

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS



DISEÑO Y SELECCION DE MEDIOS ALTERNATIVOS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

TESIS PROFESIONAL
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA

MARIA IRENE GONZALEZ LEONARDO

ENSENADA, B.C.

ENERO DE 1991

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS

DISEÑO Y SELECCION DE MEDIOS ALTERNATIVOS
PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

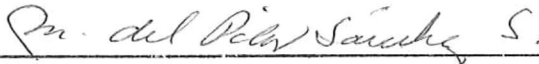
T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PRESENTA :

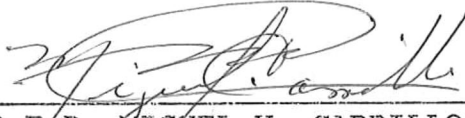
MARIA IRENE GONZALEZ LEONARDO

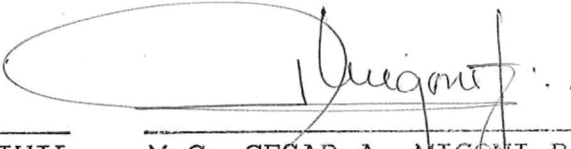
APROBADO POR :


DR. DOMENICO VOLTOLINA


M.C. MA. DEL PILAR SANCHEZ SAAVEDRA


BIOL. EUSEBIO BARRETO ESTRADA


Q.F.B. MIGUEL H. CARRILLO MENDIVIL


M.C. CESAR A. MIGONI RAMIREZ

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS

DISEÑO Y SELECCION DE MEDIOS ALTERNATIVOS
PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

TESIS PROFESIONAL QUE COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO
P R E S E N T A

MARIA IRENE GONZALEZ LEONARDO

ENSENADA, B.C.

ENERO DE 1991.

DEDICATORIA

A TI PAPA:

POR SER EL HOMBRE MAS SENCILLO Y AMOROSO, PORQUE
SUPISTE DESDE NIÑA GUIARME QUE CON TU EJEMPLO INCULCARME
EL AMOR AL ESTUDIO, AL TRABAJO Y POR ESTAR SIEMPRE -- --
CONMIGO, GRACIAS.

A TI MAMA:

POR SER LA MUJER MAS LINDA Y BUENA, PORQUE DE --
UNA FORMA U OTRA SIEMPRE ESTUVISTE DISPUESTA AYUDARME --
EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS, POR TUS VALIOSOS CONSEJOS--
Y TU AMOR INAGOTABLE, GRACIAS.

A TI JORGE:

MI MEJOR COMPAÑERO Y AMIGO DESDE HACE SIETE AÑOS
POR COMPARTIR MIS TRISTEZAS, ALEGRIAS, EXITOS Y FRACASOS,
POR ACEPTARME TAL COMO SOY, GRACIAS.

A MIS HERMANOS:

LUIS RENE, PATRICIA Y VICTORIA MARIBEL, CON
MUCHO AMOR.

CON MUCHO CARIÑO A MI SOBRINA LAURA PATRICIA, ESPERANDO--
QUE ALGUN DIA LE SIRVA DE ESTIMULO PARA SEGUIR ADELANTE.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO A MI DIRECTOR DR. DOMENICO VOLTOLINA, ESPECIALMENTE POR SU DEDICACION, EMPEÑO Y APOYO EN TODO LO QUE RESPECTA A MI FORMACION Y PREPARACION EN MI TRABAJO DE TESIS PROFESIONAL QUE ATINADAMENTE SIEMPRE DIRIGIO.

A MI DIRECTORA M.C. MA. DEL PILAR SANCHEZ SAAVEDRA POR HABER DEPOSITADO TODA SU CONFIANZA EN MI DESDE ANTES QUE INGRESARA AL DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA HASTA EL FINAL DE ESTE TRABAJO Y POR SUS VALIOSAS OBSERVACIONES Y AYUDA CONSTANTE.

A LOS SINODALES BIOL. EUSEBIO BARRETO E., MIGUEL H. CARRILLO M. Y CESAR MIGONI POR TODAS SUS OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS.

A LA M.C. BEATRIZ CORDERO E. AGRADEZCO SU COLABORACION EN VARIAS ETAPAS DE ESTE TRABAJO Y PORQUE DESDE QUE INGRESE AL DEPARTAMENTO ME BRINDO SU APOYO Y SU AMISTAD.

A LOS COMPAÑEROS SAUL GONZALEZ M., ERNESTO TORRES, QUE TAMBIEN COLABORARON DE ALGUNA MANERA EN LA ELABORACION DE ESTE ESCRITO.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS QUE ESTUVIERON LIGADOS A MI VIDA COTIDIANA QUE CON SU OPTIMISMO Y ALEGRIA LOGRARON QUE MI TRABAJO SE DESENVOLVIERA EN UN AMBIENTE AGRADABLE.

A MIS PADRES QUE CON SU TRABAJO SOLVENTARON MIS ESTUDIOS Y QUE CON MIS HERMANOS COMPARTIERON CADA UNA DE LAS ETAPAS DE MI VIDA HASTA LA CULMINACION DE ESTE TRABAJO MUCHAS GRACIAS.

A JORGE POR SU PACIENCIA, COMPRENSION, DESVELOS Y APOYO.

A MIS ABUELITOS, TIOS, PRIMOS, Y PADRINOS POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO Y QUE DE UNA FORMA Y OTRA SIEMPRE ME AYUDARON.

AL DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA C.I.C.E.S.E. POR HABERME BRINDADO EL APOYO NECESARIO PARA LA REALIZACION DE ESTA INVESTIGACION.

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS	.xii
RESUMEN	.xiii
ABSTRACT	.xiii
I.- INTRODUCCION	1
II.- ANTECEDENTES	.10
III.- OBJETIVO	.13
IV.- MATERIALES Y METODOS	.14
IV.I Cepas y su matenimiento	.14
IV.II Fase experimental	.16
IV.III Analisis estadístico de los resultados	22
V.- RESULTADOS	.26
VI.- DISCUSIONES	98
VII.- CONCLUSIONES	120
VIII.- RECOMENDACIONES	.124
IX.- LITERATURA CITADA	.126

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
I Concentración de nutrientes en un litro de medio control "f" y de medio simplificado ESW. Los datos están calculados basándose en Voltolina (1987) y McLachlan (1973).	21
II Tasa de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempo de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> mencionadas en el texto para los cultivos en Erlenmeyer, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes, 3: ESW más FeEDTA con metales traza, 4: ESW más FeEDTA solo y 5: ESW sola.	29
III Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4 y 5: agua de mar enriquecida (ESW).	30
IV Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la segunda fase de crecimiento de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más FeEDTA con metales traza; 4: ESW sola.	31
V Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la tercera fase de crecimiento de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más FeEDTA con metales traza; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW sola.	32
VI Tasa de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempo de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> mencionadas en el texto para los cultivos en Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo y 3: ESW sola.	36
VII Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de	

Phaeodactylum tricornutum a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola.

37

VIII Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la segunda fase de crecimiento de Phaeodactylum tricornutum a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola.

38

IX Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Skeletonema menzelii mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer y Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas, 3: ESW más FeEDTA solo, 4: ESW más biodigerido y 5: ESW sola.

42

X Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Skeletonema menzelii a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4 y 5: agua de mar enriquecida (ESW) sola.

44

XI Análisis de varianza no paramétrico de dos vías y prueba de comparaciones múltiples con las mediciones de fluorescencia para la segunda fase de crecimiento de Skeletonema menzelii a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más FeEDTA solo; 4: ESW más biodigerido; 5: ESW sola.

45

XII Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Skeletonema menzelii a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas.

46

XIII Análisis paramétrico de una vía y comparaciones múltiples utilizando las tasas de crecimiento de la segunda fase de crecimiento de Skeletonema menzelii a nivel Fernbach, con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas.

48

- XIV Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Skeletonema costatum mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) sola, 3: ESW más vitaminas, 4: ESW más FeEDTA solo y 5: ESW más FeEDTA con metales traza. 51
- XV Análisis de varianza no paramétrico de dos vías y prueba de comparaciones múltiples con las medidas de fluorescencia para la fase de crecimiento de Skeletonema costatum a nivel Erlenmeyer (primer experimento), con los siguientes medios de cultivo: 1: Medio control "f"; 2: Agua de mar enriquecida (ESW) sola; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW más FeEDTA con metales traza. 52
- XVI Análisis no paramétrico de dos vías y prueba de comparaciones múltiples con las medidas de fluorescencia para la fase de crecimiento de Skeletonema costatum a nivel Erlenmeyer (segundo experimento), con los siguientes medios de cultivo: 1: Medio control "f"; 2: Agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW sola. 55
- XVII Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Chaetoceros sp. mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer y Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo, 3: ESW más vitaminas y 4: ESW sola. 59
- XVIII Análisis paramétrico de una vía y comparaciones múltiples utilizando las tasas de crecimiento de la fase exponencial de Chaetoceros sp. a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más nutrientes. 61
- XIX Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento exponencial de Chaetoceros sp. a nivel Fernbach, con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW sola. 62

- XX Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Isochrysis sp. mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer y Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA con metales traza, 3: ESW más vitaminas, 4: ESW más FeEDTA solo y 5: ESW sola. 67
- XXI Análisis paramétrico de una vía y comparaciones múltiples utilizando las tasas de crecimiento de la fase exponencial de Isochrysis sp. a nivel Erlenmeyer, con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA con metales traza; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW sola. 68
- XXII Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Isochrysis sp. a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2 y 3: agua de mar enriquecida (ESW) sola. 69
- XXIII Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la segunda fase de crecimiento de Isochrysis sp. a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola. 71
- XXIV Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Pavlova lutheri mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer y Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas, 3: ESW más nutrientes, 4: ESW sola y 5: ESW más FeEDTA solo. 74
- XXV Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento inicial de Pavlova lutheri a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4,5: agua de mar enriquecida (ESW). 75
- XXVI Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento final de Pavlova lutheri a nivel Erlenmeyer con los siguientes

medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más nutrientes; 4: ESW sola; 5: ESW más FeEDTA solo.	76
XXVII Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento inicial de <u>Pavlova lutheri</u> a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3: agua de mar enriquecida (ESW).	79
XXVIII Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento final de <u>Pavlova lutheri</u> a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más nutrientes.	80
XXIX Tasa de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempo de generación promedio (TG) de la fase de crecimiento de <u>Nannochloris</u> sp. en el cultivo a nivel Erlenmeyer, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f", 2, 3, 4 y 5: agua de mar enriquecida (ESW).	84
XXX Valores promedio (A) y comparación de medias muestrales (B) de biomasa, expresada en unidades de fluorescencia al final de la fase de crecimiento exponencial, de <u>Nannochloris</u> sp. A: indica antes y D: después de sonicar, en cuatro concentraciones diferentes de salinidad a nivel Erlenmeyer, con medio "f".	85
XXXI Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento exponencial de <u>Nannochloris</u> sp. a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4, y 5: agua de mar enriquecida (ESW).	88
XXXII Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de <u>Tetraselmis suecica</u> mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas, 3: ESW más FeEDTA solo, 4: ESW sola, 5: ESW más FeEDTA con metales traza y 6: ESW más nutrientes.	91
XXXIII Análisis paramétrico de una vía y comparaciones	

múltiples utilizando las tasas de crecimiento de la fase exponencial de Tetraselmis suecica a nivel Erlenmeyer (primer experimento), con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más FeEDTA solo; 4: ESW sola; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

94

XXXIV Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Tetraselmis suecica a nivel Erlenmeyer (segundo experimento) con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4 y 5: agua de mar enriquecida (ESW) sola.

95

XXXV Análisis no paramétrico de dos vías y prueba de comparaciones múltiples, utilizando las tasas de crecimiento de la segunda fase de crecimiento de Tetraselmis suecica a nivel Erlenmeyer (segundo experimento) con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) sola; 3: ESW más nutrientes; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

96

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Diferentes etapas de la curva de crecimiento para microalgas cultivadas en un volumen limitado. (1) Fase de acondicionamiento; (2) Fase exponencial; (3) Fase de declinamiento relativo del crecimiento; (4) Fase estacionaria; (5) Fase de muerte (de Fogg y Thake, 1987).	5
2	Curvas de crecimiento hipotéticas con tres medios de cultivos diferentes. Los medios 1 y 2 son inicialmente iguales, y superiores al medio 3, pero el 2 resulta limitante después de la fase inicial.	23
3	Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> . 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más FeEDTA con metales traza; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW sola.	28
4	Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> . 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecido (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola.	34
5	Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de <u>Skeletonema menzeli</u> . 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más FeEDTA solo; 4: ESW más biodigerido; 5: ESW sola.	40
6	Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de <u>Skeletonema menzeli</u> . 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas.	41
7	Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (primer experimento) de <u>Skeletonema costatum</u> . 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) sola; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.	50
8	Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (segundo experimento) de <u>Skeletonema costatum</u> . 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW sola.	54

- 9 Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de Chaetoceros sp. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más nutrientes. 57
- 10 Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de Chaetoceros sp. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW sola. 58
- 11 Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de Isochrysis sp. 1: medio control "f" ; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA con metales traza; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW sola. 64
- 12 Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de Isochrysis sp. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola. 66
- 13 Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de Pavlova lutheri. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más nutrientes; 4: ESW sola; 5: ESW más FeEDTA solo. 73
- 14 Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de Pavlova lutheri. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más nutrientes. 78
- 15 Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (primer experimento) de Nannochloris sp. en concentraciones de salinidad de: 0, 8, 16 y 24 p.p.t. (1, 2, 3 y 4 respectivamente). 83
- 16 Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (segundo experimento) de Nannochloris sp. 1: medio control "f"; 2, 3, 4, y 5: agua de mar enriquecida (ESW) sola. 87
- 17 Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (primer experimento) de Tetraselmis suecica. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más FeEDTA solo; 4: ESW sola; 5: ESW más FeEDTA con metales traza. 90
- 18 Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (segundo experimento) de Tetraselmis suecica. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) sola; 3: ESW más nutrientes; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW más FeEDTA con metales traza. 93
- 19 Phaeodactylum tricornutum Bohlin. 99

20	<u>Skeletonema</u> <u>menzelii</u> Guillard, Carpenter y Reimann.	102
21	<u>Skeletonema</u> <u>costatum</u> Cleve.	105
22	<u>Chaetoceros</u> sp.	107
23	<u>Isochrysis</u> sp.	109
24	<u>Pavlova</u> <u>lutheri</u> (Droop) Green.	112
25	<u>Nannochloris</u> sp.	115
26	<u>Tetraselmis</u> <u>suecica</u> (Lylin) Butch.	118

RESUMEN

Se diseñaron y seleccionaron medios alternativos para optimizar el crecimiento de las microalgas: Phaeodactylum tricornutum, Skeletonema menzelii, Skeletonema costatum, Chaetoceros sp., Isochrysis sp., Pavlova lutheri, Nannochloris sp. y Tetraselmis suecica, en un sistema estático a nivel Erlenmeyer y Fernbach, utilizando para la preparación de medios agua de mar del sistema recirculante del laboratorio del Departamento de Acuicultura del C.I.C.E.S.E., empleando como control al medio "f" y como base de los medios simplificados al medio de agua de mar enriquecida ESW.

Para seleccionar el medio óptimo para cada especie se fue enriqueciendo al medio ESW considerando las necesidades nutricionales de cada especie y comparando los resultados con los obtenidos en el medio control, para cada experimento. Se encontró que las microalgas que mejor se prestan para ser cultivadas en medios simplificados son P. tricornutum, S. menzelii, T. suecica y Nannochloris sp. y en menor medida Isochrysis sp. y P. lutheri. Chaetoceros sp. y S. costatum., debido a sus altos requerimientos nutricionales, no se prestan a ser crecidos en medios alternativos.

En general la variante del medio simplificado que mostró mejores tasas de crecimiento y biomاسas finales fue adicionando FeEDTA, lo cual indica una posible alta concentración de metales libres en el sistema cerrado del laboratorio de Acuicultura. Esto no quiere decir que el uso de los medios alternativos que ahí funcionaron para cada una de las especies estudiadas pueda dar resultados similares en lugares geográficos diferentes ó en diferentes tipos de sistemas de abastecimiento de agua, ya que para cada lugar varían las condiciones del sistema de cultivo que pueden favorecer ó no el crecimiento de las microalgas.

ABSTRACT

Alternative mediums were selected to optimize the growth of the following microalgae: Phaeodactylum tricornutum, Skeletonema menzelii, Skeletonema costatum, Chaetoceros sp., Isochrysis sp., Pavlova lutheri, Nannochloris sp. and Tetraselmis suecica, in Erlenmeyer (100 mL) and Fernbach (2L) batch cultures, using seawater from the Aquaculture Laboratory recycling system at C.I.C.E.S.E. for the preparation of the mediums. The "f" medium was the control and the enriched seawater ESW was the primary source for the simplified mediums.

The optimum medium selection for each microalga was, through the enrichment of ESW, considering the species nutritional requirements, and comparing the results with those of the control. It was seen that the microalgae which better adjust to the simplified mediums are P. tricornutum, S. costatum, T. suecica y Nannochloris sp. and secondly Isochrysis sp. and P. lutheri, while the other ones (Chaetoceros sp. and S. costatum), due to their high nutritional requirements, are not eligible to be grown on these mediums.

In general, the simplified medium variations which showed the best growth rates and biomass were those with added FeEDTA, which indicates a possible high concentration of free metal ions in the laboratory system. However, this does not mean that using the different alternative mediums which worked out with the different species will give similar results in different places or systems, due to the variable conditions of each place, which could favor or not microalgae growth.

DISEÑO Y SELECCIÓN DE MEDIOS ALTERNATIVOS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

I.-INTRODUCCIÓN

Según las definiciones más recientes, que consideran a las cianofíceas como organismos relacionados más con las bacterias que con las algas (Margulis, 1982). Microalgas es un término genérico que define a todos los organismos unicelulares provistos de un núcleo y de pigmentos fotosintéticos. Estos se encuentran actualmente clasificados en muchas Clases, cuyo número varía según los autores. Taylor (1980) por ejemplo, describe 11 Clases de microalgas, mientras que Margulis op. cit., considera que este número tendría que aumentarse a 15. Independientemente de su número, entre estas Clases se destacan las Bacillariophyceae (Diatomeas), las Dinophyceae (Dinoflagelados) y las Haptophyceae (Cocolitofóridos). Son los organismos más abundantes en todo tipo de ambiente acuático y son los principales productores primarios de materia orgánica, que sintetizan a partir de sustancias inorgánicas utilizando energía luminosa. Esta energía es transformada en energía química a través de la fotosíntesis y almacenada en las sustancias orgánicas producidas. El total de carbono fijado mundialmente a través de la fotosíntesis es de aproximadamente 8×10^{10} toneladas por año, 40% de las cuales se debe a la

actividad de las microalgas (Soeder, 1986).

El cultivo de microalgas tiene una larga historia que se inició cuando Beijerinck (1890, citado en Soeder, op. cit.) describió la metodología para el cultivo de microalgas de agua dulce e inició una nueva "moda" en la ciencia botánica. En los años siguientes, los cultivos de microalgas se emplearon sobre todo para estudios de fisiología y de ecofisiología.

Allen y Nelson (1910) describieron algunos métodos para el cultivo de microalgas marinas. Estas técnicas están descritas y mejoradas en el manual de Pringsheim (1946) que presentó el texto más ampliamente utilizado en los laboratorios de microalgas hasta la publicación en años más recientes del manual editado por Stein (1973). En general, hasta los años 40's, los cultivos de microalgas se utilizaron sobre todo para estudios de laboratorio. Fue en Alemania con Harder y Von Witsch (1942, citado en Soeder, op. cit.) en donde se inició la idea de que el cultivo de estos organismos podría tener una aplicación práctica, para la producción de alimento para el consumo humano y/o animal. Técnicas para el cultivo masivo para este fin o para la producción de sustancias farmacéuticas fueron perfeccionadas en los años siguientes (Burlew, 1953, citado en Soeder, op. cit.).

Estas técnicas resultaron demasiado refinadas y costosas

sobre todo por la necesidad del suministro artificial de energía luminosa. Por lo anterior, se plantearon técnicas alternativas de cultivo al aire libre, utilizando la luz natural. En la actualidad estas técnicas se emplean para la producción comercial de compuestos químicos y farmacéuticos como β -caroteno y glicerol (obtenidos de Dunaliella salina), de polisacáridos y ácido araquidónico entre otros ácidos esenciales obtenidos de Porphyridium sp., etc. Otro empleo es la extracción de biliproteínas para uso como colorantes alimenticios y de cosméticos, utilizando la cianobacteria Spirulina platensis que también se emplea como fuente de proteínas y de vitaminas en dietas naturistas (Borowitzka, 1986).

También se está investigando la posibilidad de utilizar cultivos de microalgas en vehículos cósmicos y submarinos como medio de rehabilitación del aire y tratamiento de desechos (Benoit, 1964, citado en Ukeles, 1965). En muchas áreas sobrepobladas del mundo las microalgas son consideradas como suplemento alimenticio para consumo humano o como alimento para otros animales (Guillard, 1975; Richmond, 1986).

El área donde la utilización de microalgas ha alcanzado mayor auge es la acuicultura, ya que el cultivo de filtroalimentadores marinos bajo condiciones controladas requiere, como fuente principal de alimento, de grandes

cantidades de organismos fitoplanctónicos para acondicionar a los progenitores y para alimentar a los diferentes estadios larvales (Guillard, op. cit.).

Para cultivar microalgas se pueden emplear las técnicas de cultivo estático, semicontinuo o continuo.

La técnica de cultivo estático consiste en inocular con el organismo escogido un volumen dado de medio y permitir que la densidad aumente hasta que un factor se vuelva limitante. A ese punto el cultivo es cosechado y uno nuevo es empezado utilizando como inóculo parte del cultivo viejo o preferentemente uno nuevo (Fogg y Thake, 1987).

El crecimiento de las microalgas en este tipo de cultivo se puede representar graficamente con la curva descrita en la figura 1, y consiste de las siguientes fases:

a) Fase de acondicionamiento: en la cual el número de células no se incrementa ya que los organismos se están aclimatando a las nuevas condiciones de cultivo. La duración de esta etapa depende de la cantidad de inóculo, de su estado fisiológico y del ciclo de vida de la microalga.

b) Fase de crecimiento exponencial: esta fase dura el tiempo necesario para que resulte evidente el efecto de algún

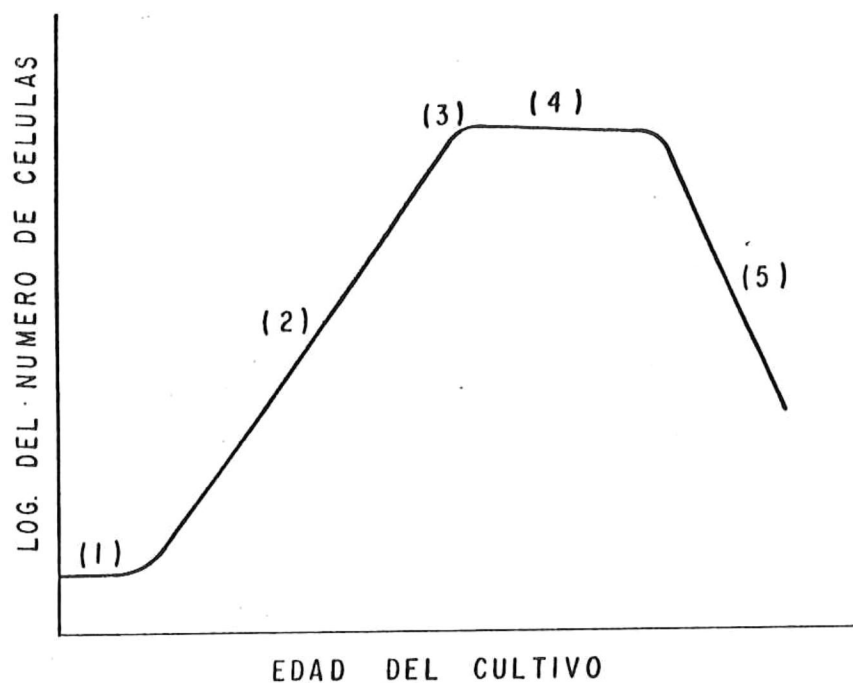


Figura 1. Diferentes etapas de la curva de crecimiento para microalgas cultivadas en un volumen limitado. (1) Fase de acondicionamiento; (2) Fase exponencial; (3) Fase de declinamiento relativo del crecimiento; (4) Fase estacionaria; (5) Fase de muerte (de Fogg y Thake, 1987).

factor limitante. Es la fase en la cual la multiplicación celular es más rápida y el número de organismos incrementa en progresión geométrica.

c) Fase de declinamiento relativo del crecimiento: durante este período disminuye la velocidad de crecimiento; este decremento se debe a un fenómeno incipiente de limitación, que puede deberse a cualquiera de varios factores como la falta de nutrientes o de luz, la calidad de la aireación, etc.

d) Fase estacionaria: es la fase en la cual, debido a la presencia de un factor limitante, el número de células permanece más o menos constante y alcanza su valor máximo.

e) Fase de muerte: en esta etapa el número de células disminuye drásticamente. Su ocurrencia depende de las condiciones del medio y de la especie cultivada.

La fórmula que describe esta curva de crecimiento es:

$$N_t = N_0 \cdot X^{\mu t} \quad (1)$$

en donde N_0 = concentración celular al tiempo t_0 (en días)

N_t = concentración celular al tiempo t (en días)

X = constante

μ = tasa de crecimiento

t = diferencia entre los tiempos t_0 y t ,

que resuelta da la tasa de crecimiento específico (μ) según la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\log_x (N_t / N_0)}{t - t_0} ; \quad (2)$$

de esta se puede calcular el tiempo medio de duplicación (TD), que para la mayoría de las microalgas es igual al tiempo medio de generación (TG), debido a su reproducción que es de tipo binario:

$$TD = \frac{\log_x (2N_0 / N_0)}{\mu} = \frac{\log_x 2}{\mu} \quad (3)$$

Debido al tipo de reproducción antes mencionado, en los años recientes se ha ido generalizando el uso de $X = 2$, por lo cual

$$TD = \frac{\log_2}{\mu} = \frac{1}{\mu} \quad (4)$$

El cultivo continuo, a diferencia del estacionario, se caracteriza por el crecimiento de las microalgas en un medio de características constantes, ya que medio fresco es agregado continuamente, cosechándose a la vez un volumen igual de cultivo (Droop, 1975; Canzonier y Brunetti, 1975).

El cultivo semicontinuo se lleva a cabo removiendo una porción de cultivo a intervalos periódicos y reemplazándola con medio nuevo para obtener el volumen original.

En general, para el cultivo de microalgas en laboratorio se emplean medios con formulaciones complejas, que varían desde las descritas para la preparación de medios completamente definidos, como los propuestos por Provasoli et al. (1957) y Morel et al. (1979), hasta las que utilizan un número elevado de sustancias como enriquecimiento de aguas naturales (Guillard y Ryther, 1962; Walne, 1970).

La utilización de estos medios para la producción masiva de microalgas resultaría demasiado onerosa ya que los reactivos químicos necesarios tienen precios elevados y que para su preparación se requiere de personal y de instrumentos especializados. Debido a esto, se ha intentado elaborar diferentes medios de cultivo basados en agua natural enriquecida con diferentes tipos de productos químicos de bajo costo.

El principal fin de estos intentos es tratar de encontrar un medio de cultivo que sea redituable para la producción de microalgas, cuando se compare con los resultados obtenidos con medios de formulación más compleja. Hasta hoy no se ha logrado el éxito esperado para todas las especies de microalgas o por lo menos para las más útiles en acuicultura, que es el área donde se ha dado mayor importancia a estos medios de cultivo.

II.-ANTECEDENTES

Dunstan y Menzel (1971) y Dunstan y Tenore (1972) trabajaron con cultivos continuos de poblaciones naturales de fitoplancton, utilizando como enriquecimiento aguas residuales secundarias (aguas tratadas primeramente por filtros mecánicos y secundariamente por un filtro biológico). El medio control usado fue el NPF, que es una modificación del medio "f" (Guillard y Ryther, 1962) en el cual se sustituyen los nitratos con sales de amonio, y se utilizan dobles concentraciones de fosfatos, silicatos, vitaminas y metales traza.

De la Cruz y Alfonso (1975) prepararon un medio de cultivo para microalgas basado en la utilización de harinas de pescado y de girasol, levadura de cerveza, nitrato de amonio y superfosfato simple.

Granados-Machuca y Bückle-Ramírez (1984) propusieron un método para cultivar las microalgas Skeletonema costatum Cleve y Pavlova lutheri (Droop) Green, utilizando los nutrientes obtenidos con la descomposición líquida aeróbica de estiércoles de vaca y de gallina en un biodigestor de circuito cerrado, y Paniagua-Michel y Bückle-Ramírez (1984) experimentaron el cultivo de las mismas especies utilizando biodigeridos de Macrocystis pyrifera y Zostera marina. Finalmente Paniagua-Michel et al. (1987) conprobaron la efectividad de un

medio de cultivo enriquecido con una mezcla de los extractos orgánicos producidos con la biodigestión aeróbica de estiercoles de vaca y de gallina, y de la macroalga Macrocystis pyrifera, para cultivar masivamente la microalga Pavlova lutheri.

González-Rodríguez y Maestrini (1984) trabajaron con algunos fertilizantes agrícolas de Brasil y de Francia como nutrientes y compararon el crecimiento con el medio de cultivo Conway (Walne, 1970). Geldenhuys et al. (1987) trabajaron con fertilizantes crudos (urea y superfosfato) para el cultivo masivo de Chlorella sp. y Scenedesmus sp. en un sistema abierto, y Voltolina (1987) empleó una mezcla de nitrato de amonio y de fosfatos y silicatos de grado industrial para el cultivo de varias especies de diatomeas bentónicas.

Los resultados de los anteriores trabajos indican la factibilidad de utilizar medios simplificados para el cultivo de microalgas, y que con éstos se pueden alcanzar densidades algales y tasas de crecimiento equivalentes a las obtenidas con medios más complejos. Sin embargo, en muchos de los trabajos mencionados resulta claro que los medios simplificados no tienen la misma efectividad para todas las especies ensayadas.

Este trabajo hace parte de una serie de estudios que se

han venido realizando en el laboratorio de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, sobre bioquímica y aspectos fisiológicos de algunas especies de microalgas de interés actual o potencial en acuicultura. En las discusiones se hablará brevemente sobre las características generales de cada una de las cepas estudiadas, subrayando su importancia real o potencial en la acuicultura y los motivos que estuvieron a la base de su selección para este estudio.

III.-OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el diseño y la selección de medios alternativos para diferentes especies de microalgas, tomando en cuenta que los productos utilizados tienen que ser de fácil obtención y de bajo costo y que el medio alternativo tiene que proporcionar todos los nutrientes necesarios para un crecimiento normal, o sea comparable al crecimiento obtenido con un medio complejo empleado como control.

IV.-MATERIALES Y METODOS

IV.I. Cepas y su mantenimiento:

Las siguientes especies, que se utilizaron para este estudio, fueron seleccionadas del cepario del Departamento de Acuicultura de C.I.C.E.S.E., tomando en cuenta sus altas tasas de crecimiento y/o su importancia en la producción masiva de alimento para el mantenimiento de organismos filtroalimentadores:

División, especie y cepa original	Origen	Cepario C.I.C.E.S.E.
--------------------------------------	--------	-------------------------

Bacillariophyta

<u>Phaeodactylum tricornutum</u> (PHAEO)	N.M.F.S.	PH-T-1
---	----------	--------

<u>Skeletonema menzelii</u>	C.I.C.E.S.E.	—
<u>Skeletonema costatum</u> (SKEL)	C.C.M.P.	SK-C-2

<u>Chaetoceros</u> sp.	C.I.C.E.S.E.	CH-X-3
------------------------	--------------	--------

Prymnesiophyta

<u>Isochrysis</u> sp. (T-ISO)	N.M.F.S.	IS-X-1
----------------------------------	----------	--------

Pavlova lutheri

N.M.F.S.

PA-L-1

(MONO)

Chlorophyta

Nannochloris sp.

N.M.F.S.

NA-X-1

Tetraselmis suecica

N.M.F.S.

TE-S-1

Los acrónimos utilizados anteriormente indican las siguientes instituciones:

N.M.F.S.: National Marine Fisheries Service, La Jolla, CA, Estados Unidos de América.

C.I.C.E.S.E.: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, B.C., México.

C.C.M.P.: Center for Culture of Marine Phytoplankton, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, W. Boothbay Harbor, MA, Estados Unidos de América.

Las cepas se mantuvieron en tubos de ensayo de 20 mL con 10 mL de medio "f" en una cámara climática a luz y temperatura aproximadamente constantes (3 Klux y 15°C) y se agitaron manualmente todos los días para mantenerlos en suspensión. Cada 15 días se examinaron todos los tubos al microscopio para averiguar su estado y la ausencia de contaminantes, y se escogieron los que estaban en mejores condiciones, para hacer diluciones seriadas que variaron, según la especie y las

condiciones del cultivo, entre $1:10^2$ y $1:10^4$.

IV.II. Fase experimental:

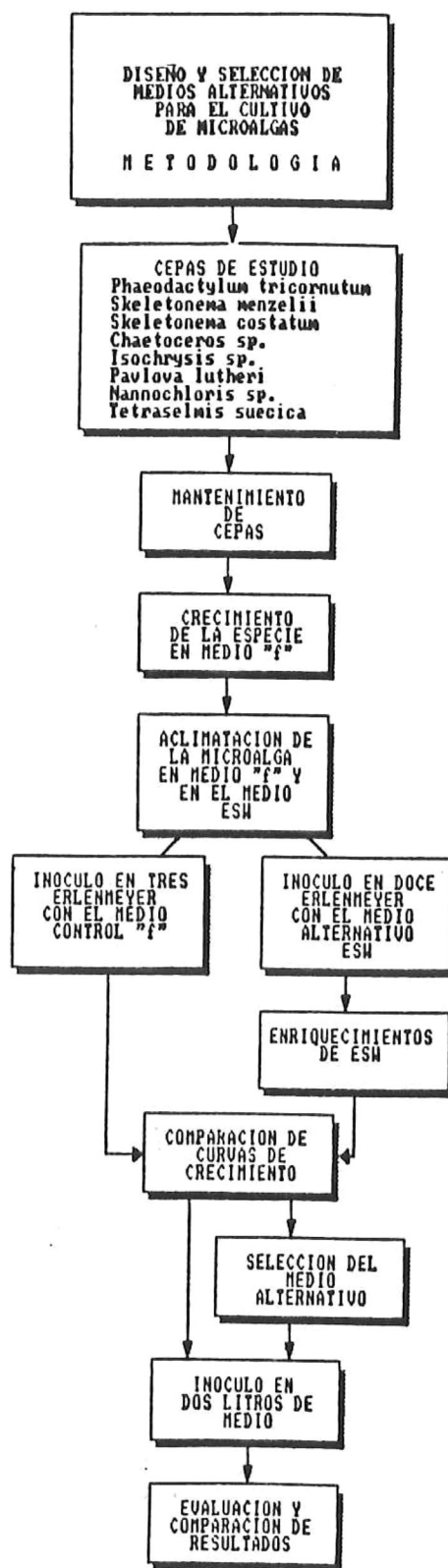
La eficiencia de los diferentes medios probados se comparó utilizando cultivos estáticos, siguiendo los pasos indicados esquemáticamente en la siguiente página.

Para la realización del experimento se tomaron las precauciones necesarias para minimizar la contaminación de los medios de cultivo, manteniendo limpia el área de trabajo y esterilizando los medios de cultivo antes de inocularlos. La esterilización de los medios de cultivo como la de las soluciones madre para la preparación de los medios se llevó a cabo en una autoclave marca Steroclave Electric 25X a una temperatura de 121°C y 1.05 Kg/cm^2 de presión durante 30 minutos.

Los pasos que se siguieron en este experimento fueron:

a) Escoger la especie a estudiar.

b) Inocular un Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio control "f" (Guillard y Ryther, 1962) que se dejó crecer hasta obtener una alta densidad de la cepa de trabajo. La salinidad del agua de mar utilizada se mantuvo aproximadamente constante,



a 32.5 ± 0.5 partes por mil (p.p.t.) y los cultivos se hicieron en condiciones de luz y temperatura constantes e iguales para todas las cepas (temperatura = $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$; luz proveida por dos tubos fluorescentes SYLVANIA, 40W, luz fría, aprox. 3500 lux).

c) Con el cultivo anterior se inocularon algunos Erlenmeyer, con 100 mL de medio "f" y otros con el medio alternativo ESW (Voltolina, 1987). Lo que se pretendía con ésto era obtener inóculos de la misma edad y aclimatados a ambos medios, sobre todo para evitar que, al crecer en un medio rico en nutrientes como es el "f", acumularan reservas de sustancias ausentes en los medios alternativos.

d) Cuando estos cultivos alcanzaron una suficiente densidad, se preparó una muestra para medir su fluorescencia con un fluorímetro marca Turner, Mod. 111, que se utilizó para medir indirectamente la concentración de las microalgas en los cultivos. Este instrumento consiste en una fuente de luz de onda corta (luz azul) que es absorbida por el núcleo porfirínico de la clorofila a. Este pasa a un estado de excitación y emite como fluorescencia la energía absorbida en forma de luz de mayor longitud de onda (luz roja). Esta es recibida por una fotocelda que produce una corriente eléctrica de intensidad proporcional a la fluorescencia recibida, dando por lo tanto una medida cuantitativa de la cantidad de

clorofila presente. El dato obtenido se utilizó para decidir el volumen de los inóculos, ya que se intentó obtener densidades celulares iniciales iguales en los Erlenmeyer con el medio control "f" y con el medio alternativo ESW.

e) Una vez decidido el volumen del inóculo, se inocularon con éste tres Erlenmeyer con 100 mL del medio control, y doce con el mismo volumen del medio alternativo, con la finalidad de comparar el crecimiento inicial en los dos medios y, de notarse diferencias, subdividir los cultivos con el medio alternativo en grupos de tres, y probar diferentes enriquecimientos para individuar los factores limitantes para el crecimiento.

f) Posteriormente, se volvió a medir la fluorescencia de los Erlenmeyer inoculados para obtener el dato inicial de biomasa. También se fijó la primera muestra con Lugol para su conteo con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad.

g) Se llevaron a cabo lecturas diarias de fluorescencia hasta llegar a la fase estacionaria. Al final del experimento también se fijó la última muestra para su conteo. Los números celulares inicial y final se compararon con los valores relativos de fluorescencia para cada una de las especies estudiadas, para evaluar los respectivos valores de biomasa celular.

h) Con los datos de fluorescencia se calcularon los parámetros poblacionales anteriormente mencionados.

i) Posteriormente, con el dato final de fluorescencia se calculó el volumen de inóculo para la fase sucesiva, que consistió en cultivos de volumen superior (Fernbach: 2 litros). Esto sirvió a la vez para asegurarse que las microalgas ya no tenían reservas celulares de nutrientes, que varias microalgas pueden acumular, y utilizar en condiciones de limitación durante un número considerable de generaciones (Fogg y Thake, 1987), y así obtener datos adicionales sobre el medio alternativo. Además, con este volumen se trató de verificar el crecimiento de la microalga en condiciones de cultivo más cercanas a las de un cultivo masivo (Paniagua-Michel et al., 1987). A este nivel se repitió el mismo procedimiento que con los Erlenmeyer: medio control "f" por triplicado y dos triplicados, uno con el medio que dió los mejores resultados en la fase anterior y uno con el medio más sencillo ESW.

j) Se repitió el inciso (h), para seguidamente hacer el análisis de los datos y la comparación con el medio control.

Las composiciones químicas del medio control "f" y del medio alternativo ESW se dan en la tabla I.

	Medio control " f "	Medio alternativo ESW
NaNO_3	1.760 mM	-
NH_4NO_3	-	0.250 mM
Na_2HPO_4	-	0.030 mM
NaH_2PO_4	0.072 mM	-
Na_2SiO_3	0.108 mM	0.050 mM
Cianocobalamina	1.000 $\mu\text{g/l}$	-
Biotina	1.000 $\mu\text{g/l}$	-
Tiamina HCL	200.000 $\mu\text{g/l}$	-
Metales traza:		
Zinc	0.160 μM	-
Manganeso	0.180 μM	-
Molibdeno	0.060 μM	-
Cobalto	0.100 μM	-
Cobre	0.080 μM	-
Hierro	23.400 μM	-
EDTA	23.400 μM	-
Tris	1.320 μM	-

Tabla I. Concentración de nutrientes en un litro de medio control "f" y de medio simplificado ESW. Los datos están calculados basándose en Voltolina (1987) y McLachlan (1973).

Es importante señalar que el medio alternativo de agua de mar enriquecida ESW cuenta con dos fuentes de nitrógeno que lo hacen diferente de muchos de los demás medios. Las dos fuentes de nitrógeno son el amonio, que sería el primero que utilizaría la microalga para la síntesis de aminoácidos y a su vez de proteínas (Votolina, op.cit.). Tomando en cuenta que el amonio en ambiente básico puede reducirse a amoníaco, que es tóxico, se agrega como segunda fuente nitrato, que la microalga utilizará en segunda instancia si el nitrógeno llegara a ser limitante.

IV.III. Análisis estadístico de los resultados:

a) Selección de datos.

Los datos obtenidos se graficaron para obtener las curvas de crecimiento, que se utilizaron para identificar la fase de crecimiento exponencial para cada una de las especies. Con la finalidad de identificar eventuales fenómenos de limitación inicial, se analizaron primeramente los datos de la fase exponencial, tomando en consideración un igual número de días para todos los medios de cultivo. En segunda instancia se analizaron los datos de los días posteriores, hasta finalizarse el crecimiento en por lo menos uno de los cultivos. Esto permitió atribuir eventuales diferencias de la biomasa obtenida en ese punto a fenómenos incipientes de limitación, como se ejemplifica en la figura 2.

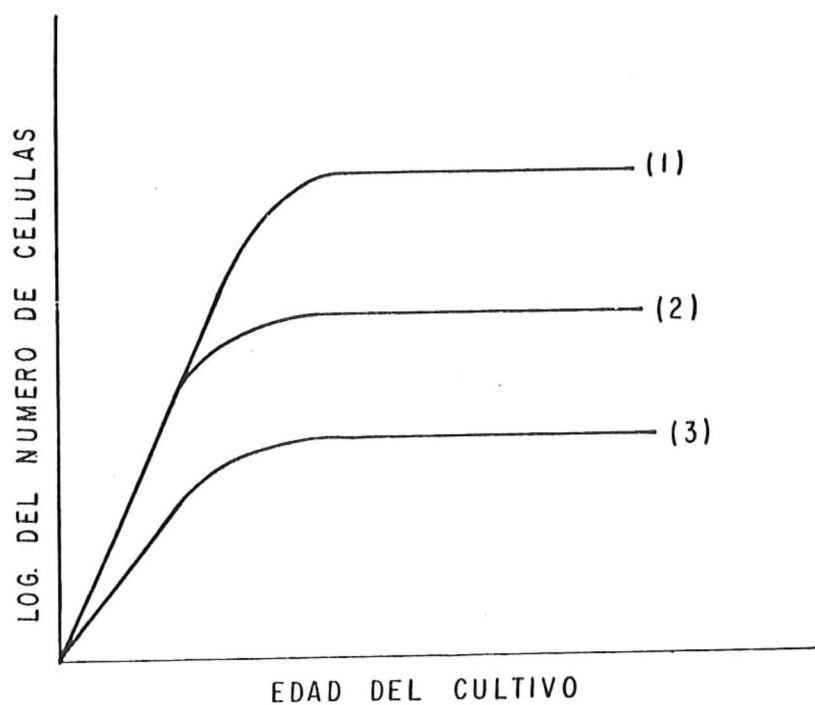


Figura 2. Curvas de crecimiento hipotéticas con tres medios de cultivos diferentes. Los medios 1 y 2 son inicialmente iguales, y superiores al medio 3, pero el 2 resulta limitante después de la fase inicial.

b).- Análisis estadístico:

Los datos obtenidos por cada una de las especies se analizaron con los siguientes métodos estadísticos: se empleó el análisis de covarianza, si los datos se ajustaban a las hipótesis que fundamentan dicho análisis: la prueba de validez estadística para un modelo de regresión lineal, efectuada con las densidades celulares y el tiempo, las pruebas de Bartlett y el ajuste a la distribución normal con los residuos derivados de la regresión entre las densidades celulares y el tiempo (Snedecor y Cochran, 1977). En este caso se considera (a) a la cantidad de inóculo y (b) la velocidad de crecimiento. Si estas condiciones no eran aceptadas, se procedió al análisis de varianza de dos vías paramétrico (Sokal y Rohlf, 1979), ó no paramétrico (Wilson, 1956) según fuera el caso, empleando los datos originales de fluorescencia, ó bien se utilizó el análisis de varianza de una vía de los valores promedio de la tasa de crecimiento calculados por cada uno de los tres matraces de cada medio, si ésto pareciera más conveniente.

En caso de detectarse diferencias significativas, se empleó la prueba a posteriori de Student Newman Keuls (S.N.K.) (Snedecor y Cochran, op. cit.), en sus versiones paramétrica ó no paramétrica según el caso, para identificar los medios o grupos de medios diferentes.

Eventuales desviaciones a este tratamiento se señalan en los apartados relativos a los resultados de cada especie.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el Centro de computo del C.I.C.E.S.E., empleando los paquetes estadísticos ESIMSL y PECS modificados y/o implementados por el Dr. Chagoya, para el sistema PRIME-400 de ese Centro.

En las tablas, los niveles de aceptación y/o de significatividad de 0.05, 0.01 y 0.001 se indican con uno, dos ó tres asteriscos respectivamente. NS indica rechazo por $\alpha = 0.05$ (Sokal y Rohlf, 1979).

V.- RESULTADOS

Phaeodactylum tricornutum

(PH-T-1)

En el primer experimento se emplearon tres cultivos en Erlenmeyer con medio control "f" y doce con agua de mar enriquecida (ESW) que, después de un día de retraso, crecieron exponencialmente durante tres días. Las medidas de fluorescencia fueron más altas en los cultivos con medio simplificado que en el medio control. Esta fue la primera etapa elegida para el análisis estadístico.

Después de este período los matraces del medio ESW se dividieron en grupos de tres que se enriquecieron en la forma siguiente: tres con una cantidad de nutrientes del ESW igual a la del inicial; tres con FeEDTA más la mezcla de metales traza en concentración equivalente a la del medio control; seis sin enriquecimiento posterior que sirvieron como control. Para esta cepa no se utilizó la mezcla de vitaminas ya que en un experimento preliminar que se realizó con otros fines, el enriquecimiento con vitaminas no resultó efectivo. La fluorescencia en el medio control pareció aumentar más rápidamente que en los medios simplificados (ésta se denominó segunda fase de crecimiento). Debido a que en el transcurso de estos seis días no se observaron diferencias en los medios de

ESW enriquecidos y en los seis con ESW sola, a este punto se eligieron al azar tres de los matraces con ESW sola y se les agregó FeEDTA, sin la mezcla de metales traza, en concentración equivalente al medio "f", con la finalidad de identificar eventuales problemas de toxicidad por metales en el agua de mar del sistema cerrado del C.I.C.E.S.E. (tercera fase de crecimiento).

Las curvas de crecimiento se ilustran en la figura 3, los promedios de las tasas de crecimiento, los tiempos de generación para cada fase y los valores de biomasa inicial y final del experimento se dan en la tabla II y los resultados de las pruebas estadísticas se resumen en las tablas III, IV y V.

La tabla III demuestra que la fase inicial de crecimiento Phaeodactylum tricornutum aceptó el medio alternativo sencillo, en el cual creció sin que fuera posible demostrar diferencias significativas entre éste y el medio control.

Para la segunda fase de crecimiento se comparó el medio control con los medios alternativos, menos los datos de los tres matraces empleados más tarde para el enriquecimiento con FeEDTA solo. Otra vez, no fue posible demostrar diferencias significativas (tabla IV).

En la tercera fase, al comparar los cinco tratamientos, se

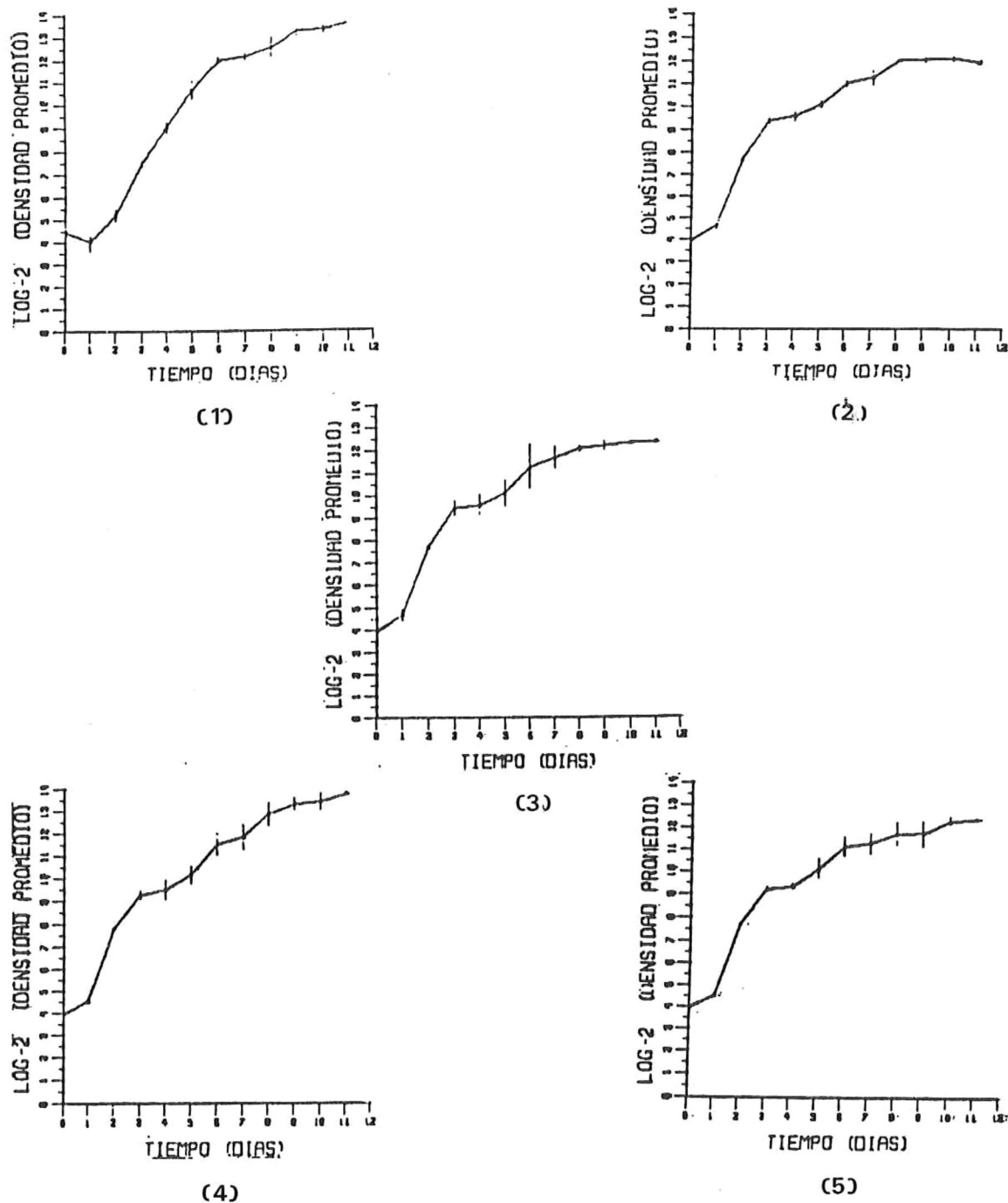


Figura 3. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de *Phaeodactylum tricornutum*. 1: medio control "f"; 2: agua de mar, enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más FeEDTA con metales traza; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW sola.

Tabla II. Tasa de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempo de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* mencionadas en el texto para los cultivos en Erlenmeyer, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes, 3: ESW más FeEDTA con metales traza, 4: ESW más FeEDTA solo y 5: ESW sola.

MEDIOS DE CULTIVO

	1	2	3	4	5
1ra. Fase:					
μ : 1.73(0.77)	2.37(1.00)	2.38(0.92)	2.33(1.29)	2.34(1.26)	
TG: 0.64	0.47	0.45	0.50	0.50	
2da. Fase:					
μ : 0.87(0.70)	0.60(0.29)	0.62(0.36)		0.60(0.39)	
TG: 2.27	2.13	1.93		2.82	
3ra. Fase:					
μ : 0.35(0.28)	0.28(0.33)	0.25(0.17)	0.48(0.39)	0.29(0.25)	
TG: 5.44	10.44	5.85	3.88	17.00	
Fluorescencia:					
I: 22	16	16	16	16	
F: 13433	3966	5266	14565	5633	
Num. Cel./ mL:					
I: 16.9×10^3	19.4×10^3	19.4×10^3	19.4×10^3	19.4×10^3	
F: 10.4×10^6	5.4×10^6	9.1×10^6	12.0×10^6	9.1×10^6	

Tabla III. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Phaeodactylum tricornutum a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4 y 5: agua de mar enriquecida (ESW).

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
INDIVIDUALMENTE:					
N	9	9	9	9	9
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.9234*	0.9734*	0.9384*	0.9405*	0.9982*
GLOBALMENTE:					
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			0.9339*		
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)			1.0000*		
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)			0.3145*		

Tabla IV. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la segunda fase de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más FeEDTA con metales traza; 4: ESW sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO			
	1	2	3	4
INDIVIDUALMENTE:				
N	15	15	15	15
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.3954*	0.6366*	0.1143*	0.2980*
GLOBALMENTE:				
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.2915*		
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.7290*		
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.4646*		

Tabla V. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la tercera fase de crecimiento de Phaeodactylum tricornutum a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más FeEDTA con metales traza; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
INDIVIDUALMENTE:					
N	15	15	15	15	15
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.2022*	0.5185*	0.2052*	0.7665*	0.0438**
GLOBALMENTE:					
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS				0.0615*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)				0.8224*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)				0.0000 NS	

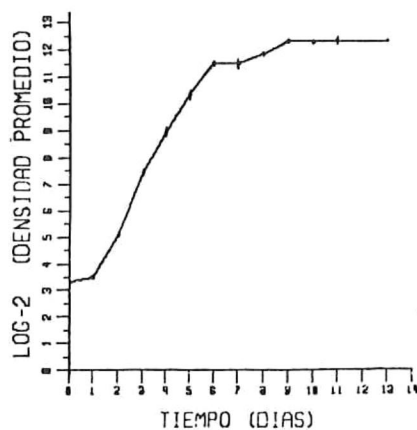
encontraron diferencias significativas sólo en la homogeneidad de ordenadas al origen, pero la prueba de comparación de ordenadas por pares no identificó diferencias significativas (tabla V).

Las biomاسas finales medidas como fluorescencia resultaron moderadamente superiores en el medio "f" y en la variante ESW más FeEDTA solo, motivo por el cual estos, más el ESW sola, se emplearon para el segundo experimento a nivel Fernbach.

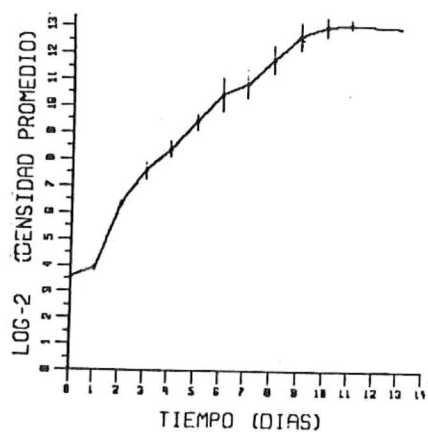
Para iniciar el experimento a nivel superior se inocularon tres Fernbach con células de dos de los primeros Erlenmeyer de medio "f" previamente centrifugadas y lavadas con agua de mar estéril y seis Fernbach con ESW que fueron inoculados con los cultivos de ESW sola.

Debido a que las células de los inóculos provenían de cultivos en fase estacionaria, que tuvieron que aclimatarse a las nuevas condiciones, se notó un crecimiento lento durante el primer día. El segundo día, tres matraces de ESW sola se enriquecieron con FeEDTA, para observar si tal enriquecimiento causara cambios en las pendientes de las curvas de crecimiento que se ilustran en la figura 4.

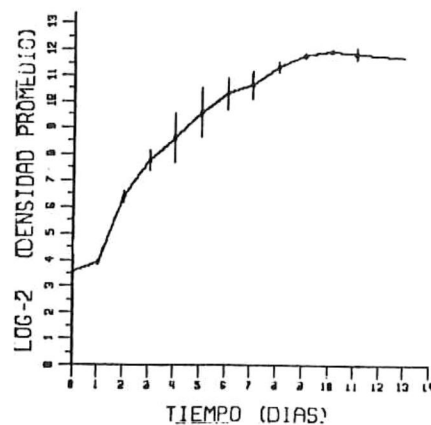
Los promedios de la tasa de crecimiento, los tiempos de generación y los valores de biomasa inicial y final del



(C1)



(C2)



(C3)

Figura 4. Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de *Phaeodactylum tricornutum*. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecido (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola.

experimento se dan en la tabla VI.

Para el análisis estadístico se dividió el experimento en dos fases.

La primera fase consistió en comparar la fase de crecimiento exponencial de los días 2 al 6 para los tres tratamientos, que no resultaron significativamente diferentes, y posteriormente de los días 2 al 9 para comparar la cantidad de biomasa producida (tablas VII y VIII).

La biomasa medida como fluorescencia del medio control y de la variante FeEDTA sin la mezcla de metales traza fueron análogas y un poco más altas que la obtenida en ESW sola, pero tal diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Tabla VI. Tasa de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempo de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Phaeodactylum tricornutum mencionadas en el texto para los cultivos en Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo y 3: ESW sola.

MEDIOS DE CULTIVO

1	2	3
1ra. Fase:		
μ : 1.61(0.53)	1.02(0.18)	0.97(0.26)
TG: 0.67	1.01	1.08
2da. Fase:		
μ : 0.81(0.63)	0.83(0.25)	0.67(0.24)
TG:15.33	1.36	1.71
Fluorescencia:		
I: 10	12	12
F: 5166	7733	3233
Num. Cel./ mL:		
I: 15.4×10^3	14.3×10^3	14.3×10^3
F: 8.0×10^6	8.5×10^6	7.0×10^6

Tabla VII. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Phaeodactylum tricornutum a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
INDIVIDUALMENTE:			
N	15	15	15
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.7152*	0.6105*	0.4557*
GLOBALMENTE:			
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.0513*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.8837*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.9180*	

Tabla VIII. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la segunda fase de crecimiento de Phaeodactylum tricornutum a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
INDIVIDUALMENTE:			
N	21	21	21
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.3201*	0.3284*	0.4786*
GLOBALMENTE:			
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.3649*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.6281*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.4068*	

Skeletonema menzelii

Para probar la adaptabilidad de esta cepa a los diferentes medios a ensayar se inocularon tres matraces con medio control "f" y doce con ESW. Debido al rapido crecimiento observado con esta cepa, las lecturas de fluorescencia se realizaron a intervalos más cortos de los empleados para todas las demás especies, como se puede notar en la figura 5, relativa a este experimento. A las cincuenta horas desde el momento del inóculo, los Erlenmeyer con medio simplificado se enriquecieron de la forma siguiente: tres fueron adicionados con la mezcla de vitaminas del medio "f", tres con FeEDTA solo, tres con la mezcla de biodigerido empleada por Sánchez Saavedra (1989), en concentración equivalente a 20mL/L de medio para que sirvieran a la vez como fuente de vitaminas y para la quelación del medio, y los últimos tres matraces se dejaron como control, sin enriquecimiento.

Los resultados obtenidos indicaron una aparente superioridad de los dos primeros enriquecimientos, que por este motivo se volvieron a ensayar en la fase sucesiva.

Las curvas de crecimiento relativas a ambos experimentos se presentan en las figuras 5 y 6, y los datos relativos a los parámetros poblacionales de ambos experimentos se dan en la tabla IX.

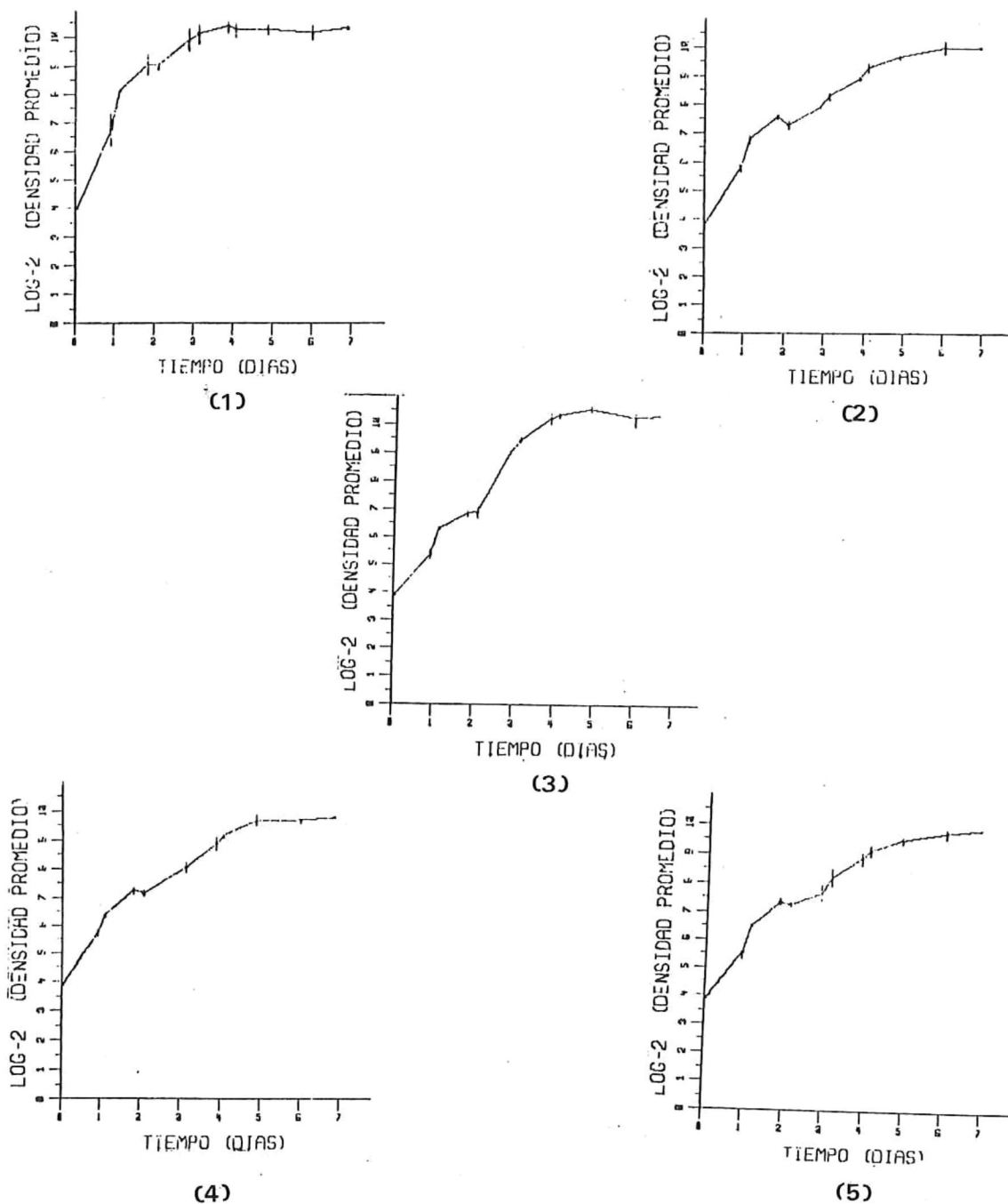


Figura 5. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de *Skeletonema menzelsii*. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más FeEDTA solo; 4: ESW más biodigerido; 5: ESW sola.

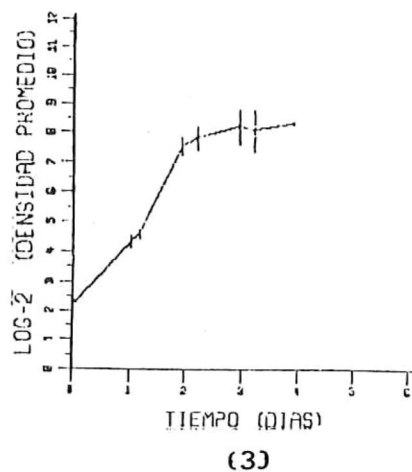
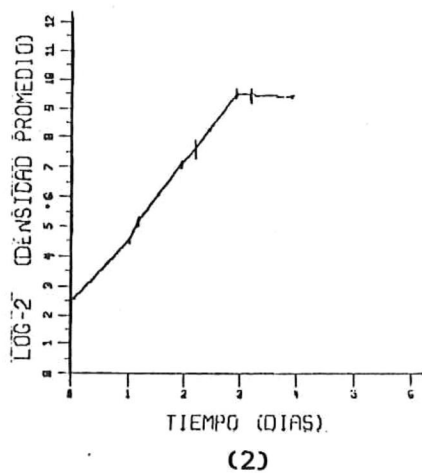
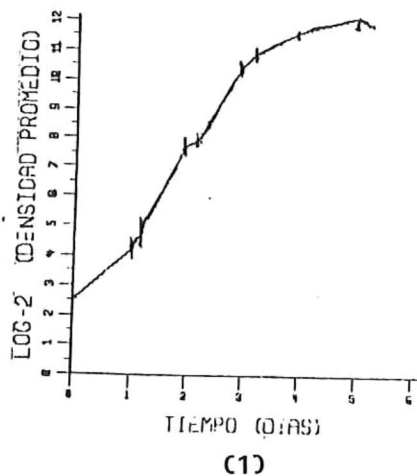


Figura 6. Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de *Skeletonema menzelsii*. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas.

Tabla IX. Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Skeletonema menzelii mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer y Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas, 3: ESW más FeEDTA solo, 4: ESW más biodigerido y 5: ESW sola.

NIVEL ERLLENMEYER (1er. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

1	2	3	4	5
1ra. fase:				
μ : 3.59(2.61)	2.61(1.84)	2.28(1.95)	2.18(1.08)	2.49(1.76)
TG: 0.41	0.54	0.72	0.55	0.54
2da. Fase:				
μ : 0.75(0.80)	1.06(0.45)	1.80(0.81)	0.93(0.13)	1.20(0.87)
TG: -1.55	1.04	0.64	1.09	1.18
Fluorescencia:				
I: 16	15	15	15	15
F: 1277	975	1314	886	979
Num. Cel./ mL:				
I: 6.5×10^4	6.2×10^4	6.2×10^4	6.2×10^4	6.2×10^4
F: 5.0×10^6	4.8×10^6	5.4×10^6	3.9×10^6	4.6×10^6

NIVEL FERNBACH (2do. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

1	2	3
1ra. Fase:		
μ : 2.90(1.16)	2.57(1.18)	2.75(0.87)
TG: 0.39	0.44	0.39
2da. Fase:		
μ : 1.84(0.95)	0.34(0.63)	1.12(1.33)
TG: 0.66	1.00	-5.39
Fluorescencia:		
I: 06	05	06
F: 3700	371	698
Num. Cel./ mL:		
I: 2.4×10^4	2.0×10^4	2.2×10^4
F: 7.8×10^6	1.3×10^6	2.8×10^6

El análisis estadístico de los datos obtenidos durante la primera fase del primer experimento demuestran que el agua de mar enriquecida permite un crecimiento de esta cepa equivalente al que se puede obtener con el medio "f" (tabla X).

En la segunda fase se demostraron diferencias significativas entre el medio "f" y todas las variantes del medio ESW, con la única excepción del enriquecimiento con FeEDTA. Resultaron además diferencias significativas entre esta misma variante y todas las demás (tabla XI).

Para el segundo experimento se volvió a aclimatar la cepa en el medio control y en las dos variantes con FeEDTA solo y con vitaminas, que dieron mejores resultados en el primer experimento, y con estos se inocularon tres Fernbach por cada uno de los medios mencionados.

El análisis estadístico consistió en comparar la fase de crecimiento exponencial de las 0 a las 46 horas para los tres tratamientos, y posteriormente de las 46 a las 93 horas, para comparar las tasas de crecimiento lento en los tres medios de cultivo.

En la primera fase, el análisis de covarianza indicó que no existen diferencias significativas entre las dos variantes del medio alternativo y el medio control (tabla XII).

Tabla X. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Skeletonema menzeli a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4 y 5: agua de mar enriquecida (ESW) sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
INDIVIDUALMENTE:					
	12	12	12	12	12
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.9391*	0.9770*	0.9869*	0.9214*	0.9687*
GLOBALMENTE:					
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			0.5554*		
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)			0.9323*		
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)			0.1500*		

Tabla XI. Análisis de varianza no paramétrico de dos vías y prueba de comparaciones múltiples con las mediciones de fluorescencia para la segunda fase de crecimiento de Skeletonema menzelii a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más FeEDTA solo; 4: ESW más biodigerido; 5: ESW sola.

Tabla de Análisis de Varianza

F. de Variación	g.d.l.	Valor de Ji2	Probabilidad
Factor 1: Medio	4	10.666	0.0306 (*)
Factor 2: Tiempo	3	31.199	0.0000 (***)
Interac. 1 X 2	12	12.799	0.3837 (NS)

Comparaciones múltiples vía S.N.K.

1 3 2 5 4

Tabla XII. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Skeletonema menzelsii a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
INDIVIDUALMENTE:			
	12	12	12
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.9331*	0.9957*	0.9827*
GLOBALMENTE:			
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.8628*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.9901*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.9804*	

Para la segunda fase se analizaron las diferencias entre las tasas de crecimiento, debido a que no se cumplió la condición de homogeneidad de varianzas de los datos originales, empleando una prueba de análisis de varianza paramétrica de una vía.

Los datos resumidos en la tabla XIII demuestran una menor velocidad de crecimiento en el medio alternativo enriquecido con vitaminas, y que el enriquecimiento con FeEDTA es suficiente para mantener un crecimiento similar al que se obtiene con el medio control.

Tabla XIII. Análisis de varianza paramétrico de una vía y comparaciones múltiples utilizando las tasas de crecimiento de la segunda fase de crecimiento de Skeletonema menzelii a nivel Fernbach, con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
GLOBALMENTE			
N		36	
NORMALIDAD		ACEPTA*	
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS.		0.2494*	

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variacion	g.d.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Probabilidad exacta
Entre grupos	2	15.000	7.500	6.209	0.005
Dentro de gpos.	33	39.859	1.208		
Total	35	54.859			

Comparaciones múltiples vía S.N.K.

3 2 1

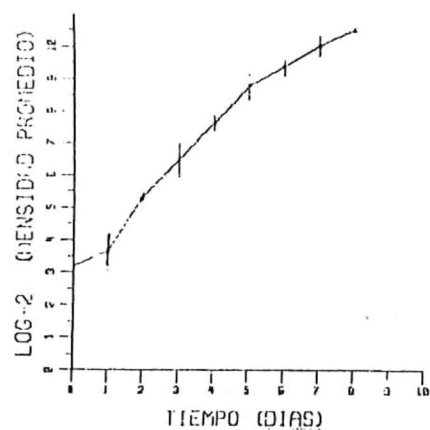
Skeletonema costatum

(SK-C-2)

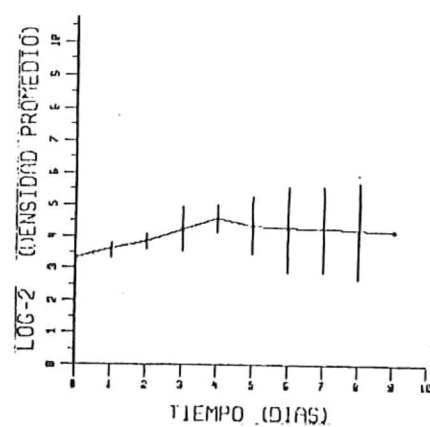
Ensayos preliminares indicaron que esta cepa no acepta el medio más sencillo. Se procedió por lo tanto a aclimatar la cepa en este medio, enriquecido con vitaminas, con metales traza secuestrados con FeEDTA, y con FeEDTA solo. Los medios "f" y ESW sirvieron como controles.

En el primer experimento, ilustrado en la figura 7 y resumido en la tabla XIV, referente a los parámetros poblacionales, se notó que la cepa sobrevive y crece, aunque muy lentamente y con variaciones notables entre réplicas, en todos los medios alternativos. El análisis estadístico demostró que existe una diferencia significativa en el crecimiento en el medio "f" y la gran mayoría de los medios alternativos, con la única excepción del ESW, lo cual es muy probablemente debido a la mayor variabilidad entre réplicas obtenida en este medio (tabla XV).

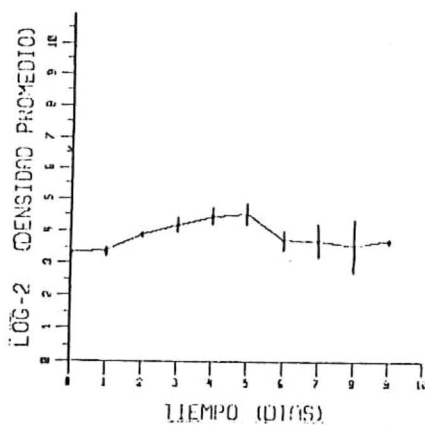
Para averiguar estos resultados, se llevó a cabo un experimento en el cual se ensayaron enriquecimientos del medio básico ESW en la siguiente forma: un grupo de tres matraces con medio ESW enriquecido con vitaminas, y seis matraces con ESW sencillo. Al tercer día, tres de éstos se enriquecieron con vitaminas, para su posterior comprobación que el medio ESW



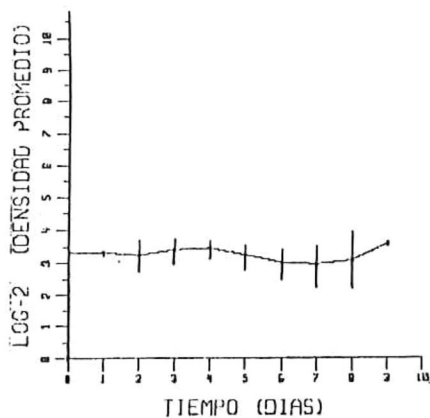
(1)



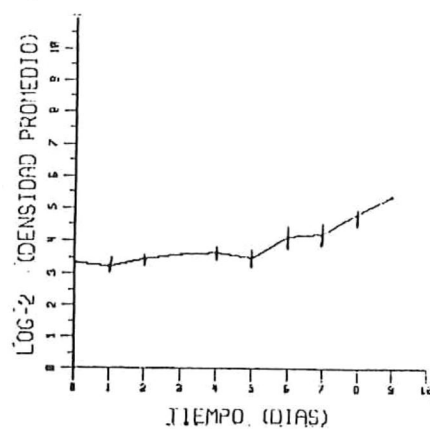
(2)



(3)



4



(5)

Figura 7. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (primer experimento) de *Skeletonema costatum*. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) sola; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

Tabla XIV. Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Skeletonema costatum mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) sola, 3: ESW más vitaminas, 4: ESW más FeEDTA solo y 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

NIVEL ERLLENMEYER (1er. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

1	2	3	4	5
μ : 1.41(0.44)	0.37(0.01)	0.40(0.14)	0.11(0.07)	0.10(0.05)
TG: 0.75	2.70	2.65	10.90	11.90
Fluorescencia:				
I: 09	10	10	10	10
F: 1748	28	27	10	12
Num. Cel./ mL:				
I: 8.3×10^3	9.3×10^3	9.3×10^3	9.3×10^3	9.3×10^3
F: 1.5×10^6	26.0×10^3	26.0×10^3	10.0×10^3	11.0×10^3

NIVEL ERLLENMEYER (2do. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

1	2	3
1ra. Fase:		
μ : 1.51(0.77)	0.36(0.27)	0.22(0.69)
TG: 0.88	7.24	0.58
2da. Fase:		
μ : 1.82(0.54)	0.29(0.07)	0.44(0.24)
TG: 0.59	3.57	2.72
Fluorescencia:		
I: 11	09	10
F: 1783	36	45
Num. Cel./ mL:		
I: 9.9×10^3	8.1×10^3	9.0×10^3
F: 1.6×10^6	1.2×10^5	1.2×10^5

Tabla XV. Análisis de varianza no paramétrico de dos vías y prueba de comparaciones múltiples con las medidas de fluorescencia para la fase de crecimiento de Skeletonema costatum a nivel Erlenmeyer (primer experimento), con los siguientes medios de cultivo: 1: Medio control "f"; 2: Agua de mar enriquecida (ESW) sola; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

Tabla de análisis de varianza

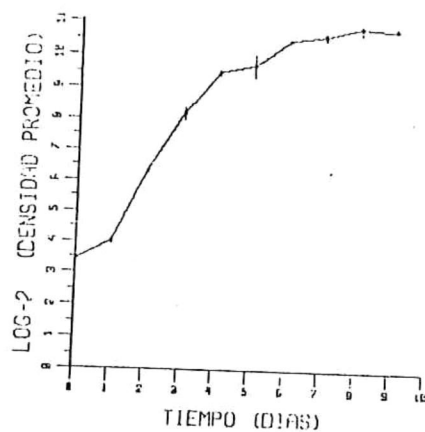
F. de variación	g.d.l.	Valor de Ji2	Probabilidad
Factor 1: Medios	4	12.206	0.0159 (*)
Factor 2: Tiempo	2	6.740	0.0344 (*)
Int. 1 X 2	8	6.923	0.5450 (NS)

Comparaciones múltiples vía S.N.K.

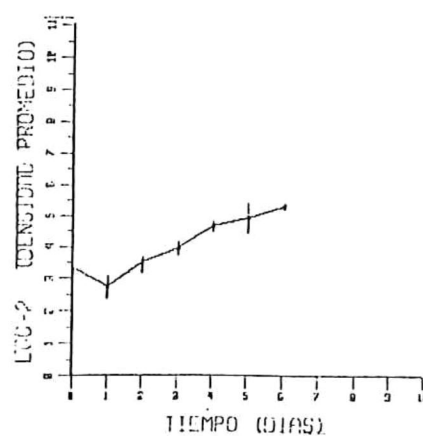
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	4
_____		_____		

no es limitante debido solamente al auxotrofismo de esta cepa. Al grupo de tres matraces que ya contenían el enriquecimiento de vitaminas se agregó una cantidad de los nutrientes mayores (N, P y Si), equivalente a la inicial para llegar a una concentración cercana a la del medio "f", probando de esta forma una posible limitación del medio debido a los elevados valores de K_s (Constante de saturación media. Darley, 1987), típicos de especies costeras como es Skeletonema costatum.

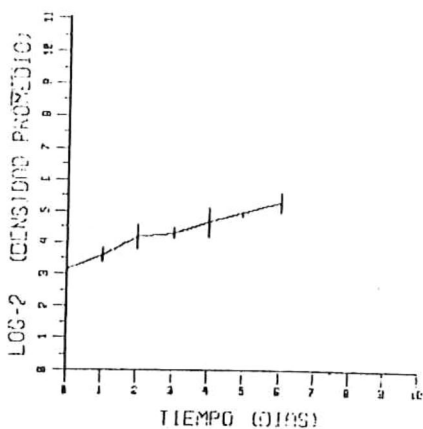
Las curvas de crecimiento se ilustran en la figura 8, los parámetros poblacionales y densidad celular en la tabla XIV y los resultados del análisis estadístico en la tabla XVI, de la cual se deduce que esta cepa tiene un crecimiento menor en todos los medios alternativos probados; lo cual confirma los resultados del primer experimento y lo reportado en la literatura referente a esta especie (Carlucci y Bowes, 1970).



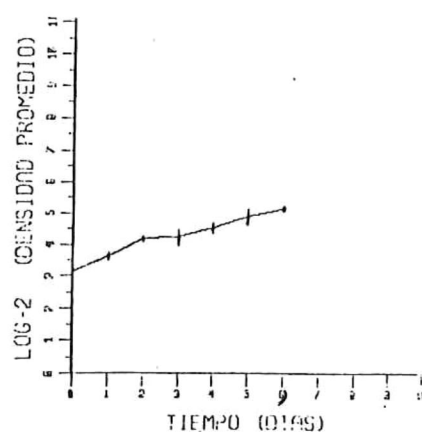
(C1)



(C2)



(C3)



(C4)

Figura 8. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (segundo experimento) de Skeletonema costatum. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW sola.

Tabla XVI. Análisis de varianza no paramétrico de dos vías y prueba de comparaciones múltiples con las medidas de fluorescencia para la fase de crecimiento de *Skeletonema costatum* a nivel Erlenmeyer (segundo experimento), con los siguientes medios de cultivo: 1: Medio control "f"; 2: Agua de mar enriquecida (ESW) más nutrientes; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW sola.

Tabla de análisis de varianza

F. de variación	g.d.l.	Valor de Ji ²	Probabilidad
Factor 1: Medios	3	2.222	0.5276 (NS)
Factor 2: Tiempo	2	0.666	0.7165 (NS)
Int. 1 X 2	6	19.777	0.0030 (**)

Comparaciones múltiples vía S.N.K.

1 2 3 4

Chaetoceros sp.

(CH-X-3)

Para el primer experimento se emplearon tres Erlenmeyer con medio "f" y nueve con ESW. Dado que los datos de fluorescencia obtenidos el primer día con el medio alternativo resultaron inferiores por un orden de magnitud de los obtenidos con el medio control, se probaron los siguientes tres enriquecimientos: a tres matraces con medio alternativo se les agregó la mezcla de vitaminas que se emplea normalmente para el medio "f", a otros tres se les agregó una cantidad de FeEDTA equivalente a la del medio control, y los últimos tres se enriquecieron con una cantidad de los nutrientes mayores en concentración igual a la del ESW. Las curvas de crecimiento obtenidas se ilustran en la figura 9, e indican que entre las variantes del medio alternativo probadas, la con vitaminas resultó en un mejor crecimiento, motivo por el cual el experimento se repitió en escala mayor (2000 mL) con ésta variante y empleando los medios "f" y ESW como controles.

Los resultados de este segundo experimento se ilustran en la figura 10 y los datos relativos a los parámetros poblacionales de ambos experimentos en la tabla XVII.

Para el análisis estadístico del primer experimento se intentó inicialmente un análisis de covarianza que, debido a la

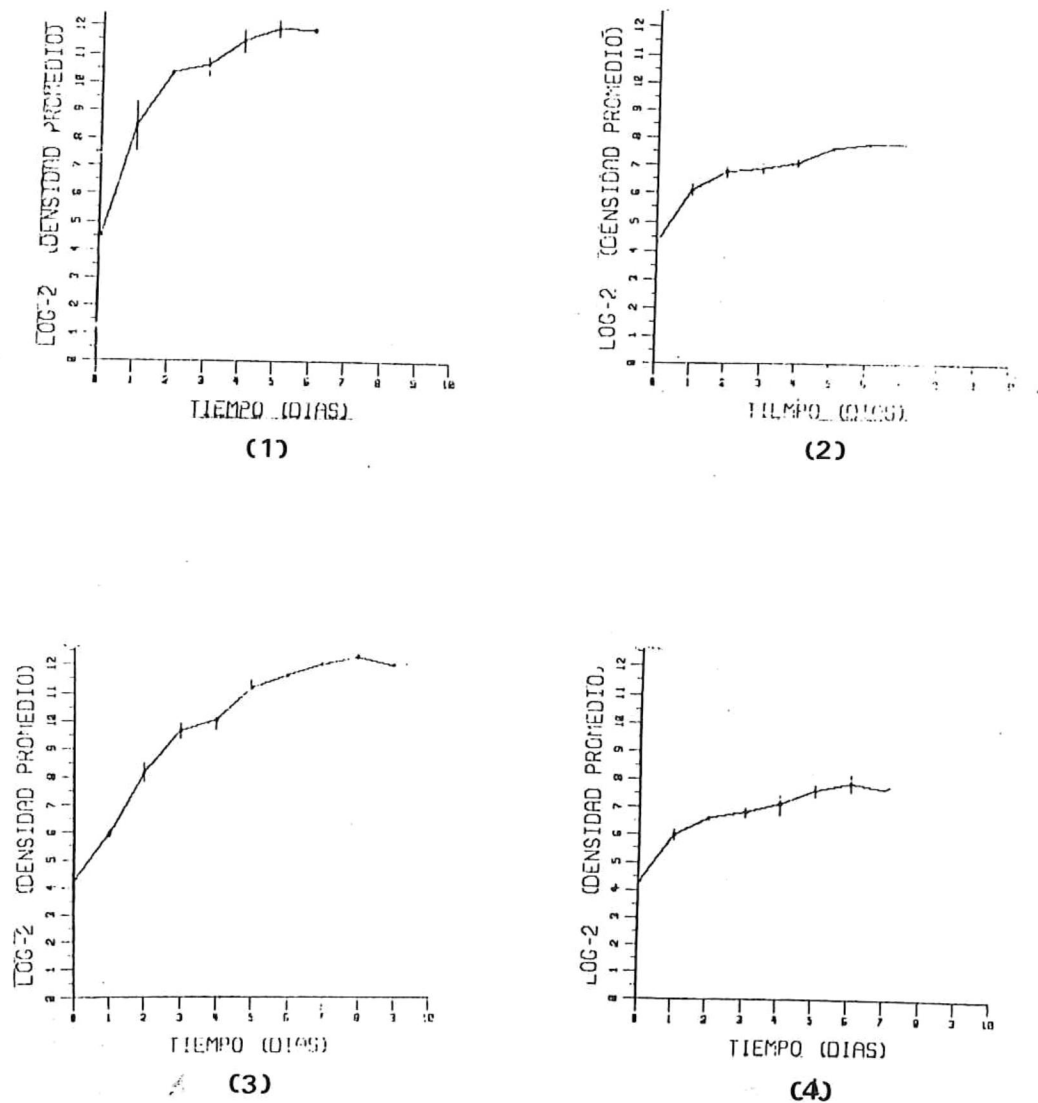


Figura 9. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de *Chaetoceros* sp. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más nutrientes.

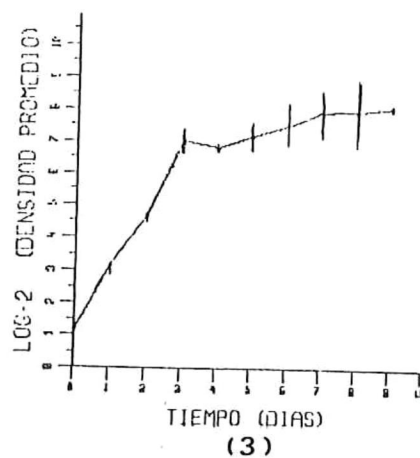
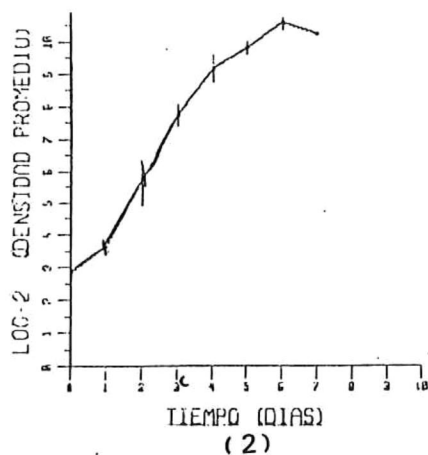
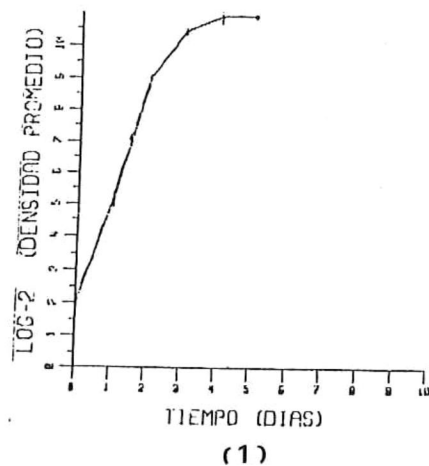


Figura 10. Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de *Chaetoceros* sp. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW sola.

Tabla XVII. Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Chaetoceros sp. mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer y Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo, 3: ESW más vitaminas y 4: ESW sola.

NIVEL ERLLENMEYER (1er. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

	1	2	3	4
μ :	2.91(1.41)	0.39(0.37)	1.83(0.51)	0.42(0.30)
TG:	0.39	4.63	0.57	3.17

Fluorescencia:

I:	23	20	20	20
F:	3833	223	4033	221

Num. Cel./ mL:

I:	4.0×10^4	5.0×10^4	5.0×10^4	5.0×10^4
F:	7.3×10^6	5.1×10^5	6.9×10^6	4.9×10^5

NIVEL FERNBACH (2do. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

	1	3	4
μ :	2.77(1.23)	1.85(0.36)	1.94(0.42)
TG:	0.43	0.55	0.53

Fluorescencia:

I:	04	07	02
F:	1892	1217	308

Num. Cel./ μ L:

I:	1.3×10^6	1.8×10^4	5.4×10^3
F:	4.9×10^6	4.0×10^6	9.0×10^5

alta variabilidad entre réplicas, no detectó diferencias entre los diferentes medios empleados. Por este motivo, se optó por utilizar los valores de las tasas diarias de crecimiento calculados por cada uno de los tres matraces de cada medio durante el período de la fase de crecimiento exponencial, que se emplearon para una prueba de análisis de varianza de una vía. Los resultados de esta prueba, que se resumen en la tabla XVIII, indican que las tasas de crecimiento obtenidas en el medio "f" resultan significativamente diferentes de las obtenidas en los medios alternativos, y que no hay diferencias entre éstas últimas.

Para el segundo experimento se procedió al análisis de covarianza de los datos obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial, que no demostró diferencias entre los medios ensayados (tabla XIX).

Este resultado contradice el obtenido en el primer experimento, pero el análisis microscópico de las muestras reveló que las células de los medios alternativos resultaban irregulares o deformes, en su mayoría desprovistas de frustulos y de dimensiones anormales o superiores a la célula normal. Por este motivo se optó por no repetir estos experimentos, dado que resulta evidente que esta cepa no se presta a ser cultivada en los medios alternativos ensayados.

Tabla XVIII. Análisis de varianza paramétrico de una vía y comparaciones múltiples utilizando las tasas de crecimiento de la fase exponencial de Chaetoceros sp. a nivel Erlemeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más nutrientes.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO			
	1	2	3	4
GLOBALMENTE				
N		24		
NORMALIDAD		ACEPTA*		
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS.		0.2232*		

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variacion	g.d.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Probabilidad exacta
Entre grupos	3	20048348.0	6682782.0	6.610	0.003
Dentro de gpos.	20	20219476.0	1010973.75		
Total	23	40267824.0			

Comparaciones múltiples vía S.N.K.

1 3 4 2

Tabla XIX. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento exponencial de Chaetoceros sp. a nivel Fernbach, con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
INDIVIDUALMENTE:			
N	12	15	9
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.9813*	0.6248*	0.9313*
GLOBALMENTE:			
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.2304*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.7713*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.4215*	

Isochrysis sp.

(IS-X-1)

Para escoger las variantes del medio alternativo se inocularon doce matraces con 100 mL de medio ESW y tres con igual cantidad de medio "f". Al día dos los matraces con medio ESW se enriquecieron de la siguiente forma: tres con FeEDTA más la mezcla de metales traza del medio "f", tres con la mezcla de vitaminas del medio "f", tres con FeEDTA sin metales traza y tres sin enriquecimiento, que se dejaron como control.

Todos los medios alternativos mostraron una fase de retraso aparentemente debida a una insuficiente aclimatación al medio, dado que al día tres se notó un crecimiento en el medio ESW sin enriquecimiento. Las dos variaciones de este medio adicionadas con secuestrante demostraron una reacción positiva a este enriquecimiento, mientras que la mezcla de vitaminas no produjo una respuesta evidente (figura 11).

Por este motivo, para el segundo experimento se inocularon tres Fernbach con 2000 mL de medio "f" y seis con medio ESW y, después de un lapso prudencial de tres días, tres de los últimos se enriquecieron con FeEDTA sin la mezcla de metales traza. Los tres con medio "f" y los tres con ESW restantes sirvieron como controles.

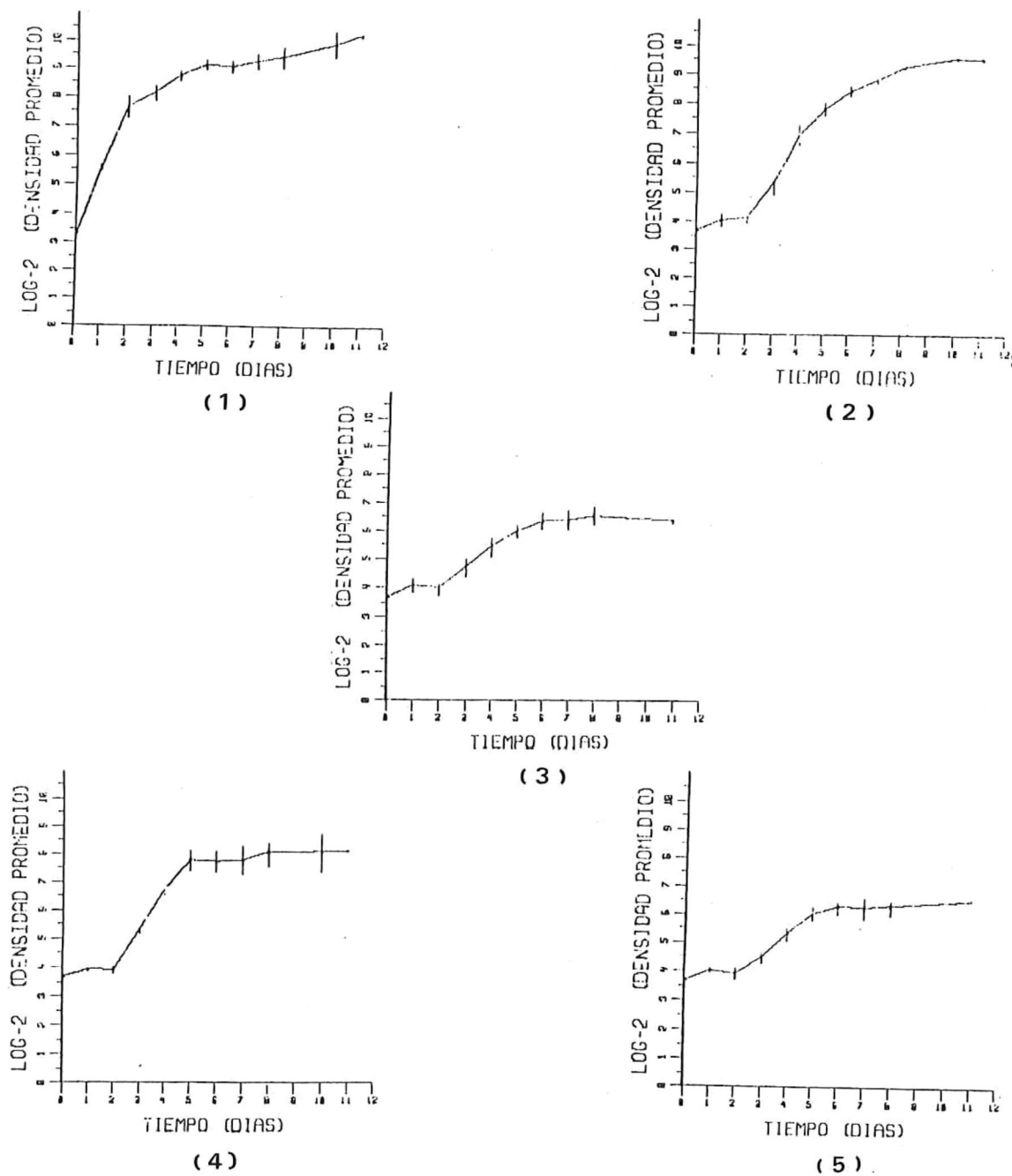


Figura 11. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de *Isochrysis* sp. 1: medio control "f" ; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA con metales traza; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW sola.

Las curvas de crecimiento y los parámetros poblacionales relativos a los dos experimentos se dan en las figuras 11 y 12, y en la tabla XX.

Para el análisis de los datos obtenidos en el primer experimento se rechazó la condición de homogeneidad de varianzas, motivo por el cual no se pudo proceder con el análisis de covarianza y se optó por comparar los valores promedio de la tasa de crecimiento de la fase exponencial, mediante una prueba de análisis de varianza de una vía.

Los resultados de esta prueba se resumen en la tabla XXI y demuestran que el medio "f" es significativamente diferente a todos los demás, que con los medios enriquecidos con FeEDTA se obtienen resultados intermedios y que las menores tasas de crecimiento son las del medio ESW y de su variante con vitaminas.

Para el segundo experimento se compararon primeramente el crecimiento de los primeros tres días por medio de un análisis de covarianza, esta prueba resultó que los dos medios probados no causaron diferencias en el crecimiento (tabla XXII).

Para la segunda fase se compararon con el mismo análisis los datos relativos a los Fernbach enriquecidos con FeEDTA, con los dos controles, y de esto resultó una diferencia

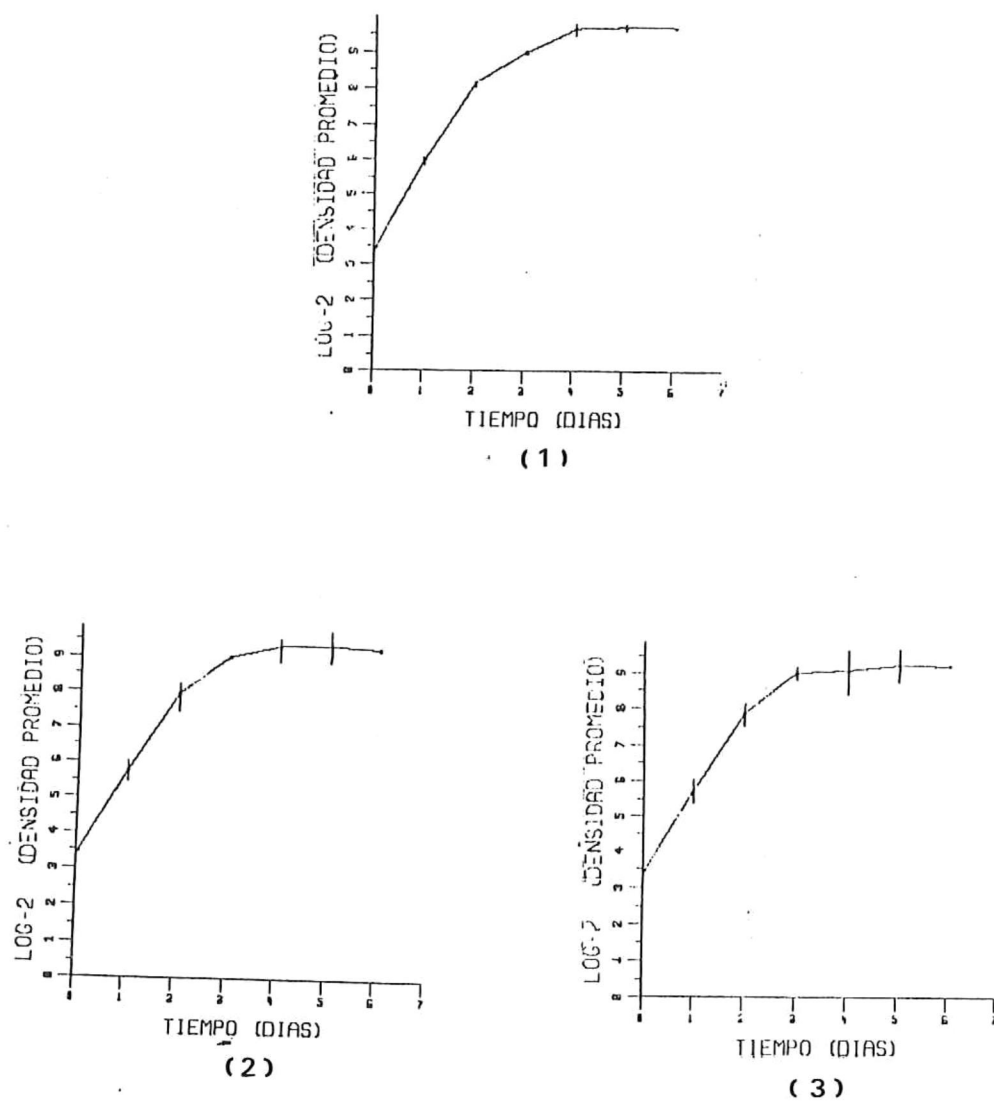


Figura 12. Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de Isochrysis sp. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola.

Tabla XX. Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Isochrysis sp. mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer y Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA con metales traza, 3: ESW más vitaminas, 4: ESW más FeEDTA solo y 5: ESW sola.

NIVEL ERLLENMEYER (1er. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

1	2	3	4	5
1ra. fase:				
μ : 2.17(0.18)	0.23(0.17)	0.16(0.30)	0.12(0.17)	0.11(0.30)
TG: 0.46	6.08	-7.16	-263.50	-3.57
2da. Fase:				
μ : 0.54(0.06)	1.40(0.31)	0.73(0.02)	1.40(7.78)	0.70(0.17)
TG: 1.88	0.73	1.38	0.72	1.47
Fluorescencia:				
I: 10	13	13	13	13
F: 1289	754	91	304	100
Num. Cel./ mL:				
I: 4.3×10^5	7.7×10^5	7.7×10^5	7.7×10^5	7.7×10^5
F: 13.4×10^6	8.8×10^6	1.5×10^6	3.4×10^6	1.6×10^6

NIVEL FERNBACH (2do. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

1	4	5
1ra. Fase:		
μ : 1.84(0.91)	1.85(0.68)	1.85(0.62)
TG: 0.70	0.61	0.59
2da. Fase:		
μ : 0.35(0.42)	0.18(0.21)	0.12(0.04)
TG: 11.41	17.64	8.90
Fluorescencia:		
I: 11	11	11
F: 828	640	634
Num. Cel./ mL:		
I: 3.0×10^5	3.0×10^5	3.0×10^5
F: 9.4×10^6	7.4×10^6	7.1×10^6

Tabla XXI. Análisis de varianza paramétrico de una vía y comparaciones múltiples utilizando las tasas de crecimiento de la fase exponencial de Isochrysis sp. a nivel Erlenmeyer, con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA con metales traza; 3: ESW más vitaminas; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
GLOBALMENTE					
N			30		
NORMALIDAD			ACEPTA*		
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS.			0.1394*		

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variacion	g.d.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Probabilidad exacta
Entre grupos	4	8.7140	2.178	51.988	0.000
Dentro de gpos.	25	1.048	0.042		
Total	29	9.761			

Comparaciones múltiples vía S.N.K.

1 4 2 3 5

Tabla XXII. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Isochrysis sp. a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2 y 3: agua de mar enriquecida (ESW) sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
INDIVIDUALMENTE:			
N	12	12	12
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.9781*	0.9877*	0.9959*
GLOBALMENTE:			
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.9991*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.9906*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.9887*	

significativa entre el medio "f" y el medio ESW, mientras que la variante enriquecida con FeEDTA mantuvo valores intermedios, no diferentes significativamente de los dos controles (tabla XXIII).

Tabla XXIII. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la segunda fase de crecimiento de Isochrysis sp. a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más FeEDTA solo; 3: ESW sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
INDIVIDUALMENTE:			
N	9	9	9
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.6566*	0.3458*	0.8805*
GLOBALMENTE:			
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.8504*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.0156NS	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.2797*	

Comparaciones de pendientes por pares vía S.N.K.

<u>1</u>	<u>2</u>	3

Pavlova lutheri

(PA-L-1)

Para el primer experimento se emplearon inicialmente tres Erlenmeyer con medio "f" y doce con agua de mar enriquecida (ESW), que se dejaron crecer durante cuatro días, durante los cuales la fluorescencia de los cultivos en el medio simplificado aumentó en forma análoga a la del medio control. Después de este período los matraces del medio ESW se dividieron en grupos de tres, que se enriquecieron en la forma siguiente: tres con la misma mezcla de vitaminas empleada para el medio "f", tres con una cantidad de nutrientes del medio ESW igual a la inicial, tres con FeEDTA en concentración equivalente al medio control, pero sin agregar la mezcla de metales traza. Tres, sin enriquecimiento posterior, sirvieron como control.

Las curvas de crecimiento se ilustran en la figura 13, los parámetros poblacionales y los valores de biomasa inicial y final para las dos fases del experimento se dan en la tabla XXIV, y los resultados de las pruebas estadísticas se resumen en las tablas XXV y XXVI.

Todas demuestran que Pavlova lutheri aceptó el medio alternativo sencillo (tabla XXV), en el cual creció sin que

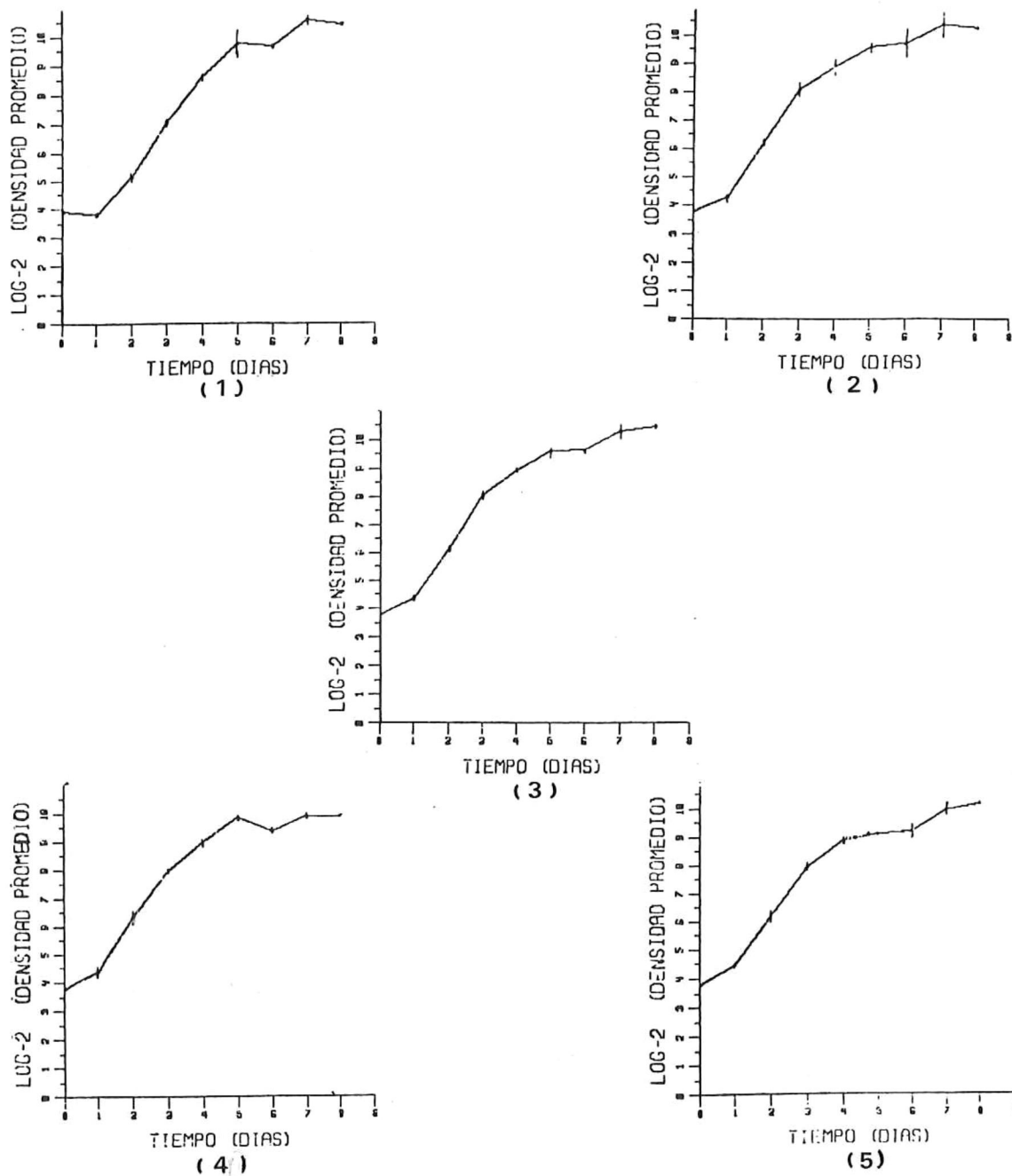


Figura 13. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer de *Pavlova lutheri*. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más nutrientes; 4: ESW sola; 5: ESW más FeEDTA solo.

Tabla XXIV. Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Pavlova lutheri mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer y Fernbach, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas, 3: ESW más nutrientes, 4: ESW sola y 5: ESW más FeEDTA solo.

NIVEL ERLLENMEYER (1er. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

	1	2	3	4	5
1ra. fase:					
μ : 1.61(0.28)	1.54(0.63)	1.52(0.57)	1.54(0.46)	1.47(0.49)	
TG: 0.63	0.76	0.74	0.70	0.75	
2da. Fase:					
μ : 0.66(0.66)	0.50(0.31)	0.45(0.34)	0.64(0.20)	0.36(0.34)	
TG: 2.99	3.38	7.66	0.33	5.14	
Fluorescencia:					
I: 15	14	14	14	14	
F: 1565	1408	1418	962	1152	
Num. Cel./ mL:					
I: 3.6×10^5	5.6×10^5	5.6×10^5	5.6×10^5	5.6×10^5	
F: 12.5×10^6	9.2×10^6	9.9×10^6	4.7×10^6	8.7×10^6	

NIVEL FERNBACH (2do. experimento)

MEDIOS DE CULTIVO

	1	2	3
1ra. Fase:			
μ : 1.14(0.39)		0.71(0.82)	0.58(0.47)
TG: 0.93		4.22	2.62
2da. Fase:			
μ : 0.67(0.68)		1.03(0.44)	0.66(0.07)
TG: 2.32		1.08	1.54
Fluorescencia:			
I: 10		11	11
F: 230		651	300
Num. Cel./ μ L:			
I: 3.5×10^4		4.1×10^4	4.1×10^4
F: 2.0×10^6		3.2×10^6	2.2×10^6

Tabla XXV. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento inicial de Pavlova lutheri a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4,5: agua de mar enriquecida (ESW).

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
INDIVIDUALMENTE:					
N	12	12	12	12	12
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.9970*	0.9573*	0.9746*	0.9647*	0.9813*
GLOBALMENTE:					
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			0.9986*		
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)			0.9997*		
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)			0.8122*		

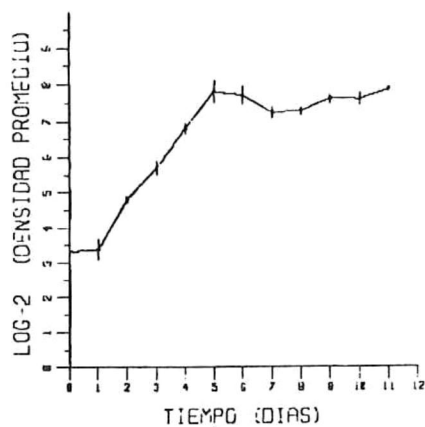
Tabla XXVI. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento final de Pavlova lutheri a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más nutrientes; 4: ESW sola; 5: ESW más FeEDTA solo.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
INDIVIDUALMENTE:					
N	12	12	12	12	12
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.6985*	0.6348*	0.8894*	0.7689*	0.8794*
GLOBALMENTE:					
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			0.2634*		
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)			0.8707*		
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)			0.4957*		

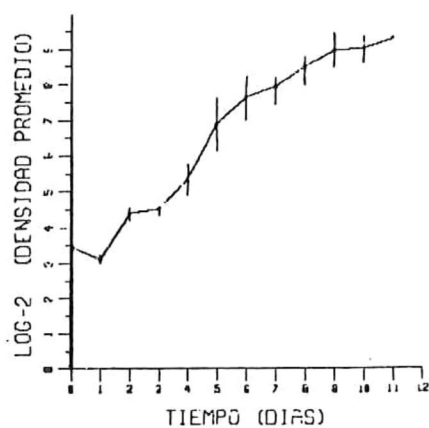
fuera posible demostrar diferencias significativas, inclusive cuando se introdujeron las variaciones descritas anteriormente (tabla XXVI). Las biomاسas finales medidas como fluorescencia resultaron ligeramente superiores en los medios "f" y en las dos variantes del ESW con vitaminas y con nutrientes, motivo por el cual estos enriquecimientos fueron las que se seleccionaron para el segundo experimento en cultivos de mayor volumen (2000 mL).

Este empezó como en el caso anterior, comparando inicialmente (durante tres días) el crecimiento en el medio "f" con el obtenido en ESW (en seis recipientes), que posteriormente se enriquecieron como se especificó anteriormente, para observar si tales enriquecimientos causaran cambios a las pendientes de las curvas de crecimiento, que se ilustran en la figura 14. Los valores de tasa de crecimiento, de tiempo de generación y de biomasa inicial y final de las dos fases se dan en la tabla XXIV y los resultados del análisis estadístico en las tablas XXVII y XXVIII.

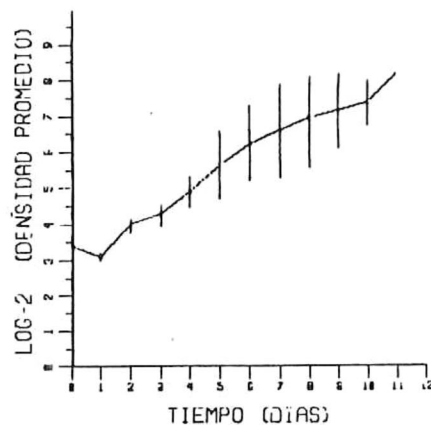
El análisis estadístico no pudo demostrar diferencias significativas entre los tratamientos.



(1)



(2)



(3)

Figura 14. Curvas de crecimiento de los cultivos en Fernbach de Pavlova lutheri. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más nutrientes.

Tabla XXVII. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento inicial de Pavlova lutheri a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3: agua de mar enriquecida (ESW).

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
INDIVIDUALMENTE:			
N	9	9	9
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.7729*	0.9126*	0.4057*
GLOBALMENTE:			
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.3140*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.9869*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.1028*	

Tabla XXVIII. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento final de Pavlova lutheri a nivel Fernbach con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más nutrientes.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO		
	1	2	3
INDIVIDUALMENTE:			
N	12	12	12
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.9196*	0.6831*	0.2584*
GLOBALMENTE:			
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		0.6046*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)		0.6602*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)		0.1810*	

Nannochloris sp.

(NA-X-1)

Experimentos preliminares indicaron que en agua de mar completa esta cepa tiene un habitus semibentónico, ya que una fracción considerable de la biomasa se adhiere al fondo y a las paredes del recipiente. Investigaciones bibliográficas (Droop, 1955; Witt et al., 1981; Turner y Gowen, 1984) indicaron que varias especies de este género provienen de ambientes salobres y requieren de una salinidad reducida.

Un primer experimento fue por lo tanto dirigido a investigar este punto. Después de un período de aclimatación a salinidades progresivamente decrecientes (24, 16, 8 y 0 p.p.t.) que duró entre una y dos semanas, se inocularon con iguales concentraciones iniciales tres matraces Erlenmeyer por cada una de las salinidades reducidas, y los cultivos se dejaron crecer durante un período de ocho días. Los frascos fueron agitados manualmente todos los días, y con la misma frecuencia se midió la fluorescencia de la fracción suspendida. Al octavo día, después de una medición final, todos los frascos fueron sonicados durante un período de 2 a 4 minutos para facilitar el desprendimiento y la dispersión de las células adheridas (Voltolina, 1985) y se volvió a medir la fluorescencia final de cada cultivo.

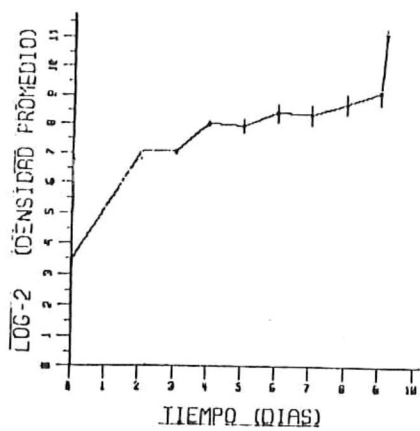
Las dos series de datos se utilizaron para una prueba de análisis de varianza de dos vías, a través de la cual se compararon los valores finales de biomasa obtenidos antes y después de sonicar, con las diferentes salinidades.

Las curvas de crecimiento de este experimento se dan en la figura 15 y los parámetros poblacionales y densidad celular en la tabla XXIX.

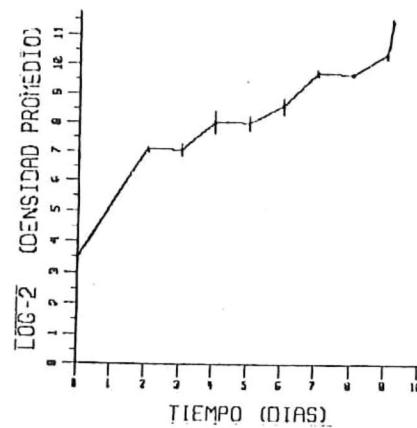
Las curvas de crecimiento de la figura 15 y los datos de la tabla XXIX indicaron que el valor de la biomasa final es independiente de la salinidad, pero que el menor porcentaje de células adheridas se obtuvo con las salinidades de 16 y 24 p.p.t..

Los resultados del análisis estadístico reportados en la tabla XXX indican una mayor probabilidad de similitud de biomasa antes y después de sonicación para la última de éstas salinidades.

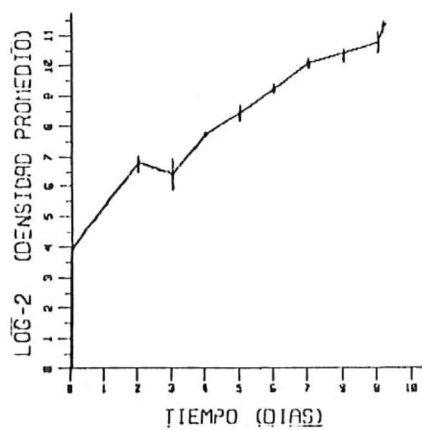
Dado que el valor de biomasa final obtenida no indica la velocidad de reproducción, ya que quedan desconocidas las duraciones de las fases de retardo y de crecimiento exponencial y reducido, se procedió a medir la velocidad de crecimiento en medio "f" y simplificado, preparados con agua de la salinidad que causó menor adhesión de células a las paredes de los



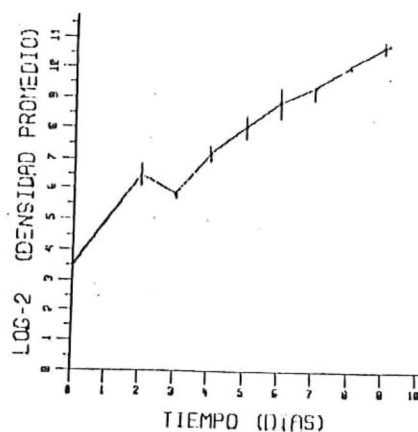
(1)



(2)



(3)



(4)

Figura 15. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (primer experimento) de *Nannochloris* sp. en concentraciones de salinidad de: 0, 8, 16 y 24 p.p.t. (1, 2, 3 y 4 respectivamente).

Tabla XXIX. Tasa de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempo de generación promedio (TG) de la fase de crecimiento de *Nannochloris* sp. en el cultivo a nivel Erlenmeyer, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f", 2, 3, 4 y 5: agua de mar enriquecida (ESW).

MEDIOS DE CULTIVO

1	2	3	4	5
μ : 1.70(0.10)	1.64(0.86)	1.76(0.69)	2.00(1.12)	1.92(0.62)
TG: 0.59	0.71	0.62	0.60	0.55
Fluorescencia:				
I: 26	27	27	27	27
F: 474	355	326	389	383
Num. Cel./ mL:				
I: 26.7×10^3	20.5×10^3	20.5×10^3	20.5×10^3	20.5×10^3
F: 48.7×10^4	23.4×10^4	28.6×10^4	26.5×10^4	31.9×10^4

Tabla XXX. Valores promedio (A) y comparación de medias muestrales (B) de biomasa, expresada en unidades de fluorescencia al final de la fase de crecimiento exponencial, de Nannochloris sp. A: indica antes y D: después de sonicar, en cuatro concentraciones diferentes de salinidad a nivel Erlenmeyer, con medio "f".

		A							
SALINIDAD		FLUORESCENCIA							
		Antes de sonicar				Después de sonicar			
0		578				2265			
8		1300				2758			
16		1796				2686			
24		1730				1788			

		B							
0	A								
	D	0.0024							
	A	0.0139 0.0180							
8									
	D	0.0018 0.2281* 0.0083							
	A	0.0194 0.2732* 0.2013* 0.0764*							
16									
	D	0.0042 0.3520* 0.0184 0.8764* 0.1202*							
	A	0.0042 0.1141* 0.0982* 0.0305 0.8532* 0.0620*							
24									
	D	0.0032 0.1428* 0.0667* 0.0354 0.9813* 0.0719* 0.8002*							
		A	D	A	D	A	D	A	
D									
		0		8		16		24	

recipientes. Se prepararon para este fin tres Erlenmeyer con medio "f" y doce con ESW con el fin de poder contar con suficientes recipientes de este medio para individuar posibles factores limitantes.

Los datos obtenidos se reproducen en la figura 16 de la cual se desprende que, a pesar de lo indicado por el primer experimento, una fracción considerable de células queda adherida al fondo y a las paredes de los recipientes, por lo cual se tuvo que sonicar los cultivos cada segundo día para poder obtener datos indicativos de la velocidad real de crecimiento de esta cepa. Se decidió dejar un día entre tratamientos con ultrasonido, ya que no existen datos sobre sus efectos sobre esta especie, aunque se sabe que en general el método no afecta el crecimiento y los procesos fotosintéticos de varias microalgas (Votolina, 1985). Además, las curvas indican un crecimiento relativamente rápido en todos los medios ensayados, y el análisis estadístico (tabla XXXI), indica que no hubo diferencias significativas entre ellos.

A pesar de esto, se decidió no continuar experimentando con esta cepa ya que se consideró poco atractivo su cultivo a nivel masivo, debido a la dificultad de mantener las células en suspensión.

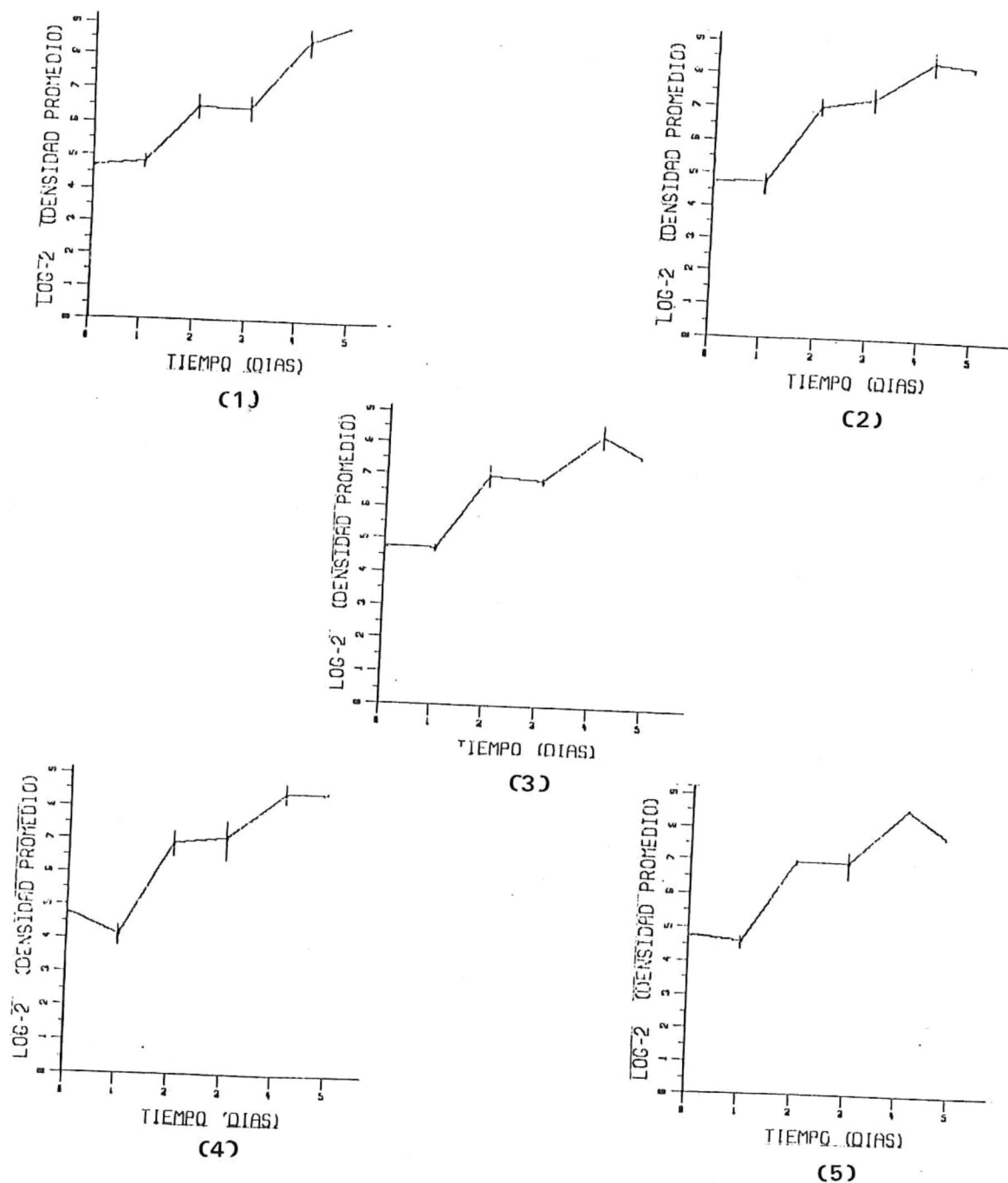


Figura 16. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlennmeyer (segundo experimento) de *Nannochloris* sp. 1: medio control "f"; 2, 3, 4, y 5: agua de mar enriquecida (ESW) sola.

Tabla XXXI. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la fase de crecimiento exponencial de Nannochloris sp. a nivel Erlenmeyer con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4, y 5: agua de mar enriquecida (ESW).

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
INDIVIDUALMENTE:					
N	9	9	9	9	9
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.8153*	0.7754*	0.7274*	0.8118*	0.9735*
GLOBALMENTE:					
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			0.9999*		
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)			0.9996*		
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)			0.9983*		

Tetraselmis suecica

(TE-S-1)

Para ensayar la adaptabilidad de esta cepa a medios simplificados, se inocularon tres matraces con medio "f" y doce matraces con medio ESW. Al día uno los matraces con medio alternativo se enriquecieron por triplicado de la forma siguiente: tres con una cantidad de la mezcla de vitaminas del medio "f", tres con FeEDTA solo, tres con FeEDTA más la mezcla de metales traza del medio "f" y tres finalmente se dejaron sin enriquecimiento para que sirvieran como control.

Las curvas de crecimiento relativas a este experimento se ilustran en la figura 17 y los datos relativos a los parámetros poblacionales se reportan en la tabla XXXII.

Durante este experimento se notó una tendencia de esta cepa, por lo demás ya reportada para otras especies de este mismo género (Butcher, 1959; López-Elias, 1990) de adherirse al fondo y a las paredes del recipiente de cultivo. Por este motivo el segundo experimento no se pudo llevar a cabo en recipientes de volumen mayor, y se decidió repetirlo por segunda vez a nivel Erlenmeyer, utilizando los mismos enriquecimientos empleados en el experimento anterior con la excepción del enriquecimiento con vitaminas que se sustituyó, debido a los pobres resultados obtenidos en el primer

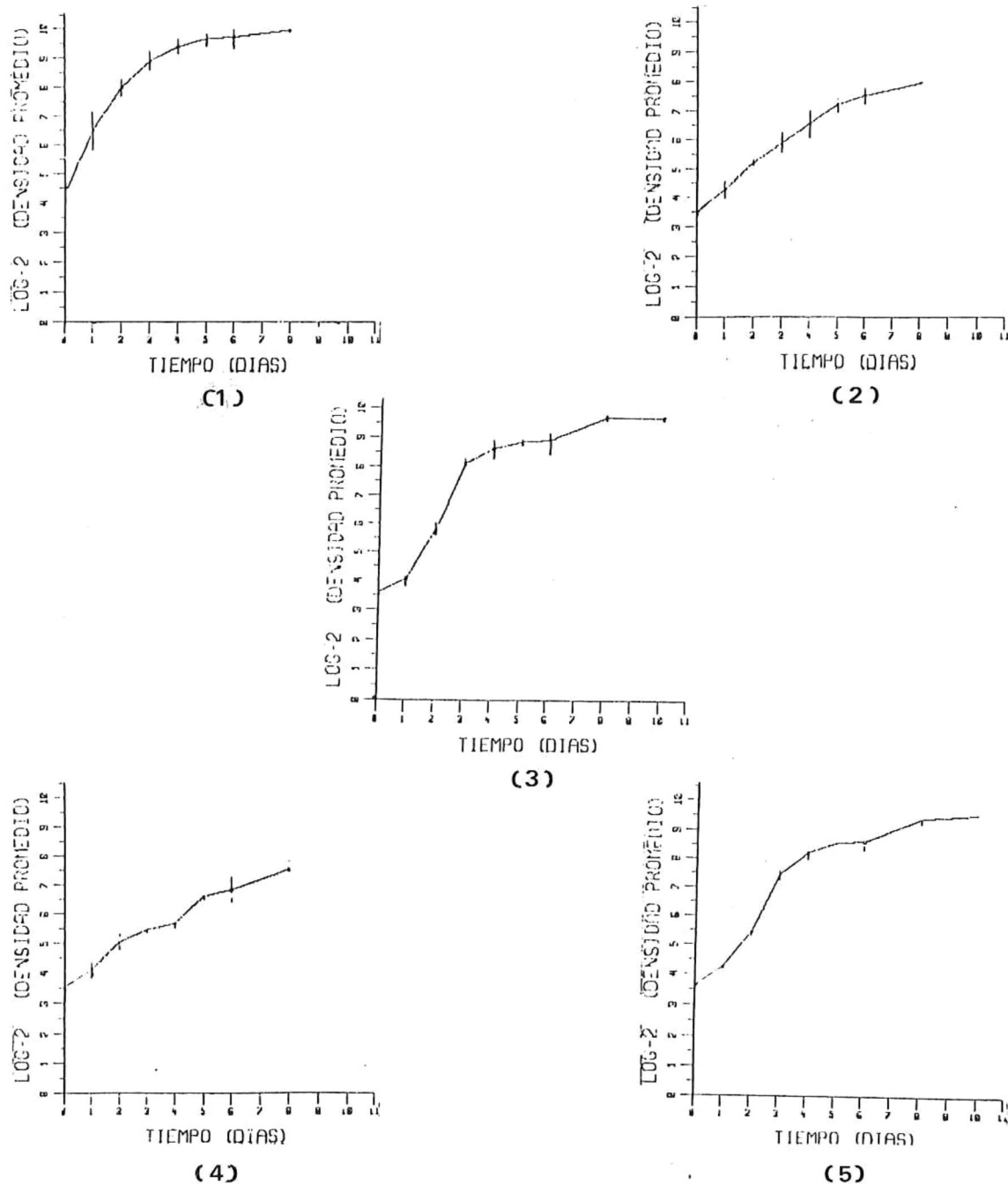


Figura 17. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (primer experimento) de *Tetraselmis suecica*. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más FeEDTA solo; 4: ESW sola; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

Tabla XXXII. Tasas de crecimiento medio (μ), desviación estándar y tiempos de generación promedio (TG) para las fases de crecimiento de Tetraselmis suecica mencionadas en el texto, para los dos experimentos a nivel Erlenmeyer, con sus valores iniciales (I) y finales (F) de fluorescencia y de número de células por mililitro. Los medios probados fueron: 1: medio control "f", 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas, 3: ESW más FeEDTA solo, 4: ESW sola, 5: ESW más FeEDTA con metales traza y 6: ESW más nutrientes.

NIVEL ERLLENMEYER (1er. experimento)					
MEDIOS DE CULTIVO					
1	2	3	4	5	
μ : 0.96(0.52)	0.76(0.17)	1.53(0.94)	0.53(0.39)	1.34(0.03)	
TG: 1.31	1.35	1.00	2.74	0.87	
Fluorescencia:					
I: 21	12	12	12	12	
F: 1002	251	850	192	780	
Num. Cel./ mL:					
I: 20.5×10^3	11.9×10^3	11.9×10^3	11.9×10^3	11.9×10^3	
F: 98.0×10^4	39.0×10^4	74.0×10^4	25.8×10^4	67.0×10^4	

NIVEL ERLLENMEYER (2do. experimento)					
MEDIOS DE CULTIVO					
1	3	4	5	6	
1ra. Fase:					
μ : 1.74(0.84)	1.57(0.12)	1.61(0.25)	1.62(0.31)	1.55(0.35)	
TG: 0.65	0.64	0.63	0.63	0.66	
2da. Fase:					
μ : 0.48(0.05)	1.03(0.36)	0.23(0.22)	0.60(0.10)	0.45(0.40)	
TG: 2.09	1.03	7.99	1.67	3.59	
Fluorescencia:					
I: 19	14	14	14	14	
F: 903	890	368	582	545	
Num. Cel./ mL:					
I: 22.6×10^3	16.2×10^3	16.2×10^3	16.2×10^3	16.2×10^3	
F: 10.8×10^5	92.6×10^4	48.5×10^4	74.0×10^4	61.6×10^4	

experimento, con una doble concentración de los nutrientes mayores.

Las curvas de crecimiento se reportan en la figura 18, los parámetros poblacionales en la tabla XXXII y los resultados de los análisis estadísticos de ambos experimentos en las tablas XXXIII, XXXIV y XXXV.

Para el primer experimento, no se cumplió la condición de homogeneidad de varianza que es una de las que fundamenta la prueba de covarianza motivo por el cual se decidió comparar los valores promedio de las tasas diarias de crecimiento calculadas por cada uno de los tres matraces de cada medio, durante la fase de crecimiento exponencial. Estos datos se emplearon para una prueba de análisis de varianza de una vía.

Los resultados del análisis de varianza demuestran que los cultivos en medios alternativos enriquecidos con quelantes no tienen un crecimiento significativamente diferente del obtenido con el medio control. En el caso del enriquecimiento con vitaminas, éste resultó similar al obtenido con el medio más sencillo y a la vez no diferente de los otros medios (tabla XXXIII).

En el caso del segundo experimento, en el cual los enriquecimientos se agregaron cinco días después del inóculo,

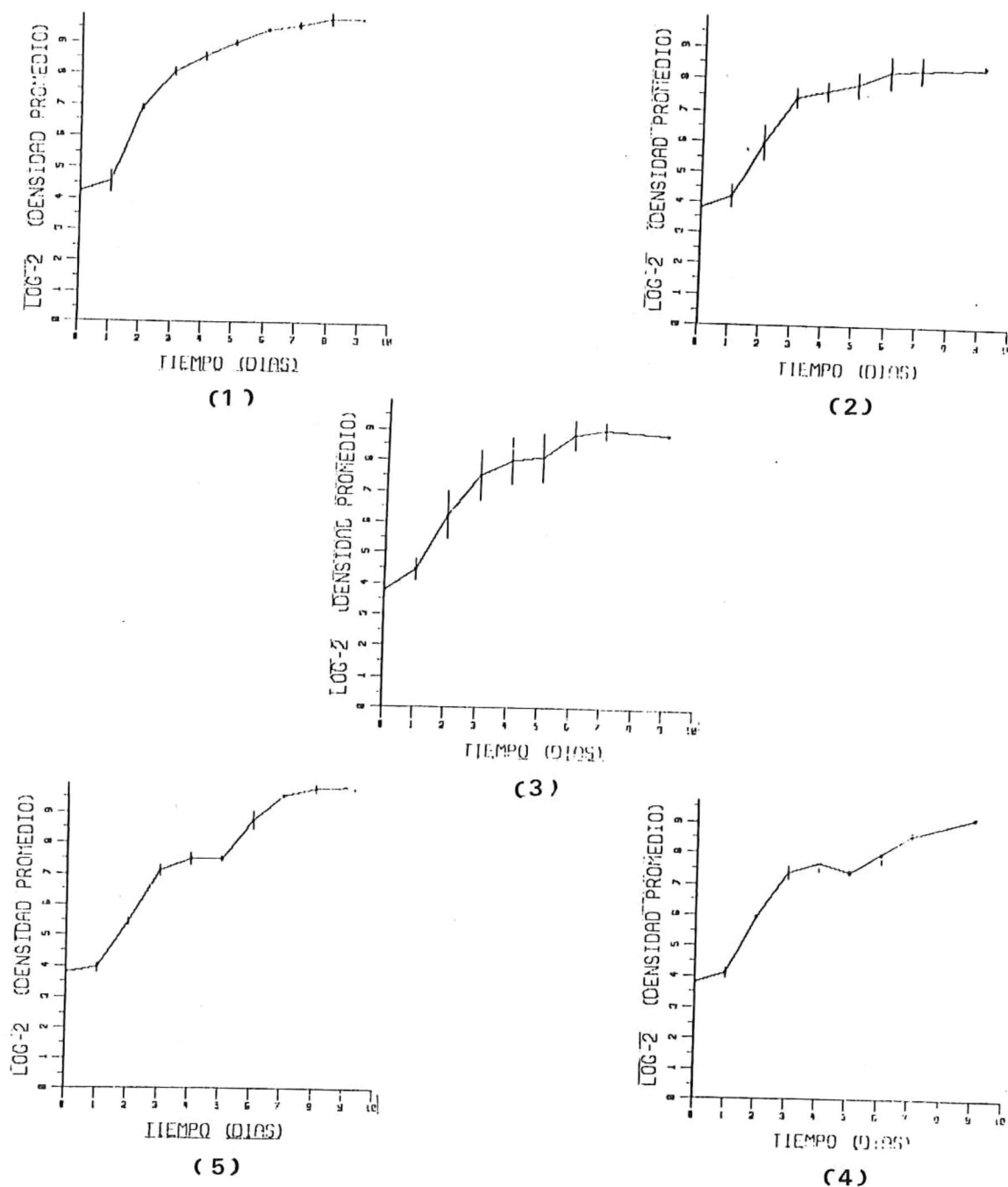


Figura 18. Curvas de crecimiento de los cultivos en Erlenmeyer (segundo experimento) de Tetraselmis suecica. 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) sola; 3: ESW más nutrientes; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

Tabla XXXIII. Análisis de varianza paramétrico de una vía y comparaciones múltiples utilizando las tasas de crecimiento de la fase exponencial de *Tetraselmis suecica* a nivel Erlenmeyer (primer experimento), con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) más vitaminas; 3: ESW más FeEDTA solo; 4: ESW sola; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
GLOBALMENTE					
N			45		
NORMALIDAD			ACEPTA*		
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS.			0.1668*		

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	g.d.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Probabilidad exacta
Entre grupos	4	7.6370	1.909	4.717	0.003
Dentro de gpos.	40	16.1890	0.405		
Total	44	23.826			

Comparaciones múltiples vía S.N.K.

3	1	5	2	4

Tabla XXXIV. Análisis de covarianza con las mediciones de fluorescencia para la primera fase de crecimiento de Tetraselmis suecica a nivel Erlenmeyer (segundo experimento) con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2,3,4 y 5: agua de mar enriquecida (ESW) sola.

PRUEBA ESTADISTICA	MEDIOS DE CULTIVO				
	1	2	3	4	5
INDIVIDUALMENTE:					
N	9	9	9	9	9
NORMALIDAD	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*	ACEPTA*
LINEALIDAD	0.8561*	0.4726*	0.2966*	0.9349*	0.9363*
GLOBALMENTE:					
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS				0.9980*	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (b)				0.9836*	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (a)				0.6901*	

Tabla XXXV. Análisis no paramétrico de dos vías y prueba de comparaciones múltiples, utilizando las tasas de crecimiento de la segunda fase de crecimiento de Tetraselmis suecica a nivel Erlenmeyer (segundo experimento) con los siguientes medios de cultivo: 1: medio control "f"; 2: agua de mar enriquecida (ESW) sola; 3: ESW más nutrientes; 4: ESW más FeEDTA solo; 5: ESW más FeEDTA con metales traza.

Tabla de Análisis de Varianza

F. de Variación	g.d.l.	Valor de Ji ²	Probabilidad
Factor: Medio	4	10.666	0.0306 (*)

Comparaciones múltiples vía S.N.K.

<u>4</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>2</u>
		<u> </u>		

se comparó primeramente, a través de una prueba de análisis de covarianza, el crecimiento en medio "f" durante los tres días de la fase exponencial, con el obtenido en el mismo período en los doce matraces del medio ESW, sin que se obtuviera una prueba de diferencia en el crecimiento (tabla XXXIV).

Los datos obtenidos a partir del momento del enriquecimiento no cumplieron con la condición de homogeneidad de varianzas, motivo por el cual se compararon los valores de la tasa de crecimiento calculados por cada uno de los tres matraces de cada medio. Dado que estos datos tampoco cumplieron con la condición de homoscedasticidad, se procedió a la prueba no paramétrica de análisis de varianza de una vía, a través de la cual se pudo demostrar un crecimiento significativamente mayor en los cultivos enriquecidos con el quelante FeEDTA con respecto a todos los demás medios, que no resultaron diferentes entre sí (tabla XXXV).

VI.-DISCUSIONES

Phaeodactylum tricornutum

(PH-T-1, figura 19)

Se eligió trabajar con esta especie ya que, a pesar de ser considerada como "maleza" por sus características de adaptabilidad y de competitividad, que muy a menudo resultan en la contaminación con esta especie de cultivos de especies diferentes. Es utilizada en la acuicultura para la alimentación de algunos organismos filtradores para los cuales tiene una calidad dietética igual a la de otras microalgas que son más difíciles de cultivarse (Cordero-Esquivel, C.I.C.E.S.E., com. pers.).

Los resultados de los experimentos llevados a cabo durante esta investigación confirman la adaptabilidad de esta especie a varios medios simplificados, en los cuales demostró tasas de crecimiento y producción final de biomasa equivalentes a los obtenidos en el medio más complejo "f". Sin embargo, parece importante hacer notar que, aunque sólo a nivel cualitativo, se notaron mejores tasas de crecimiento y biomasa finales en los cultivos enriquecidos con el quelante EDTA. Esto hace sospechar una posible alta concentración de metales libres en el sistema de agua de mar recirculante del CICESE, lo cual coincide con observaciones análogas, realizadas en otras

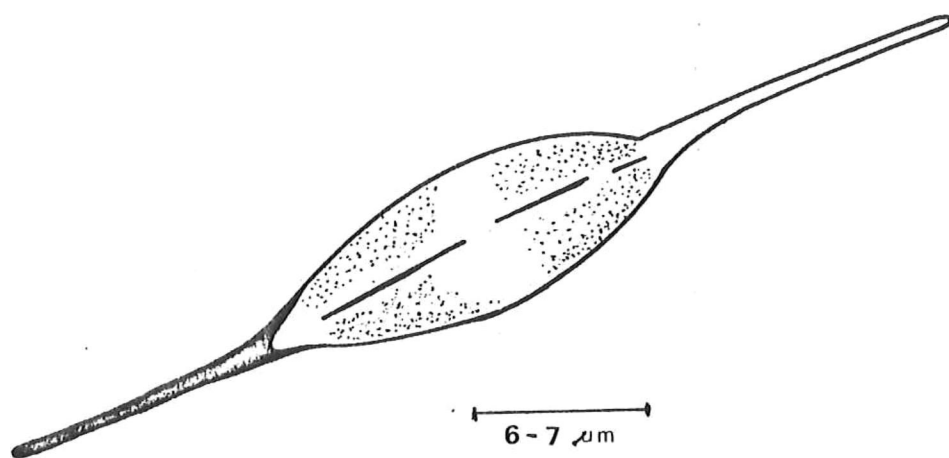


Figura 19. Phaeodactylum tricornutum Bohlin.

ocasiones en ese sistema (Dr. D. Voltolina, C.I.C.E.S.E., com. per.)

Otra observación que parece importante, y que fue notada en otras ocasiones con esta cepa (López-Elías, 1990), es que Phaeodactylum tricornutum mantenido en el medio "f" tiene una forma particular de multiplicación, que resulta en la formación de cadenas de hasta 20 a 30 células adheridas lateralmente, y eventualmente en la precipitación de estas cadenas con la consiguiente caída del cultivo. Este fenómeno es ausente o por lo menos muy limitado en los medios simplificados que se ensayaron, cuya utilización es por lo tanto altamente recomendable.

Skeletonema menzelii

(figura 20)

Esta cepa fue aislada en el laboratorio de acuicultura del C.I.C.E.S.E. y se mantuvo junto con otros aislamientos clonales de la misma especie debido a sus pequeñas dimensiones (3-4 μm), y al hecho que las cadenas formadas por esta especie, muy difícilmente son compuestas por más de dos ó tres células. Esto haría de esta una especie aceptable para organismos microfiltradores, como por ejemplo los primeros estadios larvales de moluscos, ya que en la actualidad se acostumbra alimentarlos con cultivos de Pavlova lutheri o de varias especies de Isochrysis, que son difíciles de mantener en cultivos masivos en condiciones rústicas (Regan, 1988), sobre todo en la situación climática de esta región.

Los datos obtenidos parecen indicar que esta especie acepta medios simplificados y que puede crecer en ellos con tiempo de generación cercanos o inferiores a 0.5 días.

Se ha observado que los cuatro aislamientos clonales de esta especie existentes en el laboratorio de acuicultura del C.I.C.E.S.E., así como la cepa originalmente aislada por Guillard et al. (1974), presentan todas velocidades de crecimiento muy similares a la medida para esta, pero que todas comparten la misma característica de producir abundantes

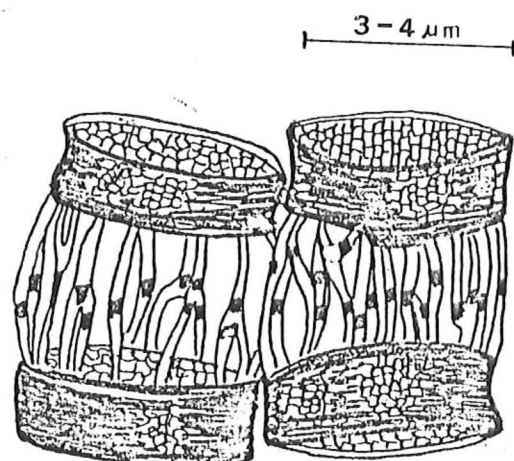


Figura 20. Skeletonema menzelii Guillard, Carpenter y Reimann.

cantidades de sustancias extracelulares que causan la adhesión de varias cadenas y la formación de grumos, lo cual resulta en un rápido decaimiento del cultivo poco tiempo después de su inóculo.

De hecho, durante el segundo experimento los recipientes tuvieron que airearse violentamente con un anillo completo de aireación en el fondo, que de todas formas no pudo evitar la parcial sedimentación del cultivo, que hubo también que agitarse manualmente varias veces al día.

Por este motivo se decidió eliminar esta cepa de la colección de C.I.C.E.S.E., manteniendo algunas de las demás para ulteriores investigaciones dirigidas a definir nuevas condiciones de cultivo para minimizar la producción de sustancia extracelular, ya que esta especie sólo podría ser considerada como candidata para cultivos masivos cuando se elimine este problema.

Skeletonema costatum

(SK-C-2, figura 21)

Esta cepa, que proviene de la colección del Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, W. Boothbay Harbor, MA, E.U.A., es la más ampliamente utilizada para la alimentación de larvas de Penéidos y es notoria su incapacidad de producir biomasas considerables en medios simplificados. A pesar de esto, se consideró deseable intentar su cultivo con variaciones del medio base simplificado, ya que al cambiar la fuente de agua de mar se introduce un factor desconocido, debido a la posible presencia de vitaminas u otros factores de crecimiento.

Los resultados obtenidos en las dos series de experimentos indican que, mientras es posible mantener Skeletonema costatum en medios simplificados, su crecimiento en todos los medios ensayados es errático y frecuentemente menor de lo que se puede obtener en el medio complejo empleado como control. Por este motivo y por toda la información que existe en la literatura (Carlucci y Bowes, 1970; Paasche, 1977) se considera poco fructífero seguir con esta línea de investigación con ésta cepa y se sugiere que, si se considerara excesivo el costo del medio de cultivo, la mejor línea de investigación a seguirse sería la de la búsqueda de otra especie de microalga que tenga el mismo valor dietético de Skeletonema costatum, y que a la vez acepte con mayor facilidad medios simplificados y de menor costo.

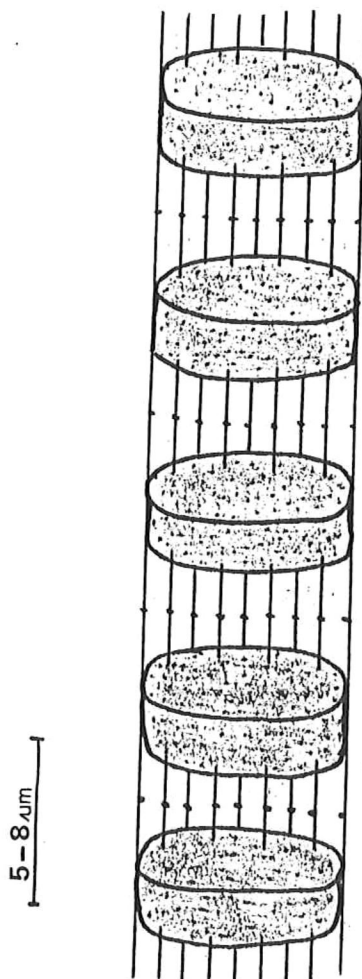


Figura 21. Skeletonema costatum Cleve.

Chaetoceros sp.

(CH-X-3, figura 22)

Esta cepa fue aislada en el laboratorio de C.I.C.E.S.E. de una muestra extraída de una zona cercana a un vertedero de desechos orgánicos, y se mantuvo en el cepario del C.I.C.E.S.E. debido a sus pequeñas dimensiones (3 a 6 μ m) y sobre todo por el hecho de que está provista de setas muy cortas, lo cual la haría deseable para la alimentación de organismos que requieren de células de pequeñas dimensiones.

De los datos obtenidos se desprende que la cepa tiene un buen potencial, debido a sus tiempos de generación que indican que se podrían lograr por lo menos entre dos y tres divisiones por día, pero que para esto la especie requiere de medios más complejos que el medio alternativo y sus variantes que se ensayaron para este trabajo. Resultados posteriores, obtenidos en el laboratorio del C.I.C.E.S.E. por la Biól. Blanca Espinosa Partida (Secretaría de Pesca, Dirección General de Acuacultura, Delegación de Ensenada), confirman la escasa adaptabilidad de esta cepa a medios simplificados, ya que se pueden obtener en ocasiones tasas de crecimiento cercanas o iguales a las que se obtienen con el medio "f", pero por períodos muy cortos lo cual resulta en una producción inferior de biomasa y en la degeneración rápida del cultivo, debido a la gran cantidad de células anormales.

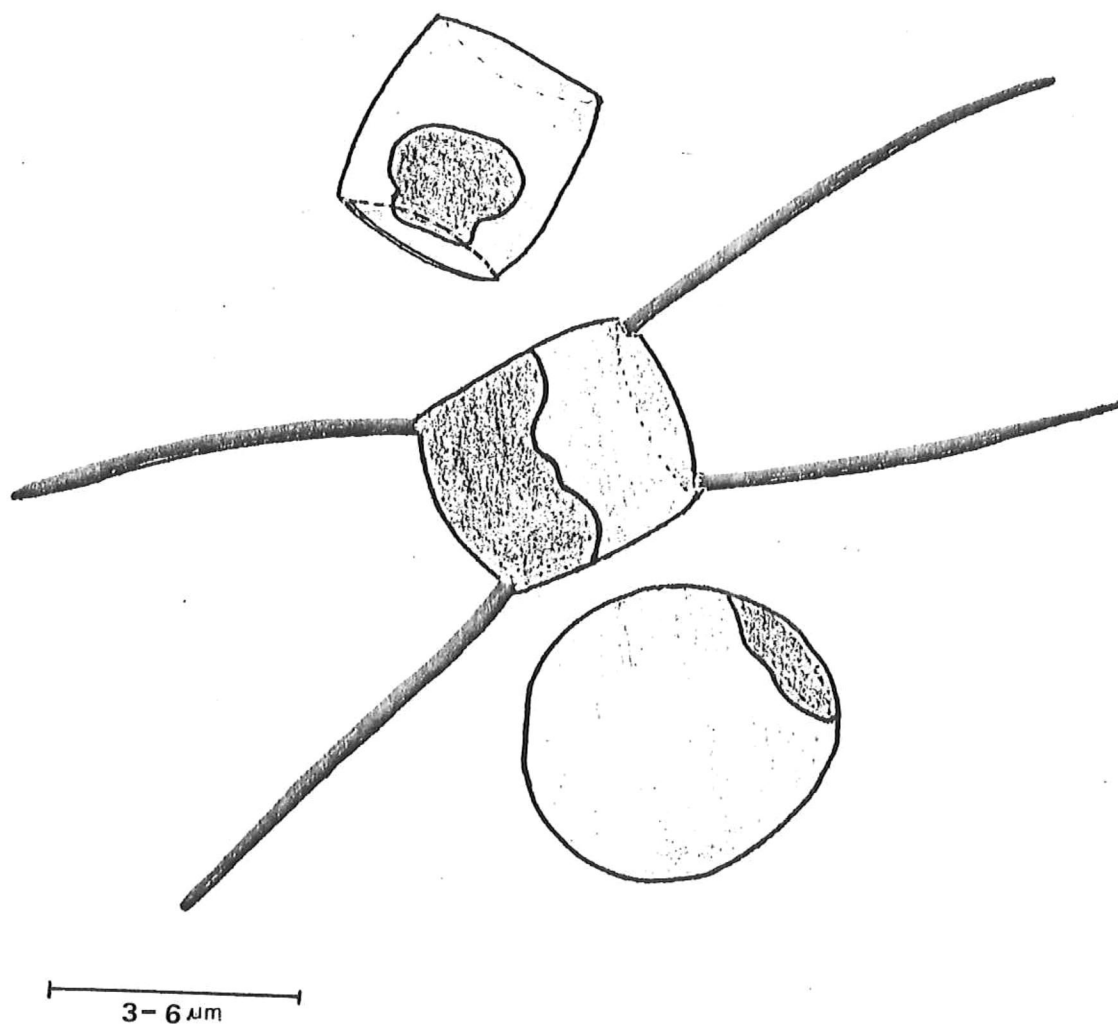


Figura 22. Chaetoceros sp.

Isochrysis sp.

(IS-X-1, figura 23)

Isochrysis sp. es una cepa de gran importancia en la acuicultura, dado que se utiliza para la alimentación de la gran mayoría de los organismos marinos cultivados (Regan, 1988).

Es por esta importancia, que se consideró conveniente averiguar la posibilidad de cultivarla con medios simplificados, a pesar de las varias indicaciones existentes en la literatura (e.g. López-Elias, 1990), que indican la preferencia de esta especie por medios complejos.

Los datos obtenidos indican la posibilidad de cultivar esta cepa con medios relativamente más sencillos que el medio "f", aunque a través del uso de éstos puede aumentar el riesgo de obtener crecimientos erráticos, como lo indican los altos valores de desviación estándar obtenidos con estos medios (ver figura 12).

La falta de diferencia de crecimiento entre los cultivos mantenidos en los medios "f" y ESW durante la primera fase del segundo experimento, se debe probablemente al hecho que se emplearon inóculos de cultivos que se encontraban en fase exponencial de crecimiento. De todas formas, no se elimina la

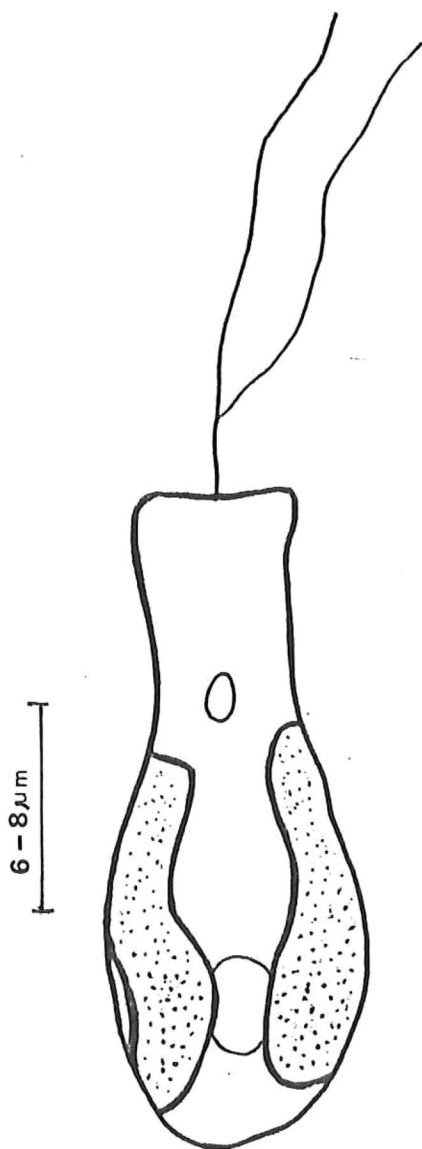


Figura 23. Isochrysis sp.

alta variabilidad entre réplicas obtenida en cada uno de los de los medios alternativos probados, lo cual confirma los resultados obtenidos por López-Elias (1990), quien llegó a conclusiones análogas a las aquí reportadas, sobre el alto factor de riesgo que involucra el uso de medios simplificados para el cultivo de esta cepa.

Pavlova lutheri

(PA-L-1, figura 24)

Esta es una especie de gran importancia en la práctica acuicultural, sobre la cual existe una enorme literatura que comprueba su elevado valor dietético para todas las especies de filtroalimentadores con las cuales ha sido ensayada (De Pauw y Persoone, 1988; Regan, 1988). Su eficiencia como alimento ha sido comprobada inclusive para juveniles de organismos ramoneadores como el abulón (G. Whyte, Pacific Trident Mariculture Victoria, B.C., Canada, com. pers. al Dr D. Voltolina del Depto. de Acuicultura del C.I.C.E.S.E.).

Por este motivo se juzgó importante intentar su cultivo en medios simplificados, ya que en general se reconoce que esta es una especie con requerimientos nutricionales complejos (Droop, 1968; López-Elias, 1990), pero que es posible cultivarla en medios sencillos, siempre y cuando existan en el agua fuentes de sustancias orgánicas (Paniagua-Michel y Buckle-Ramírez 1984; Granados-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984; Sánchez-Saavedra, 1989).

Los resultados de los experimentos llevados a cabo con esta cepa demuestran que es posible cultivarla con medios simplificados, y obtener crecimiento y biomasa equivalentes a los que se obtienen con medios más complejos.

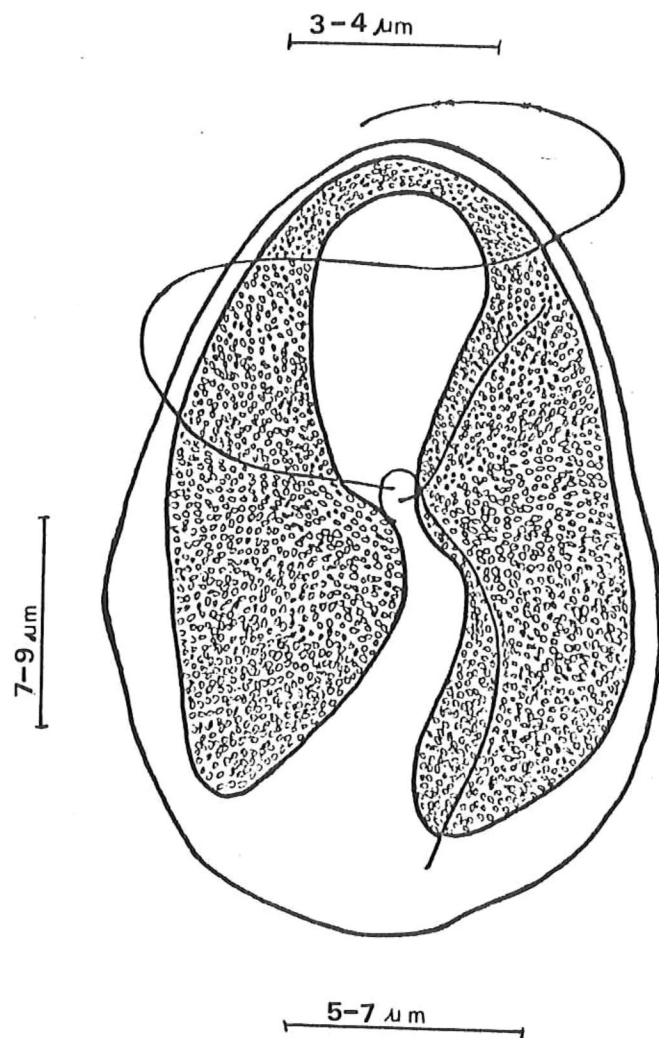


Figura 112. Pavlova lutheri (Droop) Green.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el segundo experimento demostró una alta variabilidad entre las réplicas de los cultivos en medio simplificado, más evidente en la variante con doble cantidad de nutrientes, ya que se debe al crecimiento muy lento de uno de los cultivos. Este hecho hace pensar que el uso de este medio podría conllevar un riesgo elevado, debido a la disparidad e irregularidad del crecimiento de los cultivos mantenidos en él.

También es importante hacer notar que la fuente de agua de mar pudo haber influido sobre los resultados, dado que se utilizó agua de un sistema recirculante, en el cual se pueden acumular sustancias orgánicas de fuentes diferentes, que pueden funcionar como factores de crecimiento.

Esta consideración es importante sobre todo para especies que, como ésta, son conocidas por sus requerimientos de vitaminas (Droop, 1968). Si bien la estadística no comprobó diferencias, cabe subrayar la regularidad de los cultivos en medio enriquecido con vitaminas y la mayor biomasa que se obtuvo con ellos, lo cual parece confirmar lo enunciado.

Nannochloris sp.

(NA-X-1, figura 25)

Varias cepas de Nannochloris han sido reportadas como de interés para cultivos masivos (Paniagua-Michel et al., 1986), por lo cual se decidió experimentar con la existente en el cepario del C.I.C.E.S.E.

Los resultados obtenidos indican que esta cepa presenta una forma de crecimiento que la hace poco recomendable para cultivos en suspensión, ya que la célula no se reproduce binariamente, sino que se forman células madres de grandes dimensiones (hasta diez veces el diámetro de la célula vegetativa, lo cual representa una diferencia en volumen de aproximadamente tres ordenes de magnitud), y por esto precipitan rapidamente al fondo e inician el proceso de división, formándose en su interior un gran número de células vegetativas de pequeñas dimensiones.

Este proceso causa, evidentemente debido a la producción de sustancias extracelulares, el fenómeno de adhesión ya descrito y la consiguiente formación de una capa de material orgánico sobre el fondo del recipiente, en el cual proliferan bacterias y quedan atrapadas grandes cantidades de la microalga cultivada.

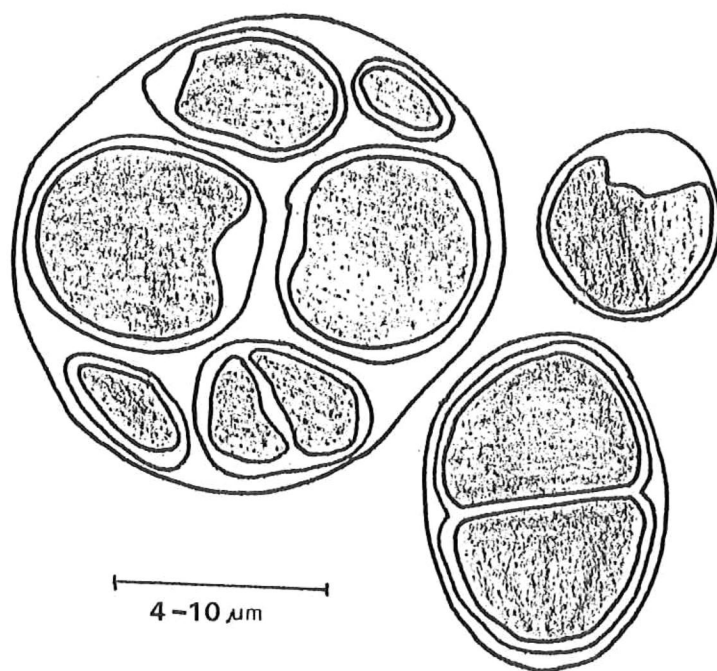


Figura 25. Nannochloris sp.

La cepa es evidentemente poco adecuada para fines acuiculturales, pero podría ser de interés en cultivos de otro tipo, motivo por el cual se decidió mantenerla en el cepario para estudios posteriores.

Tetraselmis suecica

(TE-S-1, figura 26)

Tetraselmis suecica, como otras especies congéneres, se emplea frecuentemente en acuicultura en la alimentación de organismos que pueden filtrar células de las dimensiones relativamente grandes que caracterizan este género (Paniagua-Michel et al., 1986), a pesar de los problemas presentados por la adhesión de parte de la biomasa producida (Butcher, 1959).

Los ensayos llevados a cabo durante este trabajo demuestran la factibilidad de cultivar esta especie en medios simplificados, dado que por lo menos en uno de los experimentos las tasas de crecimiento obtenidas en el medio más simplificado no resultaron diferentes de las del medio control.

La discrepancia entre el primero y segundo experimento, por lo que se debe a crecimiento en el medio ESW, es muy probablemente debida a la alta concentración de iones metálicos libres en el agua del sistema empleada para la formulación de los medios, dado que durante el primer experimento los crecimientos obtenidos con los medios quelados fueron significativamente mayores que en el medio más sencillo.

El segundo experimento se llevó a cabo después de que el

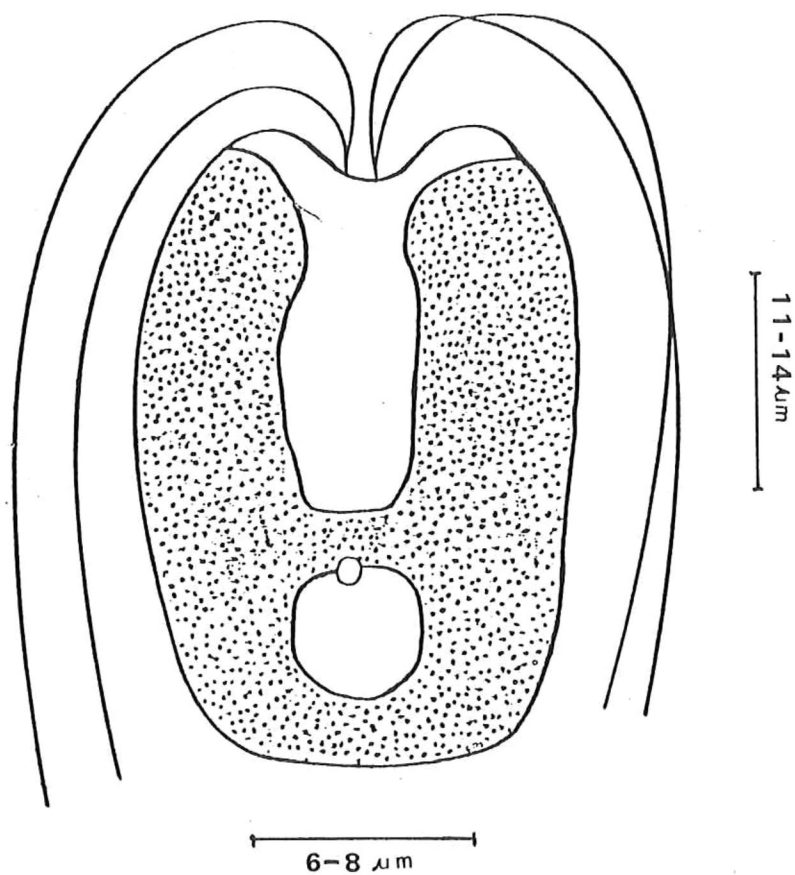


Figura 26. Tetraselmis suecica (Lylin) Butch.

50% del agua del sistema fue substituido con una igual cantidad de agua de mar natural, y el efecto benéfico de tal dilución quedó demostrado por las mayores tasas de crecimiento obtenidas durante la primera fase.

Los resultados de la segunda fase sirvieron para confirmar lo enunciado, ya que todos los medios no demostraron una reacción positiva a los enriquecimientos, con la única excepción de la variante para la cual se empleó solamente el quelante FeEDTA sin la mezcla de metales traza.

VII.-CONCLUSIONES

Una vez discutidos los resultados obtenidos por cada una de las especies de microalgas estudiadas, se puede llegar a las conclusiones siguientes:

Las especies que mejor se adaptaron al medio simplificado ESW y/o aceptaron alguna de sus variantes, con un crecimiento similar o igual al medio control "f" fueron:

Phaeodactylum tricornutum, la cual aceptó el medio más sencillo ESW y todas sus variantes, con una producción de biomasa similar al medio "f" en la variante con FeEDTA. El uso de medios alternativos causa un crecimiento más regular, que lo hace más aceptable acuiculturalmente. Al igual que P. tricornutum, el crecimiento de la cepa de Skeletonema menzelii en el medio simplificado y en su variante con FeEDTA fue comparable al obtenido en el medio control, con tiempos de generación cercanos o inferiores a 0.5 días. La desventaja de ésta, al igual que las demás cepas de esta especie es que, debido a su velocidad de crecimiento, empieza a producir grandes cantidades de sustancias extracelulares que causan la formación de grumos, lo cual hace que el cultivo decaiga en un período de tiempo relativamente breve. En lo que respecta a Skeletonema costatum, ésta es una cepa que no aceptó medios

alternativos ya que se pudo observar que durante los pocos días que se mantuvo en los medios simplificados el crecimiento fue errático y con una producción insignificante de biomasa.

Chaetoceros sp. aceptó el medio ESW y su variante con vitaminas, alcanzando con esta última, tasas de crecimiento cercanas a las del medio control, pero por períodos de tiempo muy cortos. Esto resulta en una producción inferior de biomasa y en una degeneración rápida del cultivo.

Las microalgas Isochrysis sp. y Pavlova lutheri también pueden ser mantenidas en medios simplificados: Las variantes con el quelante FeEDTA y con vitaminas resultaron las mejores para la primera y la segunda cepa respectivamente, ya que ambos medios resultaron en una producción de biomasa similar a la obtenida en los controles, aunque en un tiempo más largo. En las dos cepas se observó una alta variabilidad entre réplicas de los cultivos en medios simplificados. Por lo tanto el uso de éstos puede aumentar el riesgo de obtener crecimientos erráticos y, en el caso de P. lutheri, que es una cepa que crece muy lentamente, se aumenta también el riesgo de contaminación.

En el caso de Nannochlorys sp., la concentración de salinidad más adecuada para mantener la mayor concentración de biomasa en suspensión es de 24 p.p.t., con la cual se cultivó

en el medio ESW alcanzando tasas de crecimiento iguales a las del medio control. La desventaja de la adhesión a las paredes y al fondo del recipiente de cultivo la hace poco adecuada para la producción para fines acuiculturales, donde es necesario mantener las células en suspensión.

Tetraselmis suecica presenta una forma de crecimiento similar a la de Nannochloris sp. pero con la ventaja de ser flagelada lo cual le permite mantener una gran proporción de células en suspensión. Por lo que se refiere a su cultivo, es una cepa que puede crecer en medios sencillos, con una mayor densidad en la variante ESW más FeEDTA.

En resumen, las microalgas que mejor se prestan a ser cultivadas en medios simplificados son Phaeodactylum tricornutum, Skeletonema menzelii, Tetraselmis suecica, Nannochloris sp. y, en menor medida, Isochrysis sp. y Pavlova lutheri. Chaetoceros sp. y Skeletonema costatum, debido a sus altos requerimientos nutricionales, no se prestan a ser cultivadas en medios alternativos.

En general, la variante del medio alternativo que dió mejores tasas de crecimiento y mayores biomásas finales fue el enriquecimiento con FeEDTA, lo cual indica una posible alta concentración de metales libres en el sistema de agua de mar recirculante del laboratorio del Departamento de Acuicultura

del C.I.C.E.S.E.

Todo lo anterior demuestra que la formulación de medios simplificados tiene que hacerse basándose sobre dos aspectos que son igualmente importantes: por un lado, las características biológicas de la microalga que se quiera cultivar, ya que cada una tiene exigencias distintas y diferentes características de resistencia a factores que puedan disminuir ó impedir su crecimiento. Por el otro, las características del agua cuyas concentraciones de nutrientes, vitaminas y demás factores de crecimiento son factores que hay que tomar en consideración al momento de diseñar un medio de cultivo.

El hecho que un determinado medio alternativo, haya funcionado en una determinada situación, no significa necesariamente que ese mismo medio pueda mantener un igual crecimiento de la misma microalga en situaciones geográficas diferentes, o cuando varíe la fuente de abastecimiento de agua, lo cual se pudo observar en algunos de los experimentos descritos en este trabajo.

VIII.-RECOMENDACIONES

La formulación de un medio simplificado adaptado a las necesidades de algunas especies de interés tiene que diseñarse basándose en las características biológicas de la microalga a cultivar.

Es importante diseñar medios alternativos para especies de gran interés comercial, pero a veces resulta difícil encontrar un medio sencillo para crecer microalgas de altos requerimientos nutricionales como en el caso de Chaetoceros sp. y S. costatum. En estos casos, es recomendable buscar una especie con las mismas características morfológicas y de composición bioquímica que permitan el uso de técnicas y medios de cultivo simplificados, en vez que insistir en la búsqueda de formulaciones alternativas, que a menudo conllevan una alta componente de riesgo.

Se recomienda para la preparación de medios de cultivo, la utilización de fertilizantes que estén disponibles en la región y accesibles al consumidor, siempre y cuando favorezcan el crecimiento de las microalgas. Además es recomendable utilizar microalgas de origen autóctona que cumplan con los requisitos morfológicos y nutricionales para la alimentación de los organismos que se quieren cultivar, ya que esto disminuye el costo y optimiza la producción.

También es necesario realizar mediciones de los parámetros físico-químicos del agua de mar, durante todo el año y principalmente durante la realización del cultivo, para así conocer las condiciones en que se encuentra el agua que será utilizada.

Para obtener resultados que proporcionen mayor información sobre las microalgas estudiadas en un tiempo relativamente corto, es recomendable reducir el número de especies, y realizar estudios sobre su composición bioquímica, su eficiencia nutricional y sobre otros aspectos, dependiendo del interés particular, así como ensayar la eficiencia de éstos medios simplificados en volúmenes mayores de cultivo y comparar los resultados con los obtenidos en éste estudio.

IX.- LITERATURA CITADA

- Allen, E.J. y E.W. Nelson. 1910. On the artificial culture of marine plankton organisms. J. mar. biol. Ass. U. K., 8(n.s.):414-421.
- Beijerinck, M.W. 1890. Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Bot. Zeitung, 48, 725.
- Benoit, R.J. 1964. Mass culture of microalgae for photosynthetic gas exchange. pp. 413-425. En: Jackson, D.F. (ed.). Algae and Man. Plenum Press, New York.
- Borowitzka, M.A. 1986. Micro-algae as sources of fine chemicals. Microbiological Sciences. 3:372-375.
- Burlew, J.D. 1953. Algal Cultures: From the Laboratory to Pilot Plant. Publ. no. 600. The Carnegie Institution, Washington, D.C. 357 pp.
- Butcher, R.W. 1959. An introductory account of the smaller algae of British coastal water. Part I: Introduction and Chlorophyceae. Fish. Invest. Lond. Ser. IV 1, 1-74.
- Canzonier, W. J. y R. Brunetti. 1975. Low-cost continuous algal culture system. 27-31. En: Persoone, G. y E. Jaspers (Eds.). Proc. 10 th. Europ. Symp. Mar. Biol. Ostend, Beileum.
- Carlucci, A.F. y M.P. Bowes. 1970. Production of vitamin B12, thiamine and biotin by phytoplankton. J. Phycol. 6:331-357.
- Darley, W. M. 1987. Biología de las algas. Enfoque fisiológico. Primera edición. Ed. Limusa. México. 518 pp.
- De la Cruz, A.S. y E. Alfonso. 1975. Cultivo masivo de algas plactónicas marinas mediante fertilización. Centro de Información Científica y Técnica. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba. Ciencias. Serie B. Investigaciones Marinas No. 17. abril. 25 pp.
- De Pauw, N. y G. Persoone. 1988. Micro-algae for aquaculture. pp. 197-221. En: Borowitzka, M.A. y L.J. Borowitzka. (ed.). Micro-Algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.

- Droop, M.R. 1955. Some new supra-littoral protista. J. mar. biol. Assoc. U.K. 34:233-245.
- Droop, M.R. 1968. Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in Monochrysis lutheri. J. mar. biol. Ass. U.K. 48:689-733.
- Droop, M. R. 1975. The nutrient status of algal cell in bath culture. J. mar. biol. Ass. U.K. 55:541-555.
- Dunstan, W.M. y D.W. Menzel. 1971. Continuous culture of natural populations of phytoplankton in diluted, treated effluent. Limnol. Oceanogr. 16:623-632.
- Dunstan, W.M. y R.R. Tenore. 1972. Intensive outdoor culture of marine phytoplankton enriched with treated sewage effluent. Aquaculture. 1:181-192.
- Fogg, G.E. y B. Thake. 1987. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. Cap. 2. pp.12-42. Third Edition. The University of Wisconsin Press. London. 269 pp.
- Geldenhuis, D.J., R.D. Walmsley y D.F. Torien. 1987. Quality of algal material produced on fertilizer-tap water medium in outdoors plastic enclosed system. Aquaculture. 68:157-164.
- González-Rodríguez, E. y S.Y. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizer for the mass production of marine algae. Aquaculture. 36:245-256.
- Granados-Machuca, C. y L.F. Buckle-Ramírez. 1984. Cultivo de las microalgas Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con nutrientes producidos por estiércoles biodigeridos. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autóm. México. 11:241-256.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. Cyclotella nana and Detonula confervacea (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Guillard, R.R.L., E.J. Carpenter y B.E.F. Reiman. 1974. Skeletonema menzelii sp. nov., a new diatom from the western Atlantic ocean. Phycologia. 13:131-138.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp. 29-60. En: Smith, W.L. y M.H. Chanley. (eds.). Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York. 338 pp.
- Harder, R. y H. Von Witsch. 1942. Über Massenkultur von diatomeen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 60:146.

- López-Elias, J.A. 1990. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados; evaluación de técnicas analíticas y de producción. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México. 163 pp.
- Margulis, L. 1982. Early life. Van Nostrand Reinhold Co. Ed. Jones Bartlett. 160 pp.
- McLachlan, J. 1973. Growth media-marine. pp. 25-53. En: Stein, J.R. (ed.). Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press, New York. 448 pp.
- Morel, F.M.M., J.G. Rueter, D.M. Anderson y R.R.L. Guillard. 1979. AQUIL: a chemically defined phytoplankton culture medium for trace metal studies. J. Phycol. 15:135-141.
- Paasche, E. 1977. Growth of three plankton diatom species in Oslofjord water, in the absence of artificial chelator. J. exp. mar. Biol. Ecol. 29:91-106.
- Paniagua-Michel, J. de J. y L.F. Buckle-Ramírez. 1984. Cultivo en condiciones controladas de Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con extractos de macrofitas marinas. An. Inst. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 12:59-70.
- Paniagua-Michel, J. de J., L.F. Buckle-Ramírez, C. Granados-Machuca, D.H. Loya-Salinas. 1986. Manual de metodología y alternativas para el cultivo de microalgas. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. Informe especial OC-86-01. 94 pp.
- Paniagua-Michel, J. de J., B.C. Farfán y L.F. Buckle-Ramírez. 1987. Culture of marine microalgae with natural biodigested resources. Aquaculture. 64:249-256.
- Pringsheim, E.G. 1946. Pure Culture of Algae. Their Preparation and Maintenance. Cambridge University Press, New York. 119 pp.
- Provasoli, L., J.J.A. McLaughlin y M.R. Droop. 1957. The development of artificial media for marine algae. Arch. Mikrobiol. 25:392-428.
- Regan, D.L. 1988. Other micro-algae. pp. 135-150. En: Borowitzka, M.A. y L.J. Borowitzka (ed.). Micro-Algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Cultures. CRC

- Press, Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Sánchez-Saavedra, M. del P. 1989. Diseño de un biodigestor aerobico de alimentación periódica y utilización de los nutrientes producidos para el cultivo de microalgas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 120 pp.
- Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. 1977. Metodos Estadísticos. Cuarta impresión. Ed. C.E.C.S.A. 703 pp.
- Soeder, C.J. 1986. An historical outline of applied algology. pp. 25-41. En: Richmond, A. (ed.). Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Sokal R.R. y Rohlf, F.J. 1979. Biometria. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Primera edición. Héroe, S.A. Madrid. España. 832 pp.
- Stein, J.R. 1973. Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, New York. 448 pp.
- Taylor, F.J.R. 1980. Basic biological features of phytoplankton cells. pp. 3-55. En: Morris, I. (ed.). The Physiological Ecology of Phytoplankton. University of California Press, Berkeley. 625 pp.
- Turner, M.F. y Goven, R.J. 1984. Some aspects of the nutrition and taxonomy of fourteen small green and yellow green algae. Botanica Marina. 27:249-255.
- Ukeles, R. 1965. A simple method for mass culture of marine algae. Limnol. Oceanogr. 10:492-495.
- Voltolina, D. 1985. Biomass evaluation in cultures of benthic diatoms: an experimental review of methodology. Royal Roads Military College, Costal Marine Science Laboratory, Internal manuscript series report 85-4. Victoria, B.C. Canada. 42 pp.
- Voltolina, D. 1987. Mass microalgal cultures and water treatment using ozone. Final report contract. CA910-6-0624A. Pacific Trident Mariculture Ltd., Victoria, B.C. Canada. 43 pp.
- Walne, P.R. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves on the genera Ostrea, Crassostrea, Mercenaria and Mytilus. Fish. Invest., London, Ser. II. 26(5):1-62.

- Wilson, K.V. 1956. A distribution-free test of analysis of variance hypothesis. Psychological Bulletin 53(1):96-101.
- Witt, U., P.H. Koske, D. Kuhlmann, J. Lenz y W. Nellen. 1981. Production of Nannochloris spec. (Chlorophyceae) in large-scale outdoor tanks and its use as a food organism in marine aquaculture. Aquaculture. 23:171-181.