

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“CULTIVO DE LA MICROALGA *Tetraselmis suecica*
KYLIN (1935) ALIMENTADA CON UNA FUENTE CO-
MERCIAL DE NITROGENO (UREA)”**

M E M O R I A

Que para obtener el título de:

CURSO DE TITULACION:
“BIOLOGIA MARINA”

O C E A N O L O G O

P r e s e n t a :

José de Jesús Mimbela Sandoval

Ensenada, Baja California, Septiembre de 1987.


" CULTIVO DE LA MICROALGA Tetraselmis suecica KYLIN (1935)
ALIMENTADA CON UNA FUENTE COMERCIAL DE NITROGENO (UREA)"

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

QUE PRESENTA:

JOSE DE JESUS MIMBELA SANDOVAL

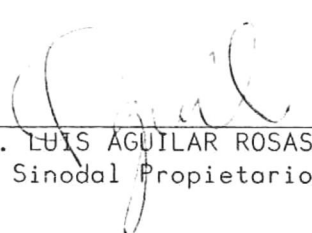
APROBADO POR:



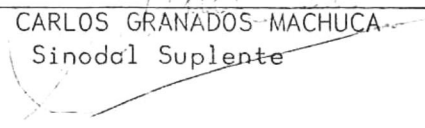
OC. ENRIQUE BALTAZAR VALENZUELA
Presidente del Jurado.



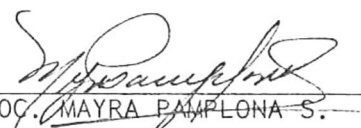
M. EN C. FRANSICO LEY LOU
Sinodal Propietario



OC. LUIS AGUILAR ROSAS
Sinodal Propietario



OC. CARLOS GRANADOS MACHUCA
Sinodal Suplente



OC. MAYRA PAMPLONA S.
Sinodal Suplente.

D E D I C A C I O N

A MIS HIJOS

JOSE DE JESUS

Y MARCOS SALVADOR

A MARY
POR EL APO_YO QUE SIEMPRE
ME HA BRINDADO.

A MIS PADRES Y HERMANOS CON
AGRADECIMIENTO.

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

Mi agradecimiento al Oc. Enrique Baltazar Valenzuela por su dirección consejos y apoyo para el desarrollo de este trabajo

De igual manera al Oc. Carlos Granados Machuca por su dedicación a este curso, así como su colaboración en la parte experimental de este trabajo.

A los maestros que participaron en el curso de titulación y a los que fungieron como sinodales, por sus valiosas críticas y consejos.

RESUMEN

Se llevó a cabo un experimento en el que se cultivó durante 8 días a la microalga Tetraselmis suecica.

Se prepararon volúmenes de 75 ml de los medios de Matthiesen y Torner, y f/2 de Guillard, utilizando los macronutrientes de Guillard y el EDTA, TRIS, micronutrientes y vitaminas de Matthiesen y Torner.

Se sustituyó la fuente de nitrato (NaNO_3), por una fuente de nitrógeno utilizada como fertilizante en la agricultura (urea), variando la concentración de la misma en cantidades de: 50, 25, 10, y 5 mg/l.

Al octavo día del experimento, en el medio control se obtuvo una densidad poblacional de 2.20×10^6 cels./ml, y en los medios en los que se utilizó el fertilizante comercial (urea) 2.83×10^6 cels./ml para la concentración de 50 mg/l., y 1.91×10^6 cels./ml para la concentración de 25 mg/l, encontrándose que no difieren significativamente al nivel alfa de 0.05, presentando un comportamiento similar en las tasas de crecimiento.

Las concentraciones de 10 y 5 miligramos por litro de urea comercial resultarán con un crecimiento muy pobre y rápido

decaimiento por lo que no se consideraran apropiadas.

CONTENIDO

	página
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVO.	5
3. MATERIALES Y METODOS.	6
3.1 Medios de cultivo.	6
3.2 Registro del crecimiento de microalgas.	10
3.3 Análisis estadístico	11
4. RESULTADOS.	12
5. DISCUSIONES.	24
6. CONCLUSIONES.	26
7. RECOMENDACIONES	27
8. LITERATURA CITADA	28
9. ANEXOS	31

LISTA DE FIGURAS

Fig.		Página
1	Crecimiento poblacional de <u>L. suecica</u> en medio con 5 mg/l de urea.	18
2	Crecimiento poblacional de <u>L. suecica</u> en medio con 10 mg/l de urea.	19
3	Crecimiento poblacional de <u>L. suecica</u> en medio con 25 mg/l de urea.	20
4	Crecimiento poblacional de <u>L. suecica</u> en medio con 50 mg/l de urea.	21
5	Crecimiento poblacional de <u>L. suecica</u> en medio con 75 mg/l de NaNO_3 (testigo).	22
6	Curvas de crecimiento de <u>L. suecica</u> a nivel de Erlenmeyer en el medio testigo y las diferentes concentraciones de urea usada (50, 25, 10 y 5 mg /l).	23

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Valores promedios de las lecturas en el hematocitómetro para cada tratamiento.	14
II	Valores poblacionales de <u>L. suecica</u> a nivel Erienneyer en el medio de cultivo control.	14
III	Valores poblacionales de <u>L. suecica</u> a nivel Erienneyer en el medio de cultivo con 50 mg/l de urea.	15
IV	Valores poblacionales de <u>L. suecica</u> a nivel Erienneyer en el medio de cultivo con 25 mg/l de urea.	15
V	Valores poblacionales de <u>L. suecica</u> a nivel Erienneyer en el medio de cultivo con 10 mg/l de urea.	16
VI	Valores poblacionales de <u>L. suecica</u> a nivel	16

Erlenmeyer en el medio de cultivo con 5 mg/l de
urea.

VII Prueba de comparaciones múltiples.

17

1.- INTRODUCCION

Uno de los factores limitantes en el desarrollo de la acuicultura ya sea a nivel experimental o comercial, es la producción del alimento vivo para los estadios larvales de los organismos (Droop, 1975). Los cultivos de microalgas proveen el unico método práctico para alimentar masivamente a estos organismos bajo condiciones controladas, ya que ha demostrado ser el alimento natural mejor aceptado por los estadios larvarios y ha sido usado exitosamente en el cultivo de moluscos (Loosanoff y Davis, 1963).

El tipo de cultivo de fitoplancton más usual es aquel en el cual un medio de volumen limitado, conteniendo los nutrientes orgánicos e inorgánico, es inoculado con un numero relativamente pequeño de células y expuesto a condiciones favorables de luz y temperatura (Fogg, 1965). El agua de mar es la base para la preparación de muchos medios para el cultivo de microalgas marinas, empezando con las fórmulas mas sencillas basadas en la solución de Miquel (1892), hasta las mezclas más complejas actuales (Mattihessen y Torner, 1966, Guillard, 1973)

Entre la gran variedad de medios para el cultivo de fitoplancton como alimento para invertebrados marinos tenemos entre los mas comunmente usados al f/2 de Guillard y al de

Matthiessen y Torner (op. cit.). En ellos se puede observar que presentan un parecido muy similar con el contenido de nutrientes, mas no en la cantidad (Anexo I).

Para el buen funcionamiento de un medio de cultivo de microalgas se requiere de un control de ciertos parámetros fisicoquímicos y concentraciones de nutrientes esenciales que tienen una influencia directa en ellas, estos requerimientos se pueden resumir de la siguiente forma:

a). - Requerimientos nutricionales. - Fuentes de nitrógeno, fosfatos silicatos, elementos traza, agentes quelantes y factores orgánicos de crecimiento.

b). - Parámetros fisicoquímicos. - Fuentes de luz, pH, salinidad y temperatura.

Lo anterior nos indica que los medios tradicionales de cultivo de fitoplancton se realizan enriqueciendo el agua de mar con reactivos especiales, los que se obtienen de casas comerciales a precios muy elevados. Esto, provoca altos costos en dichos cultivos.

Por ello el presente trabajo pretende sustituir el NaNO_3 utilizado en los medios tradicionales de cultivo por una fuente alterna comercial que sea mas económico para el cultivo de las

microalgas.

La especie seleccionada Tetraselmis suecica es una microalga que puede cultivarse con un mínimo de mantenimiento y se considera como una especie de alto valor alimenticio para larvas, semillas y adultos de bivalvos. También se ha usado frecuentemente como alimento de crustáceos (Walne, 1974 Helm, et al, 1979 y Laing y Helm, 1981).

Tetraselmis suecica pertenece al grupo Prasinophyceae (algas de color verde recientemente separadas de las algas propiamente verdes) (Guillard, 1975). La forma de la célula es oval o ligeramente asimétrica, dependiendo de la especie. El contorno de la célula está suavemente redondeado debido a la teca. Los flagelos emergen a través de una ranura de la teca en una depresión apical. Los flagelos son relativamente cortos, siendo sustancialmente menores que la longitud del cuerpo de la célula. En condición no móvil los flagelos desaparecen, y la ranura tecal de la depresión apical se cierra. La división celular se lleva a cabo con las células no móviles. Como parte del proceso de división de la teca se distiende pero no se abre sino hasta que las células hijas están completamente formadas, incluyendo los flagelos y las tecas.

La urea es una de las muchas formas en las que se

encuentra el nitrógeno y que es utilizable por el fitoplancton. Los organismos marinos excretan nitrógeno principalmente como amoníaco, urea, ácido úrico, óxido de trimetilamina y aminoácidos. La capacidad del fitoplancton para usar las diferentes fuentes de nitrógeno son de importancia ecológica para su sobrevivencia. Por otra parte, las deficiencias en nitrógeno se consideran como uno de los factores limitantes más importantes en la producción de fitoplancton (Chu, 1943). La urea es una importante fuente de aportación inmediata de nitrógeno ya que es fácilmente reducida a amoníaco. Chick, 1903, encontró que la urea aporta el 25% de su nitrógeno en la forma de amoníaco.

2 - OBJETIVO

Determinar la concentración adecuada de urea como fuente alterna de nitrógeno referida al medio modificado f/2 de Guillard (1973) y Mattihessen y Torner (1966), en el crecimiento de Tetraselmis suecica.

3. - MATERIALES Y METODOS

Este trabajo fué llevado a cabo en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I. I. O.) de la facultad de Ciencias Marinas de la U. A. B. C., Ensenada, B. Cfa. México. El agua de mar utilizada, así como la cepa de T. suecica se obtuvieron de este mismo laboratorio.

3.1. - Medios de cultivos.

De los medios de cultivo de Guillard (1973), y Matthiessen y Turner (1966), se eligieron las menores concentraciones de nutrientes (Tabla II del anexo), diseñándose así un medio modificado que fue utilizado como control (Tabla III del anexo).

Los elementos que intervienen en la elaboración de un medio de cultivo (Tabla I del anexo), se clasifican en dos tipos: solución stock primaria y solución stock secundaria.

La solución stock primaria esta formada principalmente por un solo macronutriente, y la secundaria esta elaborada con uno o más micronutrientes.

a - Medio modificado a partir de los medios de Guillard (1973) y Matthiessen y Turner (1966).

Nutrientes (solución stock primaria):

Nitrato ----- 75 gr/l
 Fosfato ----- 5 gr/l
 Secuestrante Fe. EDTA --- 10 gr/l
 Tris (Buffer) ----- 200 gr/l (ajustar pH a 7.5 aprox. = 130
 ml de
 1 HCl al 30%).

Metales traza:

Sulfato de cobre ----- 1.90 gr/l
 Sulfato de Zinc ----- 4.40 gr/l
 Cloruro de cobalto ----- 2.00 gr/l
 Cloruro de manganeso ----- 36.00 gr/l
 Molibdato de sodio ----- 1.20 gr/l

Preparación del secuestrante (solución stock secundaria):

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

Vitaminas: (soluciones stock primarias)

Biotina ----- 10 mg/100 ml.
 B12 ----- 10 ml/100 ml.
 Tiamina ----- 2 gr/100 ml.

De esta solución stock primaria o concentrada se realizan diluciones agregándose un ml de esta a 100 ml de agua destilada.

Los ajustes de pH se hacen con HCl (agregando gotas) bajo lectura de un potenciómetro. Las rutinas de trabajo se expresan en el anexo (Tablas III y IV).

Preparación del medio de cultivo control:

Con la ayuda de las soluciones stock se procedió a preparar este medio, de la siguiente forma.

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

1 ml de solución stock de NaN_3

1 ml " " " " $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1 ml de secuestrante

1 ml de TRIS

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

En dos matraces Erlenmeyer de 250 ml. se pusieron 75 ml. del medio preparado de esta forma en cada uno de ellos.

b. -Medios de cultivo con urea:

Se prepararon estos medios utilizando el mismo procedimiento que el seguido en el control, sustituyéndose en este caso al NaNO₃ por concentraciones de la fuente comercial de nitrógeno (urea), de la siguiente forma:

Solución stock. - se preparó diluyendo 50 gr de urea agrícola comercial en un litro de agua destilada.

Obtención de las concentraciones deseadas.

Para obtener una concentración de 50 mg por litro se agregó un mililitro de la solución stock de urea.

Para obtener una concentración de 25 mg por litro se agregó 0.5 ml de esta solución stock.

Para 10 mg por litro 0.2 ml, y para 5 mg por litro 0.1 ml.

De cada uno de estos medios con diferentes concentraciones de urea se transfirieron 75 ml a cada uno de los dos matraces erlenmeyer de 250 ml utilizados en cada concentración.

Los matraces con sus respectivos medios de cultivos se esterilizaron posteriormente en una olla de presión. Concluido el procedimiento de esterilización y una vez enfriado (24 Hrs.), se añadieron las vitaminas cerca de la flama de dos

mecheros tipo Bunsen para prevenir la contaminación de los medios.

Todos los matraces fueron inoculados con dos ml de cultivos monoaxénicos de L. sucica en estado de crecimiento exponencial. La densidad inicial promedio en todos los matraces fue de 36.46×10 células por ml. Los matraces permanecieron en el cuarto de cultivo bajo condiciones de iluminación constante proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca fría. La temperatura del laboratorio se mantuvo aproximadamente constante ($20\text{ C} \pm 2\text{ C}$) por medio de un aparato de aire acondicionado.

3.2. - Registro del crecimiento de microalgas.

Después de inocular los recipientes de cultivo se llevó a cabo el registro del crecimiento, para identificar la etapa de mayor densidad de las microalgas (fase exponencial).

Diariamente a la misma hora (11:00) se extrajeron muestras de 1 ml de cada uno de los matraces de cultivo, utilizando pipetas esterilizadas y cerca de la flama de dos mecheros tipo Bunsen para evitar la contaminación de los medios.

El conteo de las células se llevó a cabo con un hematocitómetro tipo Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Las

muestras se fijaron con dos gotas de lugol para fitoplancton marino, versión ácida a fin de inmovilizarlas y lograra un mejor conteo.

3.3. - Análisis estadístico.

Para conocer si la densidad de células estimadas al octavo día del cultivo varió significativamente entre los tratamientos, se hizo un análisis de varianza no paramétrico según la prueba de Kruskal-Wallis, con su prueba a posteriori de comparaciones múltiples (Zar, 1974), con las lecturas obtenidas en el hematocitómetro para cada tratamiento y su repetición.

4. - RESULTADOS:

La tabla I muestra los valores promedios de las lecturas tomadas en el hematocitómetro, para calcular la densidad de células para cada tratamiento y su repetición.

La tabla II muestra los resultados de los cálculos de las variaciones poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo control.

En las tablas III a VI se muestran los resultados de los cálculos de las variaciones poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en los medios de cultivo con 50, 25, 10, y 5 mg/l de urea respectivamente.

Las figuras 1 a 4 muestran el crecimiento de T. suecica para cada día de cultivo con el uso de urea grado comercial del medio de cultivo en concentraciones de 5, 10, 25, y 50 miligramos por litro respectivamente.

La figura número 5 (téstigo) muestra el crecimiento poblacional de T. suecica en el medio de cultivo modificado de Guillard y Mattihessen y Torner (op. cit.).

La figura 6 muestra las curvas de crecimiento de T. suecica a nivel Erlenmeyer tanto del medio de cultivo control

como de cada uno de los tratamientos.

La tabla VII muestra los resultados de la prueba de comparaciones múltiples posterior al análisis de varianza de Kruskal-Wallis, entre el cultivo control y los demás tratamientos experimentales, donde se observa que al nivel de significancia del 5% no existieron diferencias significativas en el número de células encontradas al octavo día del experimento entre el medio de cultivo control y los tratamientos con 50 y 25 mg/l de urea. Lo anterior concuerda con las tendencias gráficas del crecimiento poblacional presentadas en la figura 6.

TABLA I.- Valores promedios de las lecturas en el hematocitómetro para cada tratamiento

TIEMPO EN DIAS	TESTIGO	CONCENTRACION DE UREA			
		50 Mg./l	25 mg./l	10 mg./l	5 mg./l
0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1	2.26	4.94	3.58	2.00	3.75
2	8.75	15.00	14.83	18.75	19.66
3	36.98	58.32	54.83	46.40	42.66
4	94.91	106.83	97.92	67.66	47.25
5	133.42	132.16	131.42	92.83	71.16
6	148.33	185.08	167.57	89.83	56.05
7	189.17	234.17	172.08	97.33	68.75
8	220.08	283.57	191.33	113.42	77.58

TABLA II.- Valores poblacionales de *T. suecica* a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo control

DIA	DEN X 1000 (CEL./ml)	K	MU	PD	TG
0	36.459				
1	22.500	-0.6964	-0.2096	-13.9590	-0.4323
2	87.500	1.9594	0.5898	65.0000	0.1536
3	370.000	2.0802	0.6262	282.5000	0.1447
4	949.200	1.3592	0.4092	579.2000	0.2215
5	1334.200	0.4912	0.1479	384.9998	0.6128
6	1483.300	0.1528	0.0460	149.1001	1.9696
7	1891.600	0.3508	0.1056	408.2998	0.8581
8	2200.800	0.2184	0.0658	309.2002	1.3782

TABLA III.- Valores poblacionales de *T. suecica* a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 50 mg/lt. de urea

DIA	DEN X 1000 (CEL./ml)	K	MU	PD	TG
0	36.459				
1	49.400	0.4382	0.1319	12.9410	0.6869
2	150.000	1.6024	0.4824	100.6000	0.1879
3	583.300	1.9593	0.5898	433.2999	0.1536
4	1068.300	0.8730	0.2628	484.9999	0.3448
5	1321.600	0.3070	0.0924	253.2998	0.9806
6	1850.800	0.4859	0.1463	529.2002	0.6196
7	2341.600	0.3394	0.1022	490.7998	0.8871
8	2835.600	0.2762	0.0831	494.0000	1.0900

TABLA IV.- Valores poblacionales de *T. suecica* a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 25 mg/lt. de urea

DIA	DEN X 1000 (CEL./ml)	K	MU	PD	TG
0	36.459				
1	35.800	-0.0263	-0.0079	-0.6590	-11.4390
2	148.300	2.0505	0.6173	112.5000	0.1468
3	548.300	1.8865	0.5679	399.9999	0.1596
4	979.200	0.8367	0.2519	430.9000	0.3598
5	1714.200	0.8079	0.2432	734.9998	0.3726
6	1675.600	-0.0329	-0.0099	-38.5999	-9.1614
7	1720.800	0.0384	0.0116	45.2000	7.8389
8	1913.300	0.1530	0.0461	192.5000	1.9677

TABLA V.- Valores poblacionales de *T. suecica* a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 10 mg/lt. de urea

DIA	DEN X 1000 (CEL./ml)	K	MU	PD	TG
0	36.459				
1	20.000	-0.8663	-0.2608	-16.4590	-0.3475
2	187.500	3.2289	0.9720	167.5000	0.0932
3	464.200	1.3079	0.3937	276.7000	0.2302
4	676.600	0.5436	0.1636	212.3999	0.5538
5	928.300	0.4563	0.1374	251.7000	0.6597
6	898.300	-0.0474	-0.0143	-30.0000	-6.3515
7	973.300	0.1157	0.0348	75.0000	2.6021
8	1134.100	0.2206	0.0664	160.8000	1.3646

TABLA VI.- Valores poblacionales de *T. suecica* a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 5 mg/lt. de urea.

DIA	DEN X 1000 (CEL./ml)	K	MU	PD	TG
0	36.459				
1	30.500	-0.2575	-0.0775	-5.9590	-1.1692
2	196.600	2.6884	0.8093	166.1000	0.1120
3	426.600	1.1176	0.3364	229.9999	0.2693
4	472.500	0.1474	0.0444	45.9001	2.0418
5	711.600	0.5908	0.1778	239.0999	0.5096
6	560.500	-0.3444	-0.1037	-151.1000	-0.8742
7	687.400	0.2944	0.0886	126.9000	1.0224
8	774.700	0.1725	0.0519	87.2999	1.7452

TABLA VII.- Prueba de comparaciones multiples

PAREJA	DISCREPANCIA OBSERVADA	DISCREPANCIA MAX. COMPATIBLE	DESICION AL 5.00% DE SIG.
(1, 2)	1.500	3.543	NO SIGNIFICATIVA
(1, 3)	1.500	3.543	NO SIGNIFICATIVA
(1, 4)	4.000	3.543	SIGNIFICATIVA
(1, 5)	6.000	3.543	SIGNIFICATIVA

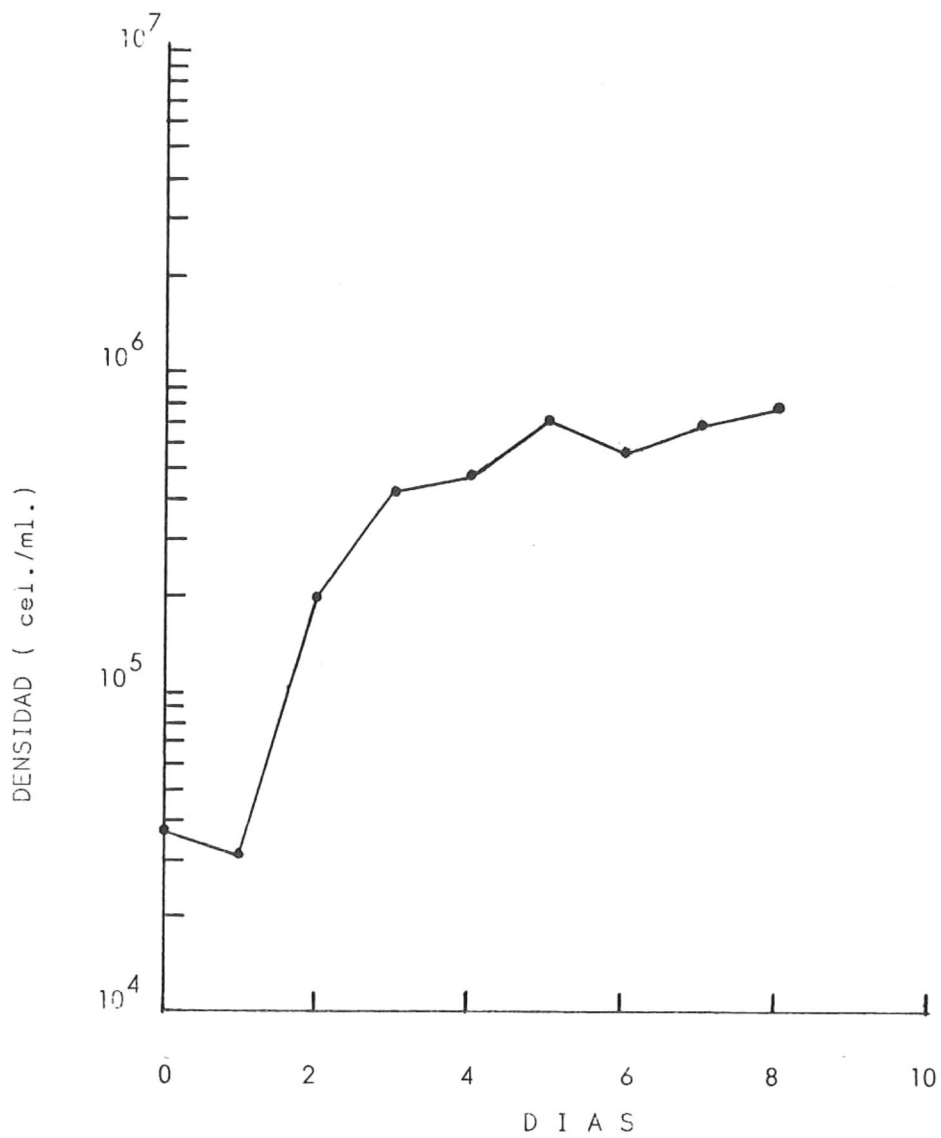


FIGURA No. 1.- Crecimiento poblacional de I. suecica en medio con 5mg/lt. de urea.

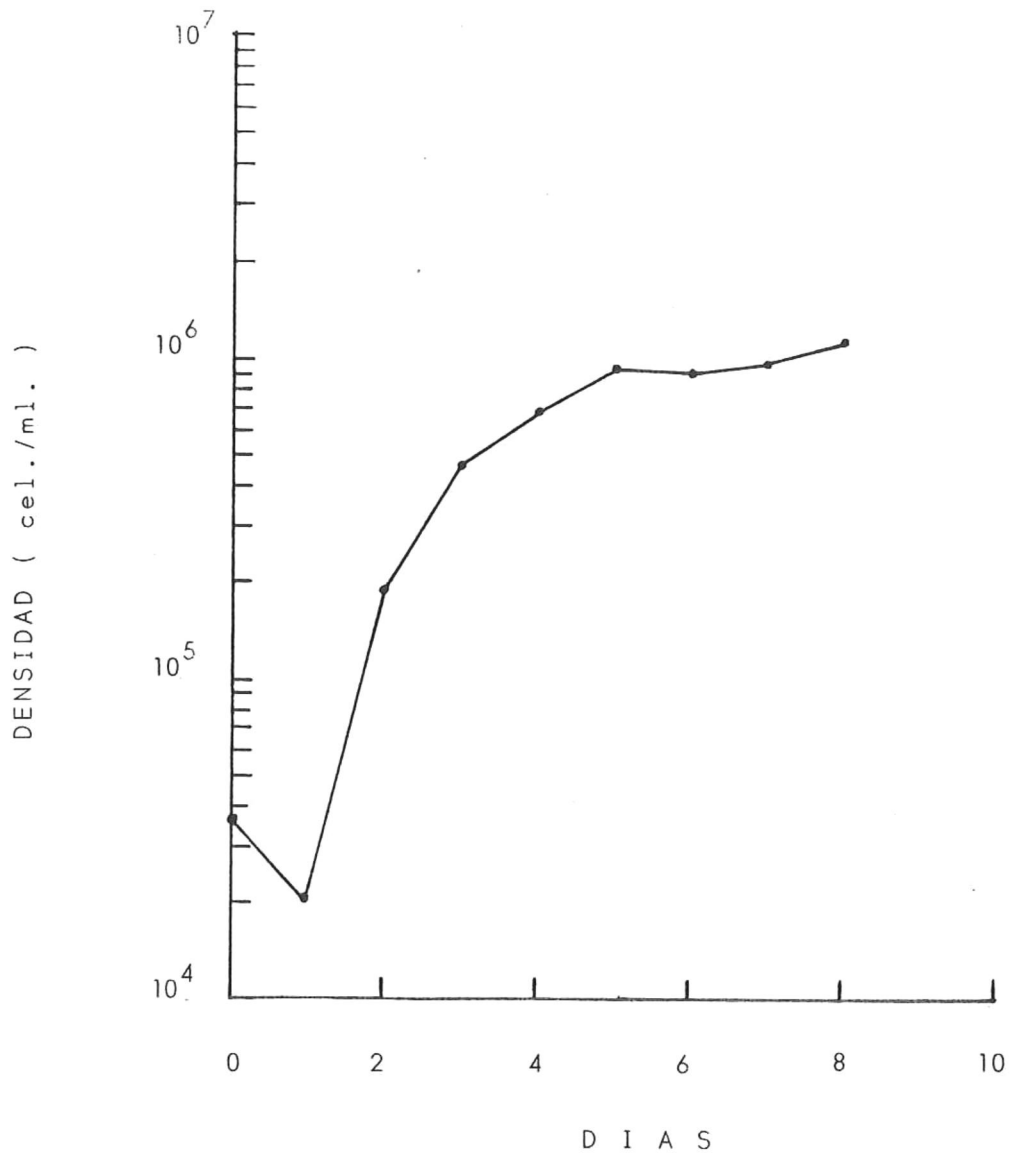


FIGURA No. 2.- Crecimiento poblacional de I. suecica en medio con 10 mg/tl. de urea.

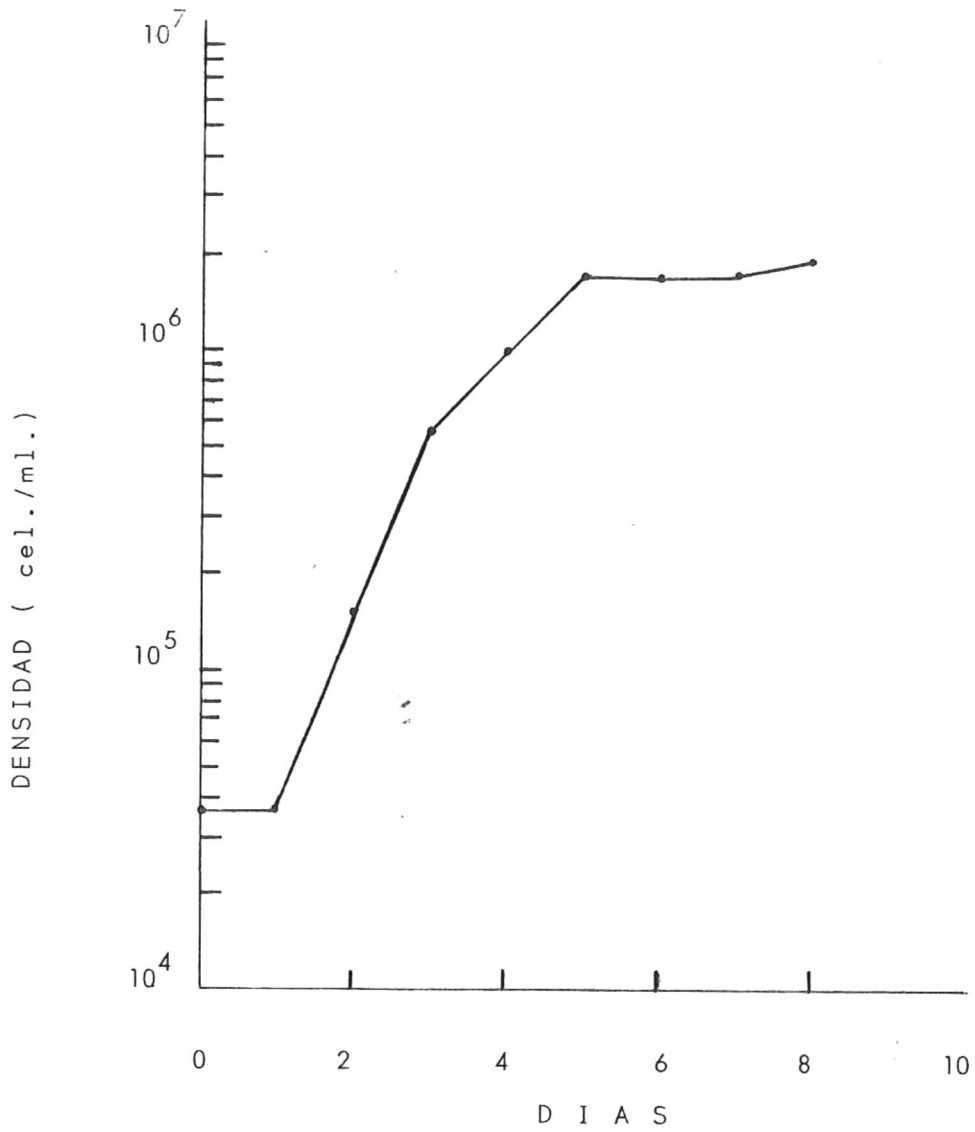


FIGURA No.- 3.- Crecimiento poblacional de I. suecica en medio con 25 mg/lt. de urea.

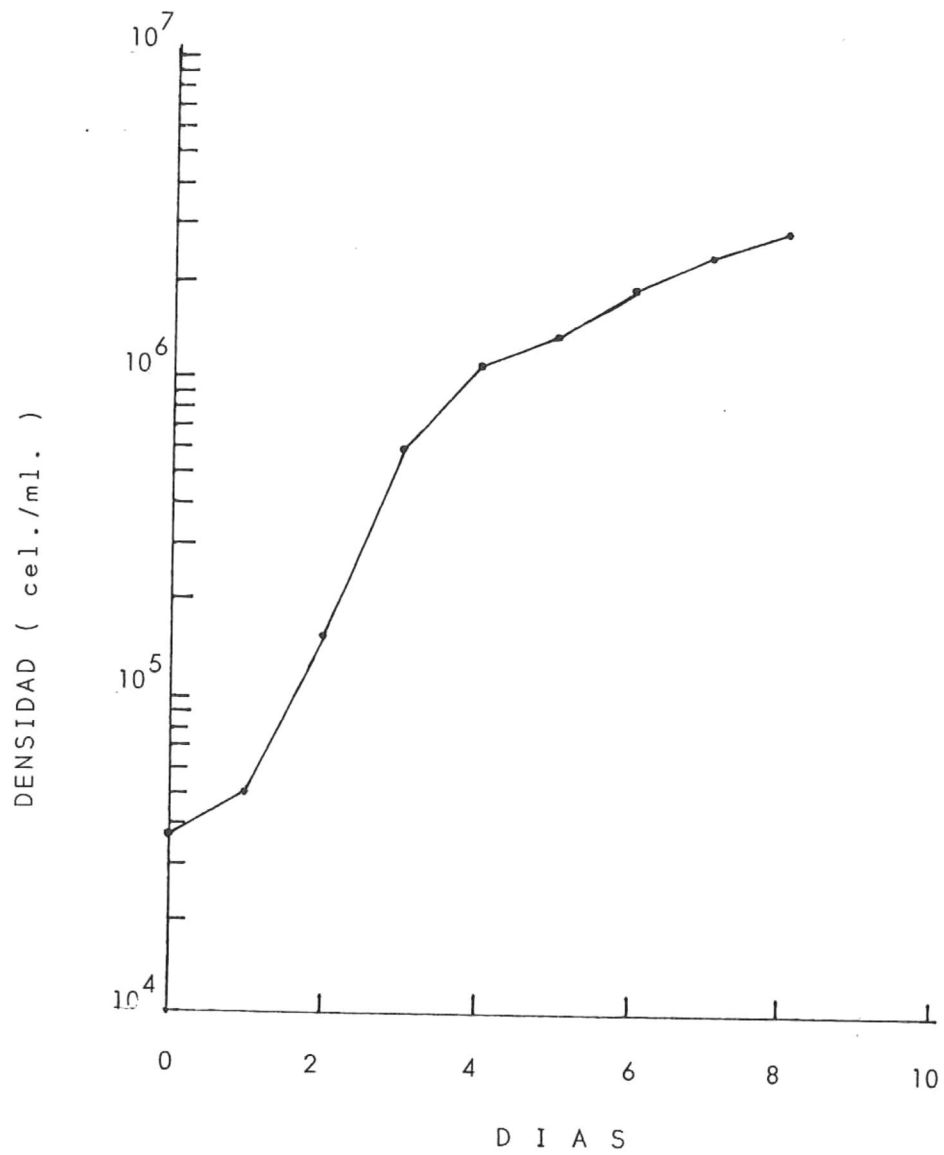


FIGURA No.- 4.- Crecimiento poblacional de I. suedica en medio con 50 mg/lt. de urea.

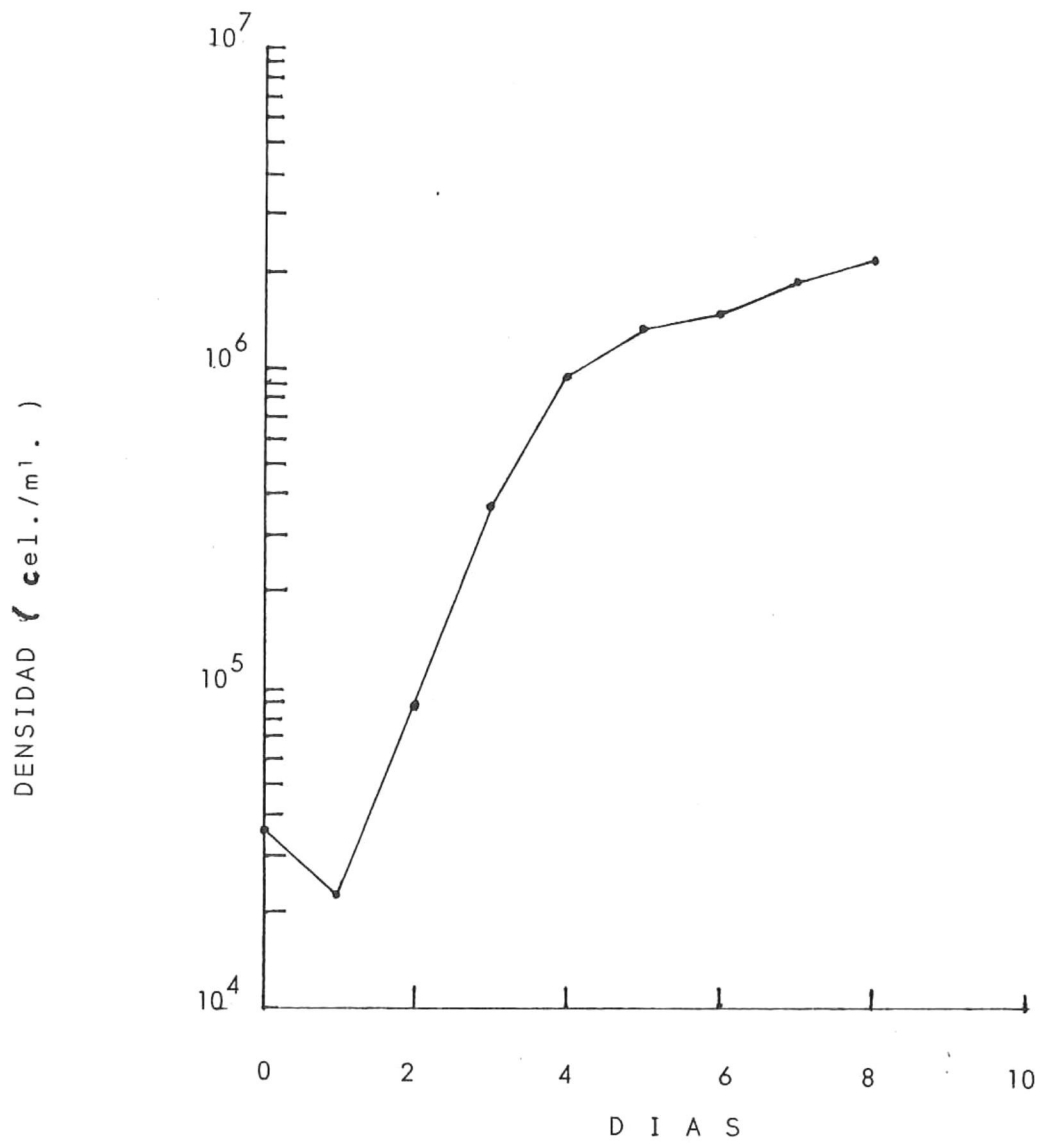


FIGURA No.- 5.- Crecimiento poblacional de I. suecica
en medio con 75 mg/lt. de NaNO_3 -
(testigo)

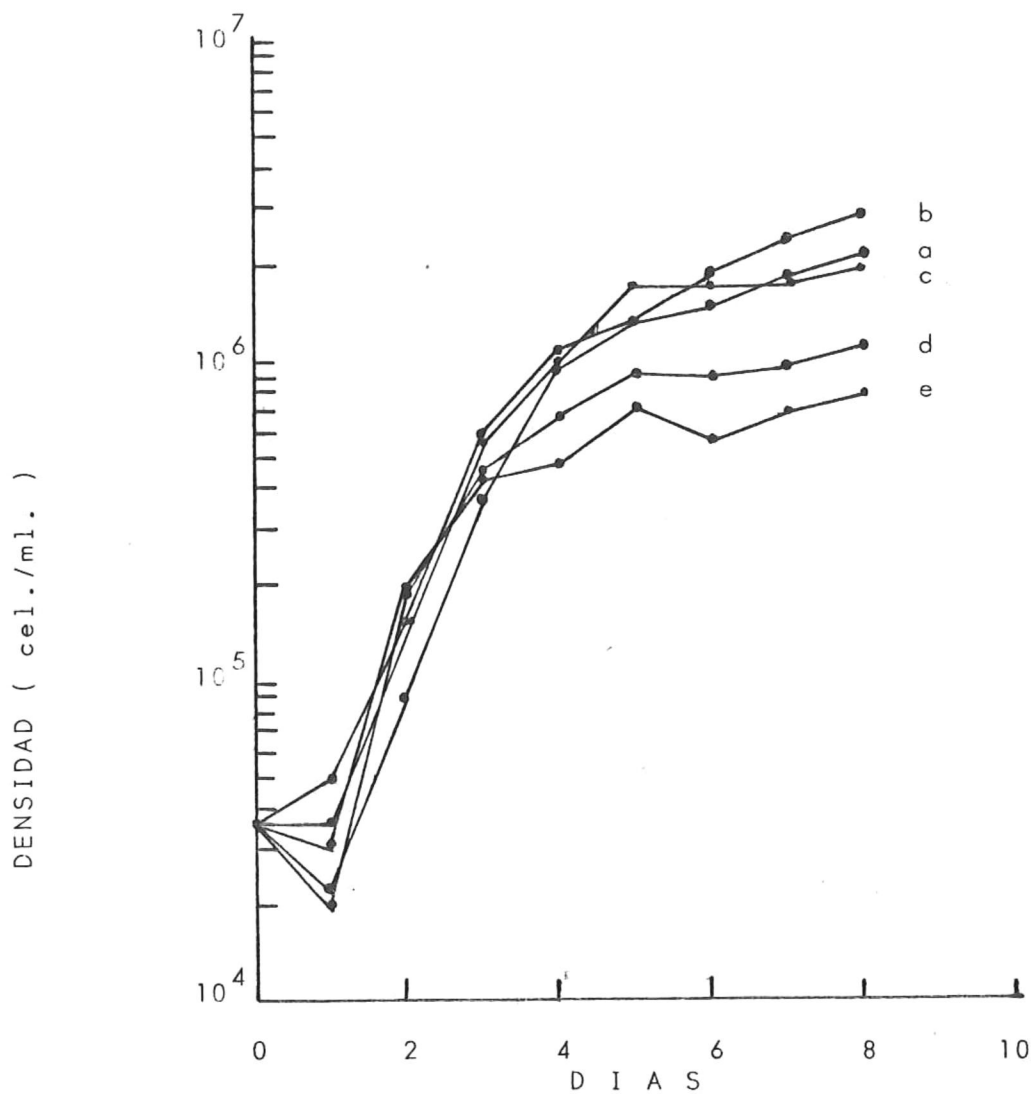


FIGURA No. 6.- Curvas de crecimiento de *T. suecica* a nivel Erlenmeyer.

- a.- cultivo en medio con 75mg/lit. de NaNO_3 (testigo)
 b.- cultivo en medio con 50mg/lit. de urea c.- cultivo en medio con 25mg/lit. de urea d.- cultivo en medio con 10 mg/lit. de urea e.- cultivo en medio con 5 mg/lit. de urea.

5. - DISCUSIONES.

Se han hecho muchos estudios sobre la nutrición del fitoplancton como un intento para entender las condiciones ideales de su crecimiento. Debido a los diferentes puntos de vista de los investigadores que estudian la nutrición de las microalgas, se ha hecho una gran variedad de proposiciones que dificultan la comparación de los resultados (Ketchum, 1953). De aquí se han definido cuatro formas en las cuales los nutrientes son estudiados y expresados, ellos son: los requerimientos absolutos, los normales, los mínimos y los de concentración óptima. En base a estas definiciones y en los resultados obtenidos en nuestro experimento podemos decir que la concentración óptima de urea o el rango de concentración que permitió la máxima densidad poblacional fué la de 50 miligramos por litro, sin embargo, Ludwig (1938), aparte de establecer a la urea como una fuente de disponibilidad inmediata de nitrógeno, dice que es posible que ocurra una conversión de urea a amoníaco carbonatado durante el proceso de esterilización. También, Chick (1903), establece que la urea rinde un 25% de su nitrógeno como amoníaco libre. Eppley (1971), reporta un mejor crecimiento en diatomeas utilizando urea como fuente de nitrógeno, en comparación con nitratos (NO_3) y amoníaco (NH_4) al igual que pasó en nuestro experimento. Bougis, 1976 establece que el nitrógeno es absorbido por el fitoplancton en las formas de amoníaco (NH_4), y nitrito (NO_2) y nitrato (NO_3)

principalmente y con una preferencia por el amoníaco y los nitratos, esto, nos hace pensar que la urea utilizada en nuestro experimento pudo haber sido aprovechada más bien en la forma de amoníaco. Zgurovskaya y Kustenko (1968) trabajando con Skeletonema costatum, Prorocentrum micans y Chaetoceros sp., observaron una mejor división celular en medios con concentraciones de un miligramo por litro de nitrógeno y encontraron que en una concentración de 56 miligramos por litro de amoníaco provocó la muerte del cultivo, destruyendo las células en 12 a 16 horas después de la inoculación. Grant, 1967, encontró que la intensidad de luz a la cual el nitrato y el nitrito son mejor asimilados ocurre entre los 300 y 1000 pies-candela respectivamente, intensidad que corresponde a la utilizada en nuestro experimento y que comprueba que esta intensidad de luz favoreció la asimilación de la urea.

El crecimiento exponencial similar alcanzado (productividad) en todos los tratamientos demuestran que la tasa de división es independiente de la concentración de nitrógeno. Ketchum (1939), demostró esto mismo trabajando con la diatomea Nitzschia closterium. Por otro lado, las diferencias marcadas en la producción entre las cuatro concentraciones de urea que se utilizaron, demuestran que el nitrógeno es un factor limitante en la producción de fitoplancton lo cual concuerda con las afirmaciones de Chuc (1943).

6. - CONCLUSIONES

. - Se obtuvieron al octavo día del cultivo, densidades de células por mililitro que no variaron significativamente al nivel del 5 %, entre el medio de cultivo control y los tratamientos con 50 y 25 mg/l de urea.

. - Se observaron bajas densidades poblacionales en los cultivos en los que se usó urea en concentraciones de 5 y 10 mg/l.

7. - RECOMENDACIONES.

- En base a los resultados obtenidos, se recomienda el uso de la urea agrícola comercial como fuente de nitrógeno en sustitución del NaNO₃ en los medios de cultivo para las microalgas hasta nivel de Erlenmeyer, lo que abaratará el costo de producción de las mismas.

7 .- LITERATURA CITADA.

- Bougis, P., 1976. Marine plancton ecology. North Holland Publishing Company. 535 pp.
- Chick, H. 1903. A study of a unicelular green algae, occurring in polluted water, with special reference to its nitrogenus metabolism. Proc. Roy. Soc. Lodon, 71:458-476.
- Chu, S.P. 1943. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. J. Ecol. 31 (2): 109-148.
- Droop, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. in: 10th European Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, 1:17-23.
- Eppley, W. 1971. Ammonium, or urea as the nitrogen source. Limnol. Oceanography, 16(5): 741-751.
- Fogg, G.E. 1975. Algal cultures and phytoplankton ecology. 2nd edition. The University of Wisconsin Press, 175 pp.
- Grant, B.R. 1967. The action of light on nitrate and nitrite

assimilation by the marine chlorophyte, Dunaliella tertiolecta (Butcher). J. Gen. Microbiol. 48, 379-389.

Griffith, G.W., M.A. Kenslow, and L.A. Ross. 1973. A mass culture method for Tetraselmis sp. a promising food for larval crustaceans. in: Proc. 4th. Ann. Workshop Wld. Mar. Soc., Monterrey, México. J. Avault (ed.) pp 289-294

Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: J.R. Stein (ed), Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. London. Cambridge U. Press, 438 pp.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, pp. 29-60. In: Culture of marine invertebrates animals (M.L. Smith y M.H. Chanley eds.) Plenum Press, New York, 338 pp.

Helm, M.M., I. Leing, and E. Jones. 1977. The development of 200 l algal culture vessels at Conwy. Fish. Res. tech. rep. MAFF Direct Fish. res., Lowestoft, 53 (2) 8-12.

Jeffrey, S.W. 1979. Cultivating unicellular marine plants. CSIRO Fisheries and Oceanographic report. 1977-1979 pp 23-43.

- Ketchum, B.H. 1954. Mineral nutrition of phytoplankton. Annu. Rev. Pl. Physiol. (5):55-74.
- Laing, I. and M.M. Helm. 1961. Factors affecting the semicontinuous production of Tetraselmis suecica (Kylin) Butch. in vessels. Aquaculture 22:137-148.
- Loosanoff, V.L., and Davies, H.C. 1963. Rearing of bivalve molluscs. Advances in marine biology, 1:136.
- Ludwig, C.A. 1938. The availability of different forms of nitrogen to a green algae. Am. Jour. of Bot. 25:449-458.
- Matthiesen, G.C. and Toner, R.C. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's County, Massachusetts. Marine Research Foundation, Edgartown, Mass., 138 pp.
- Walne, P.R. 1974. Culture of bivalve molluscs, 50 years experience at Conwy, Fishing News (Books) Ltd., Surrey.
- Zgurovskaya, L.N. and Kustenko, N.G. 1968. Effects of different concentrations of nitrite nitrogen on photosynthesis, pigment accumulation and cell division in Skeletonema costatum (Grev.), Chaetoceros sp. 1 and Prorocentrum micans. Oceanology, Vol. 8.

Tabla	Página
I.- Medios de cultivo más usados	32
II.- Rutina seguida en la preparación de los macronutrientes para los medios de cultivo.	33
III.- Diseño del medio modificado f/2 de Guillard, 1973 y - Mattihessen y Torner, 1966, utilizado como control y/o testigo.	34
IV.- Rutina a seguir en la preparación de la solución stock primaria de vitaminas para los medios de cultivo.	35

TABLA I.- Medios de cultivo mas usados; cantidades para un litro de --- ,
 agua de mar filtrada.

	GUILLARD	MATTIHESSEN Y TORNER
Nutrientes Mayores	75 mg	150.0 mg.
NaNO ₃	5 mg	10.0 mg.
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	15-30 mg	30.0 mg.
Metales traza		
Na ₂ . EDTA	4.36 mg	Fe. EDTA 10.0 mg
FeCl ₃ . 6H ₂ O	3.15 mg	- - -
Cu SO ₄ . 5H ₂ O	0.01 mg	1.9 mg.
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.022 mg	4.4 mg.
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.01 mg	2.0 mg.
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.18 mg	36.0 mg.
Na ₂ MoO ₄ . 4H ₂ O	0.006 mg	1.2 mg.
Vitaminas		
B1	0.10 mg	0.0002 mg
Biotina	0.50 mg	0.001 mg
B12	0.50 mg	0.001 mg

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

PREPARACION DE
NUTRITENTES

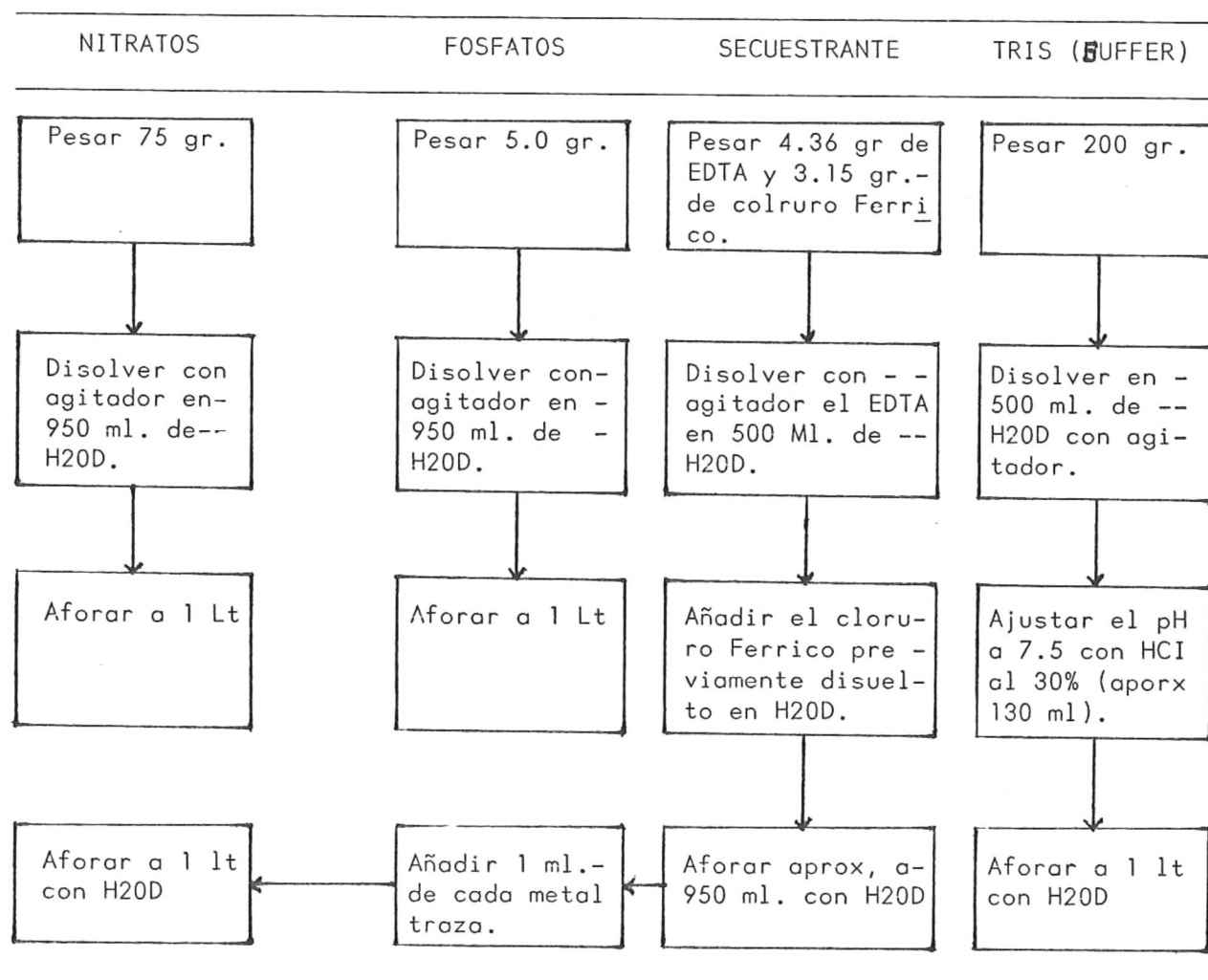


TABLA III.- DISEÑO DEL MEDIO MODIFICADO F/2 DE GUILLARD, 1973 Y MATTIHESSEN Y TORNER, 1966 UTILIZADO COMO CONTROL y/o TESTIGO.

(Cantidades para un litro de agua de mar filtrada)

INGREDIENTES	CANTIDADES
Nutritentes mayores:	
NaNO_3	75 mg.
$\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 mg.
Metales traza	
Fe. EDTA	10.0 mg.
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.9 mg.
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg.
$\text{Co Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0 mg.
$\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.0 mg.
$\text{Na}_2\text{MgO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.2 mg.
Vitaminas	
B_1	0.0002 mg.
Biotina	0.001 mg.
B_{12}	0.001 mg.

TABLA IV.- Rutina a seguir en la preparación de la solución STOCK primaria de Vitaminas para los medios de cultivo.

CONCENTRADO
(SLN STOCK PRIMARIA)

B12	BIOTINA	TIAMINA
<p>Pesar 10 Mg. con balanza- analítica.</p>	<p>Pesar 10 mg. con balanza- analítica.</p>	<p>Pesar 2 Gr. con balanza analítica.</p>
<p>Disolver en- 50 ml. de -- H2OD.</p>	<p>Disolver en- 50 ml. de -- H2OD.</p>	<p>Disolver en 50 ml. de - H2OD.</p>
<p>Aforar a 100 ml.</p>	<p>Aforar a 100 ml.</p>	<p>Aforar a 100 ml.</p>