of axenic cultures of — marine planktonic algae from prolonged exposure to darkness at 20°C. Phycología 9 (2): 179-183.
- 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., 1962 . Organic micronutrients. In Lewin (ed.), physiology and Biochemistry of algae, pp. 141-154. Acad. Press N.V. — and Longon.
- Droop, M.R., 1975 . The chemostat in mariculture. In: 10th European. — Sump. Mar. Biol. Ostend, Belgium, 1:17-23.
- Enviromental Protection Agency, 1971 . Algal assay procedure national — research eutrophycation program/EPA: 1-82.

- Epifanio, C.E., 1979. Growth in bivalve mollusc: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the american oyster Crassostrea virginica (GEMELIN) and the hard clam Mercenaria mercenaria (L.). Aquaculture, 18: 1-12.
- Eppley, R.W. y Strickland, J.O., 1968. Kinetics of marine plankton, growth, p. 23-62. En advances in microbiology of the sea (M.R. Droop y E.J. Ferguson, eds.). Academic Press, New York. 540 pp.
- Fogg, Q.E., 1975. Algal cultures and phytoplankton ecology. 2nd. edition. The University of Wisconsin Press., 175 pp.
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H., 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana. Husted and Detonula confervaceae (clave). Can. J. Microbiol. 8: 229-239.
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. In: J.R. stein (ed.), Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. London. Cambridge Univ. Press. pp. 289-311.
- Laing, I. y Helm, M.M. 1981. Factor affecting the semicontinuous production of Tetraselmis suecica (KYLIN) butch in zool vessels. Aquaculture, 22: 137-148.
- Latner, A.L., 1955. Intrinsic factor. Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Engl.), 13: 69-91.

- Lehninger, A., 1979. Bioquímica. 2a. Edición Eds. Omega, S.A., Barcelona.
- Matthiessen, G.C. y Toner, R.C., 1966. Possible methods of improving the shellfish Industry of Martha's Vineyard, Duke's county Massachusetts. Marine Research Foundation, Edgartown, Mass., -- 138 pp.
- Padilla, M.G., 1975. Crecimiento poblacional de Tetraselmis suecica - (Chlorophyceae) en ambiente controlado. Rev. Biol. Mar., Valparaíso 15 (3): 287-296.
- Paniagua Michel, J., Buckle Ramírez, F., Granados Machuca, G. y Loya Salinas, D. 1986. Manual de Metodologías y Alternativas para el Cultivo de Microalgas. Informe especial OC-86-01. C.I.C.E.S.E. Ensenada, B.Cfa., México. 94 pp.
- Pares, S.G. y Alonso, L.G., 1981. Cultivo semicontinuo de las microalgas Isochrysis galvana y Tetraselmis suecica para USD como alimento de larvas y adultos de Mytilus californianus. Tesis Profesional para obtener el Título de Oceanólogo.
- Provasoli, L. y Carlucci, A.F., 1974. Vitamins and growth regulators. In Stewart W.D.P. (ed.), Algal physiology and Biochemistry pp. 741-87. Blackwell scientific. Publications, Oxford.
- Swif, D.G., 1980. Vitamins and phytoplankton growth regulators. In Morris (ed.), the physiological ecology of phytoplankton, pp. - 329-368. Univ. of Calif. Press, Berkeley and Los Angeles.
- Zar, J.D.H., 1974. Bioestatistical analisis. Prentice-Hall.

APENDICE

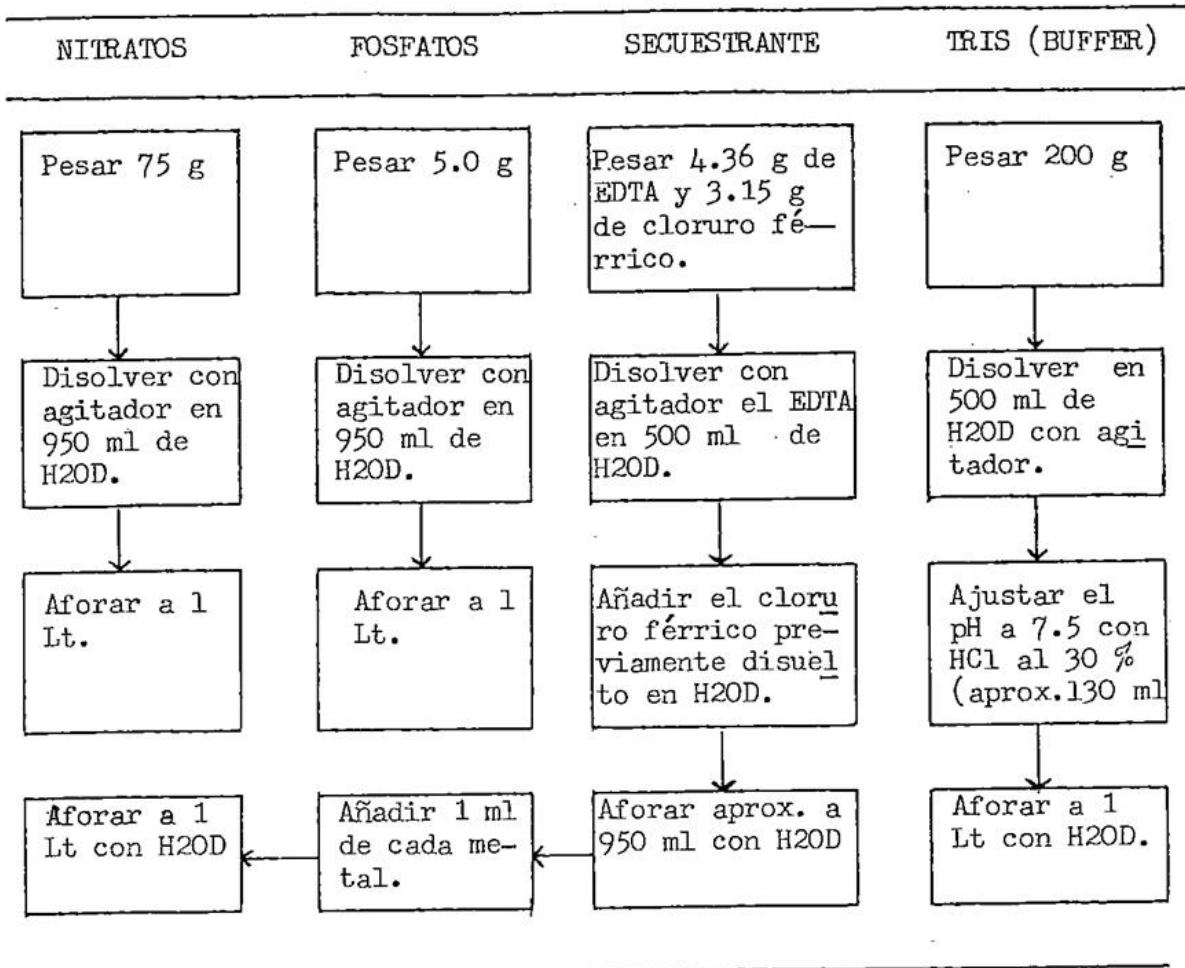
	PAGINA
I.- Medios de cultivo mas usados.	31
II.- Rutina seguida en la preparación de los macronutrientes para los medios de cultivo.	32
III.- Diseño del medio modificado f/2 de Guillard, 1973 y Matthiessen y Toner, 1966, utilizado como medio básico.	33
IV.- Rutina a seguir en la preparación de la solución stock primaria de vitaminas para los medios de cultivo.	34
V.- Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de volumen limitado.	35
VI.- Cálculos de densidad.	36
VII.- Cálculo de parámetros poblacionales.	37

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

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

APENDICE II.— Rutina seguida en la preparación de los macronutrientes para los medios de cultivo.

Preparación de Nutrientes.



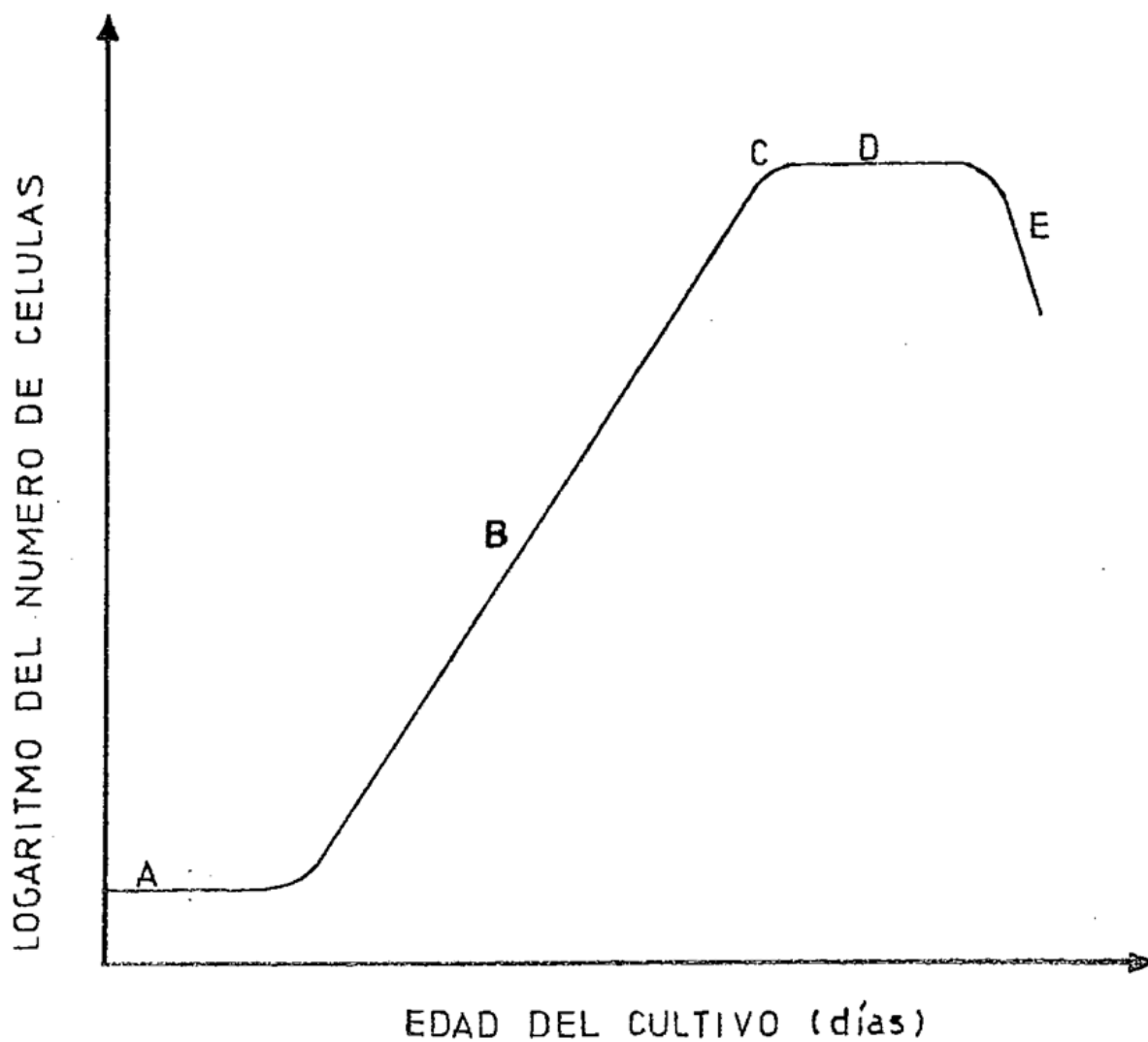
APENDICE III.- Diseño del medio modificado f/2 de Guillard (1973) y Matthiessen y Toner (1966) utilizado como medio básico.
(Cantidades para un litro de agua de mar filtrada).

INGREDIENTES:	CANTIDADES:
Nutrientes mayores:	
NaNO_3	75 mg
$\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{a}$	5 mg
Metales traza	
Fe, EDTA	10.0 mg
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96 mg
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg
$\text{Co Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0 mg
$\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.9 mg
$\text{Na}_2\text{M}_2\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.26 mg
Vitaminas	
B1	200 μg
Biotina	1.0 μg
B12	1.0 μg

APENDICE IV.- Rutina a seguir en la preparación de la solución stock primaria de vitaminas para los medios de cultivo.
 Concentrado (solución stock primaria).

B ₁₂	BIOTINA	TIAMINA
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Pesar 10 mg con balanza analítica. </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Pesar 10 mg con balanza analítica. </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Pesar 2 g con balanza analítica. </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Disolver en 50 ml de - H₂O. </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Disolver en 50 ml de H₂O. </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Disolver en 50 ml de H₂O. </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Aforar a 100 ml. </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Aforar a 100 ml. </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Aforar a 100 ml. </div>

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



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

APENDICE VI.- CALCULOS DE DENSIDAD.

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

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

Donde:

D= densidad del cultivo.

F= fijador (mls)

F.D.= factor de dilución (mls)

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

Vf= Volumen final de la muestra diluída (mls)

vi= volumen inicial de la muestra (mls)

M= Mililitros de muestra utilizados

C= Número de células promedio contadas

10= factor de multiplicación debido a la profundidad del Hematocitómetro

1000= valor para convertir a milímetros

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

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

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

APENDICE VII.- CALCULO DE PARAMETROS POBLACIONALES.

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

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

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

Donde:

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

N1= Concentración celular al tiempo T1

N2= Concentración celular al tiempo T2

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

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

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

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

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

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