



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

DETERMINACION DE LA TASA DE DILUCION
OPTIMA Y DEL CONTENIDO PROTEICO
DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS
CULTIVADAS EN UN SISTEMA SEMICONTINUO



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

OCEANOLOGO

PRESENTA:

SAUL GONZALEZ MEDINA

Ensenada, B.C. Mayo de 1991

RESUMEN

Se ensayaron seis especies de microalgas; Chaetoceros sp., Skeletonema costatum, Thalassiosira sp., Isochrysis sp., Skeletonema menzeli y Thalassiosira pseudonana, a nivel semimasivo (10 L). Las tres últimas, debido a su capacidad de soportar continuas diluciones del medio y/o su aceptación a ser cultivadas en medios sencillos, fueron elegidas para determinar su dilución óptima y concentración de proteínas, después de obtener las condiciones óptimas de extracción de éstas. Los resultados se compararon con los obtenidos en diferentes fases de crecimiento de las tres microalgas mantenidas en cultivo estático. Isochrysis sp. y Thalassiosira pseudonana soportan ser cultivadas a nivel semimasivo con diluciones óptimas de 40% y 30-50% (alternada) para la primera y de 50% para la segunda. La concentración de proteínas en Isochrysis sp. no varió con la dilución. En Thalassiosira pseudonana la concentración de proteínas varió en forma paralela con la dilución. El cultivo semicontinuo de Skeletonema menzeli a nivel carboy requiere de la determinación de una técnica adecuada, dada la corta duración de la fase estable.

Las condiciones óptimas de extracción de proteínas son diferentes para cada especie, siendo para Isochrysis sp. a 60°C por 10 minutos con NaOH 0.5 N; para Thalassiosira pseudonana, a 80°C por 20 minutos con NaOH 0.5 N., y para Skeletonema menzeli, a 100°C por 10 minutos con NaOH 0.1 N.

En cultivo estático, Isochrysis sp. presenta tasas de crecimiento cerca de 0.6 div./día y un decremento del contenido protéico con el tiempo. Thalassiosira pseudonana y Skeletonema menzeli presentan tasas de reproducción mayores, cerca de 1.0 y de 1.5 div./día respectivamente, con un aumento para Thalassiosira y un decremento para Skeletonema, en la concentración de proteínas con el tiempo.

DETERMINACION DE LA TASA DE DILUCION OPTIMA Y DEL CONTENIDO
PROTEICO DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS CULTIVADAS EN UN
SISTEMA SEMICONTINUO

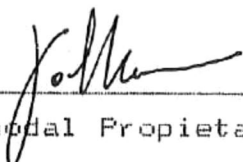
TESIS
QUE PRESENTA:
SAUL GONZALEZ MEDINA

Aprobada por:



Presidente del Jurado

M. en C. Beatriz Cordero Esquivel



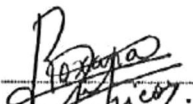
Sinodal Propietario

Dr. Domenico Voltolina
Lobina



Sinodal Propietario

M. en C. Luis A. Morales
Zamorano



Sinodal Suplente

M. en C. Roxana Rico Mora



Sinodal Suplente

Dra. Elizabeth Orellana

AGRADECIMIENTOS

Agradezco,

a el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por haberme permitido realizar mi trabajo en sus instalaciones y el apoyo brindado.

a el Dr. Domenico Voltolina por permitirme participar en su proyecto como servicio social primeramente y después como tesista; así como por sus sabios consejos, las innumerables correcciones y críticas a esta tesis y el apoyo de toda índole brindado durante el desarrollo de mi trabajo.

a mi Directora de tesis por ser tan profesional como amiga durante el desarrollo de este trabajo y para quien las palabras sobran cuando el reconocimiento es mayor.

a mis amigos del CICESE que con su apoyo y sus locos momentos hicieron soportable los periodos de laboratorio

y muy especialmente a mis amigos de la carrera con quienes la amistad fue cosa de toda la vida y a quienes mi memoria se niega a olvidar.

INDICE

	Pagina
I Introducción.....	1
I.1 Características de las especies estudiadas.....	13
I.2 Objetivos.....	16
II Materiales y Métodos.....	17
II.2 Cultivos primarios.....	17
II.2 Inóculos.....	20
II.3 Selección de especies de microalgas y de tasas de dilución.....	21
II.4 Curva de crecimiento.....	24
II.5 Control de crecimiento.....	25
II.6 Cálculo de parámetros poblacionales.....	27
II.7 Análisis bioquímicos.....	27
II.7.1 Peso seco y Contenido de cenizas....	28
II.7.2 Análisis de proteínas.....	29
II.7.2.1 Extracción.....	29
II.7.2.2 Determinación.....	30
II.8 Tratamiento estadístico.....	31
III Resultados.....	33
III.1 <u>Chaetoceros</u> sp.....	33
III.2 <u>Skeletonema costatum</u>	36
III.3 <u>Thalassiosira</u> sp.....	38
III.4 <u>Isochrysis</u> sp.....	39
III.4.1 Cultivo semicontinuo.....	39
III.4.2 Curva de crecimiento.....	43
III.4.3 Extracción de proteínas.....	46
III.4.4 Proteínas.....	50
III.5 <u>Skeletonema menzelii</u>	52
III.5.1 Cultivo semicontinuo.....	52
III.5.2 Curva de crecimiento.....	52
III.5.3 Extracción de proteínas.....	55

III.5.4 Proteínas.....	58
III.6. <u>Thalassiosira pseudonana</u>	60
III.6.1 Cultivo semicontinuo.....	60
III.6.2 Curva de crecimiento.....	70
III.6.3 Extracción de proteínas.....	73
III.6.4 Proteínas.....	76
IV Discusión.....	78
IV.1 <u>Chaetoceros</u> sp.....	78
IV.2 <u>Skeletonema costatum</u>	79
IV.3 <u>Thalassiosira</u> sp.....	80
IV.4 <u>Isochrysis</u> sp.....	81
IV.4.1 Cultivo.....	81
IV.4.2 Curva de crecimiento.....	84
IV.5 <u>Skeletonema menzeli</u>	87
IV.5.1 Cultivo.....	87
IV.5.2 Curva de crecimiento.....	88
IV.6 <u>Thalassiosira pseudonana</u>	92
IV.6.1 Cultivo.....	92
IV.6.2 Curva de crecimiento.....	95
IV.7 Extracción de proteínas.....	99
IV.8 Control de crecimiento.....	101
V Conclusiones.....	102
VI Recomendaciones.....	104
VII Literatura citada.....	106

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I.	Cepas de microalgas probadas, referencia CICESE y lugar de origen de la cepa.	18
Tabla II.	Soluciones stock para la preparación del medio f de Guillard y Ryther (1962) y f/2 modificado.	19
Tabla III.	Parámetros poblacionales de <u>Chaetoceros</u> sp. en cultivo semimasivo (10 L), a razones de dilución de 40% (días 4* y 5*) y 60% (día 6^). Biomasa en log ₂ de unidades de fluorescencia.	34
Tabla IV	Parámetros poblacionales de <u>Skeletonema costatum</u> en cultivo semimasivo (10 L), a razones de dilución de 20% (días 5* y 6*), 50% (día 8+) y 60% (día 7^). Biomasa en log ₂ de unidades de fluorescencia.	37
Tabla V	Valores promedio de los parámetros medidos en cultivo semimasivo de <u>Isochrysis</u> sp. a razones de dilución de 40%, 30-50% (alternada) y 40-60% (alternada).	41
Tabla VI	Decisión de la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple para los datos promedio de fluorescencia de <u>Isochrysis</u> sp. en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 30-50% (alternada) y 40-60% (alternada).	41
Tabla VII	Análisis de varianza de una vía para los datos de (A) peso seco y (B) peso seco libre de cenizas de <u>Isochrysis</u> sp. en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 30-50% (alternada) y 40-60% (alternada).	42

Tabla VIII	Análisis de varianza de una vía para los datos de (A) porcentaje de proteínas en peso seco y (B) porcentaje de proteínas en peso seco libre de cenizas de <u>Isochrysis</u> sp. en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 30-50% (alternada) y 40-60% (alternada).	44
Tabla IX	Parámetros poblacionales de <u>Isochrysis</u> sp. en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	45
Tabla X	Peso seco y peso seco libre de cenizas ($\mu\text{g}/10^6$ cel.) y cenizas (%) de <u>Isochrysis</u> sp. en cultivo estático.	47
Tabla XI	(A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (LSD) para los datos de extracción de proteínas en <u>Isochrysis</u> sp. a normalidad de NaOH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y tiempo (min.) diferentes.	48
Tabla XII	Pruebas adicionales para determinar las condiciones óptimas de extracción de proteínas en <u>Isochrysis</u> sp.	49
Tabla XIII	Variación en la concentración de proteínas (% de peso seco y % de peso seco libre de cenizas) en <u>Isochrysis</u> sp. en cultivo estático.	51
Tabla XIV	Parámetros poblacionales de <u>Skeletonema menzeli</u> en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	54
Tabla XV	Peso seco y peso seco libre de cenizas ($\mu\text{g}/10^6$ cel.) y cenizas (%) de <u>Skeletonema menzeli</u> en cultivo estático.	56

		Página
Tabla XVI	(A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (LSD) para los datos de extracción de proteínas de <u>Skeletonema menzeli</u> a normalidad de NaOH, temperatura (°C) y tiempo (min.) diferentes.	57
Tabla XVII	Variación en la concentración de proteínas en <u>Skeletonema menzeli</u> en cultivo estático.	59
Tabla XVIII	Valores promedio de los parámetros medidos en un cultivo semimasivo de <u>Thalassiosira pseudonana</u> a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.	63
Tabla XIX	Decisión de la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple para los datos de fluorescencia de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en un cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.	65
Tabla XX	(A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (SNK) para los datos de peso seco de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.	66
Tabla XXI	(A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (SNK) para los datos de peso seco libre de cenizas de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.	67
Tabla XXII	(A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (SNK) para los datos de proteínas, en base a peso seco, de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo, a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.	68

		Página
Tabla XXIII	(A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (SNK) para los datos de proteínas en base a peso seco libre de cenizas de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo semasivo (10 L) y semicontinuo, a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.	69
Tabla XXIV	Parámetros poblacionales de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo estático. Biomasa en log ₂ de unidades de fluorescencia.	71
Tabla XXV	Peso seco y peso seco libre de cenizas ($\mu\text{g}/10^6$ cel.) y cenizas (%) de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo estático.	72
Tabla XXVI	(A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (LSD) para los datos de extracción de proteínas de <u>Thalassiosira pseudonana</u> a normalidad de NaOH, temperatura (°C) y tiempo (min.) diferentes.	74
Tabla XXVII	Pruebas adicionales para determinar las condiciones óptimas de extracción de proteínas de <u>Thalassiosira pseudonana</u> .	75
Tabla XXVIII	Variación en la concentración de proteínas durante el crecimiento de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo estático.	77

LISTA DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1	Diferentes etapas de la curva de crecimiento para microalgas cultivadas en un volumen limitado. (1) Fase de acondicionamiento, (2) Fase exponencial de crecimiento, (3) Fase de crecimiento lento, (4) Fase estacionaria y (5) Fase de muerte.	6
Figura 2	Sistemas de cultivo semimasivo de microalgas. En el sistema 1 se cultivó <u>Isochrysis</u> sp. y <u>Thalassiosira pseudonana</u> y en el 2 <u>Skeletonema menzelii</u> .	23
Figura 3	Sistema de cultivo estático a nivel minicarboy, para <u>Isochrysis</u> sp. y <u>Thalassiosira pseudonana</u> (1) y <u>Skeletonema menzelii</u> (2) en un volumen de 1 L.	26
Figura 4	Curva de crecimiento y de dilución de 40% (días 4 y 5) y 60% (día 6) de <u>Chaetoceros</u> sp. en experimentos preliminares. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	34
Figura 5	Curva de crecimiento y de dilución de 20% (días 5 y 6), 60% (día 7) y 50% (día 8) de <u>Skeletonema costatum</u> . Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	37
Figura 6	Curvas de crecimiento y de dilución a(40%), b(30-50%) y c(40-60%), de <u>Isochrysis</u> sp.. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	40
Figura 7	Curva de crecimiento de <u>Isochrysis</u> sp. en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	45
Figura 8	Porcentaje de contenido protéico celular de <u>Isochrysis</u> sp. en base a peso seco (0) y peso seco libre de cenizas (+).	51

	Pagina	
Figura 9	Curva de crecimiento de <u>Skeletonema menzelii</u> a nivel semimasivo (10 L) en un sistema semicontinuo. Fase estable del dia 10 al 15 con una dilución del 75% y una tasa de crecimiento de 1.3-2.0 div./dia. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	53
Figura 10	Curva de crecimiento de <u>Skeletonema menzelii</u> en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	54
Figura 11	Porcentaje de contenido protéico celular de <u>Skeletonema menzelii</u> en base a peso seco (□) y peso seco libre de cenizas (+).	59
Figura 12	Curvas de crecimiento y de dilución a(40%), b(50%) de <u>Thalassiosira pseudonana</u> . Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia	61
Cont. Figura 12	Curvas de crecimiento y de dilución c(60%) y d(70%) de <u>Thalassiosira pseudonana</u> . Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	62
Figura 13	Curva de crecimiento de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.	71
Figura 14	Contenido protéico de <u>Thalassiosira pseudonana</u> en cultivo estático en base a peso seco (□) y peso seco libre de cenizas (+).	77

I INTRODUCCION

La enorme productividad del mar, el cual cubre el 70% de la superficie terrestre, está basada en los millones de plantas unicelulares conocidas como fitoplancton. Estas plantas microscópicas viven suspendidas en las capas superficiales iluminadas, donde obtienen su energía de las radiaciones solares, las cuales penetran en el agua hasta una profundidad máxima de 200 metros (Zeitzschel, 1978; Darley, 1987). Para que estas plantas marinas puedan ser estudiadas en detalle es necesario poder mantenerlas en cultivos monoespecíficos y en condiciones controladas de laboratorio. Por ejemplo, ya anteriormente Warburgh (1919, en Richmond, 1986) utilizó suspensiones densas de Chlorella sp. para investigar el proceso de la fotosíntesis.

Ciertas microalgas pueden reproducirse varias veces por día, lo cual sugirió la posibilidad de su cultivo masivo para la producción de alimento. Un primer intento en este sentido se hizo en Alemania, con el fin de obtener lípidos a partir de diatomeas, ya que con algunas microalgas se puede obtener alrededor de un 20% del peso seco de lípidos (Soeder, 1986; Whyte, 1987). Además se encontró que el material seco de la microalga podía contener hasta un 50% de proteína cruda.

Dunstan y Tenore (1972) y Oswald (1988) sugirieron que los cultivos a gran escala podrian ser utilizados simultáneamente para la producción de proteínas y para el tratamiento de aguas negras; asimismo, también se aportaron evidencias del posible uso de microalgas como un sistema bioregenerativo de los productos catabólicos, incluyendo al CO₂, en viajes espaciales (Richmond, 1986).

En nuestros días el interés en el cultivo masivo de microalgas es mundial, en vista de la multiplicidad de sus aplicaciones como materia prima en la fabricación de pildoras como complemento dietético (Durand-Chastel, 1980), como fertilizantes, como productoras de sustancias químicas y bioquímicas y como alimento humano y de animales de importancia económica (Horstmann, 1985).

Entre las actividades dedicadas a la producción de alimento, la acuicultura es una de la áreas de más rápido crecimiento (De Pauw y Persoone, 1988). El cultivo de organismos acuáticos, tanto de agua dulce como marina, ha llegado a ser muy importante para muchos países, principalmente de Asia. Esta actividad se ha incrementado fuertemente durante la última década.

Las microalgas son componentes esenciales de la dieta de moluscos bivalvos, de larvas de algunos gasterópodos (abulón), de larvas de camarón, de algunas especies de

peces y de zooplancton (De Pauw y Persoone, 1988). Por esto, la producción continua de algas unicelulares es un procedimiento auxiliar necesario para la mantención de muchos invertebrados marinos de importancia comercial, a nivel de laboratorio y masivo (Canzonier y Brunetti, 1975; Droop, 1975; Guillard, 1983).

El cultivo de géneros económicamente importantes, como Penaeus y Macrobrachium, se ve limitado por la falta de larvas o de juveniles que en general se obtienen de fuentes naturales, las cuales en consecuencia pueden llegar a ser sobreexplotadas. Por lo tanto, para el cultivo de estos géneros a nivel de laboratorio es importante poder contar con una producción continua de alimento con microalgas (Horstmann, 1985) cuya disponibilidad representa la clave para el éxito de los laboratorios productores de larvas y juveniles, y muy a menudo es el "cuello de botella" que limita su producción, como en los casos reportados por De Pauw y Persoone (1988) para el Sureste de Asia.

Para la producción de microalgas a diferentes niveles, se hace uso de tres diferentes técnicas que son: cultivos estáticos (batch), cultivos continuos y cultivos semicontinuos.

En un sistema estático un volumen limitado de medio, con los nutrientes inorgánicos y orgánicos necesarios, es

inoculado y expuesto a condiciones adecuadas de luz, temperatura y aireación, sin que nada sea removido o añadido de la fase líquida después de la inoculación. Esto significa que este sistema sólo puede soportar la multiplicación celular por un tiempo limitado, ya que al aumentar la biomasa cambia la composición química del medio y disminuye la penetración de la luz dentro del cultivo (Vonshak, 1986). El crecimiento de las microalgas en este tipo de cultivo se caracteriza por tener cinco fases separadas. La primera fase (de inducción) es de acondicionamiento de la microalga al medio y de reconstitución de la célula. Durante la segunda fase (crecimiento exponencial), las microalgas crecen en una forma exponencial, debido a la falta de factores limitantes. En esta fase hay una alta producción de material protéico. En la tercera fase (crecimiento lento), la tasa de crecimiento declina a causa de un inicio de limitación por algún factor (luz, pH, nutrientes). En la cuarta fase (estacionaria), el crecimiento es prácticamente nulo y la densidad celular se mantiene casi constante en el tiempo. La falta de división celular causa cambios en la composición bioquímica de las microalgas, que almacenan materiales de reserva como carbohidratos y lípidos, disminuyendo el porcentaje de proteínas. La quinta fase o

de muerte se caracteriza por la disminución de la biomasa causada por la senescencia de las células debida al agotamiento de nutrientes (Fig. 1).

En las técnicas de cultivo continuo y semicontinuo, medio fresco es continua o periódicamente añadido en la misma medida que se extrae parte del cultivo, logrando así que el volumen y la biomasa se mantengan constantes (Droop, 1975; Vonshak, 1986). Según varias indicaciones de la literatura, estos métodos son comúnmente empleados en sistemas de producción masiva (Canzonier y Brunetti, 1975; Guillard, 1983). Existen básicamente dos diferentes maneras de cultivar microalgas en un sistema continuo, que son el quimiostato y el turbidostato.

El quimiostato se ideó para estudios de limitación de nutrientes en el cultivo, y consiste básicamente en un reservorio que contiene el medio de cultivo, en una bomba de flujo constante y en el cultivo mismo, que tiene que estar homogéneamente mezclado. Con este sistema la tasa de reproducción de las microalgas es igual a la tasa de renovación del medio (Droop, 1975).

El turbidostato tiene el mismo diseño, pero la tasa de renovación depende de un monitoreo continuo de la biomasa por medio de un aparato óptico que mide la turbidez y controla la razón de dilución manteniendo el cultivo dentro

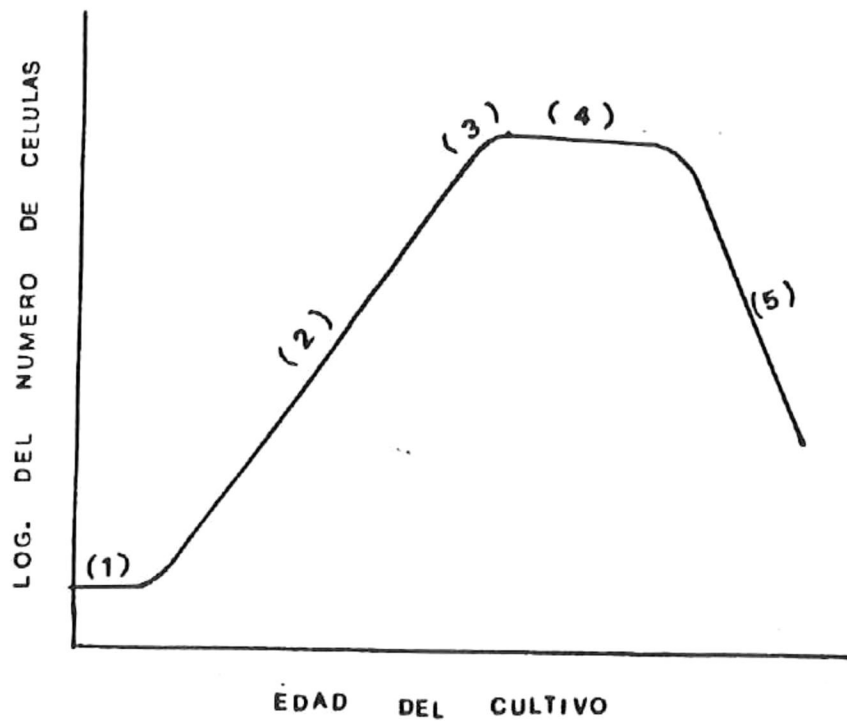


Figura 1.- Diferentes etapas de la curva de crecimiento para microalgas cultivadas en un volumen limitado. (1) Fase de acondicionamiento, (2) Fase exponencial de crecimiento, (3) Fase de crecimiento lento, (4) Fase estacionaria y (5) Fase de muerte (Fogg y Thake, 1987).

de un rango de densidades predeterminadas. Este sistema realmente tendría que considerarse una versión automatizada del sistema que se describe a continuación.

El cultivo semicontinuo es un cultivo que se diluye manualmente a intervalos regulares. La concentración de la biomasa es monitoreada para estimar si la frecuencia y razón de dilución son adecuadas (Vonshak, 1986). Aunque es en teoría posible calcular la tasa óptima de dilución de éstos, así como de los cultivos continuos (Ketchum y Redfield, 1938; Monod, 1942), el modelo empleado para esta finalidad casi nunca proporciona datos reales (Droop, 1975), motivo por el cual se prefiere optimizarlos experimentalmente, a partir de la tasa de crecimiento de la microalga en las condiciones de cultivo específicas (e.g. López-Elias, 1990). La determinación de esta tasa, que se suele definir como tasa económica (Droop, 1975), tiene una gran importancia cuando se toman en consideración los costos involucrados en la producción. Entre estos costos se destacan los relativos a la preparación del medio de cultivo (reactivos, equipo y tiempo/hombre), los que se refieren a los espacios y volúmenes dedicados a las actividades de cultivo (renta o compra de áreas y edificios y su mantenimiento, alumbrado, control de temperatura, etc.) y finalmente los derivados de las actividades de mantenimiento y cosecha de inóculos y cultivos. Entre

éstos últimos se encuentran, por ejemplo, los que se deben a la necesidad de mantener una reserva de inóculos, de multiplicar los recipientes de cultivo para eliminar el factor de riesgo involucrado en una producción demasiado ajustada a las necesidades reales. Estos además, pueden variar en dependencia de factores que es difícil preveer y a menudo de mantener tasas de dilución superiores a las necesarias, para minimizar problemas de senescencia de los cultivos.

De estos diferentes sistemas de cultivo se prefiere el uso de la técnica semicontinua, ya que el método estático es bastante ineficiente (Horstmann, 1985) y no permite la producción de un alimento con características constantes para los diferentes organismos, lo cual sucede al utilizar el sistema semicontinuo. Este presenta además ventajas adicionales, debido a su simplicidad, al bajo requerimiento de energía y de mantenimiento y a su fácil manejo (López-Ellas, 1990). Además, varios autores mencionan que la alimentación discontinua da lugar a una mayor eficiencia de filtración y un mayor crecimiento en moluscos bivalvos (Langton y McKay, 1976; Cordero-Esquivel, C.I.C.E.S.E, com. pers.).

En los cultivos continuos y semicontinuos la tasa de crecimiento depende de la razón de dilución, ya que de

acuerdo a la curva logística del crecimiento de una población, representada por la ecuación: $dx/dt = x (\mu - D)$, que relaciona biomasa (x), tasa de dilución (D) y tasa de crecimiento (μ) (Droop, 1975). De ésta se desprende que cuando $dx/dt=0$, o sea cuando no hay una variación de la biomasa en el tiempo, $\mu=D$. La máxima tasa de dilución posible se encuentra cerca de la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) para un sistema dado. Alternativamente, una menor tasa de dilución resultara en una población con una tasa de crecimiento más lenta, pero en una mayor biomasa producida. En cada caso, el resultado de mantener constante una determinada tasa de dilución es el de mantener constante la composición celular de las microalgas (López-Ellas, 1990).

En un sistema semicontinuo y/o continuo es importante mantener a la población en el mismo punto de la fase de crecimiento, para asegurar que se mantendrá una biomasa de calidad constante. En la fase de crecimiento exponencial el porcentaje de contenido protéico es alto, y es necesario poder cuantificar con precisión dicho porcentaje, para determinar la dieta de un cierto organismo.

Debido a la importancia de las proteínas como constituyente mayor de la materia particulada y como fuente dietética, se han desarrollado varios métodos para evaluarlas (Clayton *et al.*, 1988), pero en varias

publicaciones se notan diferencias importantes en muestras tratadas con métodos diferentes de separación y de extracción (Price, 1965). Por lo tanto es importante el encontrar métodos que aseguren el mayor porcentaje de extracción de material protéico.

Como ya se mencionó, se han realizado varios estudios sobre proteínas en microalgas, en muchos de los cuales se hace uso de métodos propios de extracción (Price, 1965; Hedenskog et al., 1970; Mayzaud y Martin, 1975; Enright et al., 1986) lo cual podría causar errores en la cuantificación del contenido protéico de una especie dada de microalga, ya que los valores obtenidos para cada especie dependen en gran parte del método de extracción utilizado (Rausch, 1981; López-Ellias, 1990). A pesar de esto, son pocos los trabajos publicados sobre este tema (Krey et al., 1957; Parsons et al., 1961; Blazka, 1966; Berland, et al., 1970; Dorsey et al., 1978; Rausch, 1981; Clayton et al., 1988).

Parsons et al. (1961) compararon su método colorimétrico, utilizando como agente extractor 2,5 hexanedieno, contra el método Kjeldahl, y obtienen porcentajes más altos de proteínas con su método. Berland et al. (1970) utilizaron el ultrasonido para destruir las paredes celulares y dejar libres las proteínas, para

después determinarlas con el método de Lowry et al. (1951). Los trabajos de Rausch (1981) y de Clayton et al. (1988), en los cuales se hacen comparaciones entre métodos de extracción, se tomaron como base para la realización de este trabajo.

La mayoría de los autores anteriormente citados utilizaron como solución de extracción primaria el hidróxido de sodio y/o el ácido tricloroacético (ATC). Las variantes en el uso de estas soluciones comprenden diferentes temperaturas y tiempos de extracción, y diferentes normalidades de la solución. Algunas veces se utiliza también un segundo solvente, como el detergente Triton x100 (Price, 1965; Halmann, 1972; Flaak y Epifanio, 1978).

Rausch (1981) sugirió un método estándar de extracción, utilizando hidróxido de sodio 0.5 N y extrayendo a 100-80°C de temperatura por 10 minutos, pero de su trabajo se desprende que tal tratamiento no puede considerarse estándar ya que la temperatura, el tiempo de extracción y la normalidad de la solución varían según el tipo de muestra y dependen de las características de la pared celular del organismo. Por ejemplo, una diatomea (Asterionella formosa) requiere una temperatura de 80°C y un tiempo de extracción de 15 minutos, mientras que una

microalga verde (Scenedesmus sp.) requiere 100°C por 70 minutos (Rausch, 1981), lo cual demuestra que para cada tipo de microalga hay que utilizar condiciones diferentes para alcanzar la extracción óptima, y que al optimizar la extracción se obtienen resultados significativamente mejores que con los otros veintidos métodos citados en la literatura para las mismas dos microalgas.

Posteriormente, Clayton et al. (1988) ensayaron un método diferente, que consiste en la utilización de ATC caliente como solvente en substitución de NaOH, y compararon los resultados obtenidos con la extracción con hidróxido caliente (0.1 M por 80 minutos) y frío, con Triton x100 y con la combinación de los dos últimos, utilizando esta combinación como comparación, ya que este método da muy buenos resultados aunque crea cierta interferencia si se utiliza el método de Lowry et al. (1951) para la determinación de proteínas.

Los resultados indicaron que el método de Clayton es comparable con aquel que emplea NaOH/Triton x100, que con NaOH frío y con Triton x100 la extracción es ineficiente y que el NaOH caliente es levemente menos eficiente que el método base; sin embargo, en esta investigación no se indicó si se obtuvo el óptimo de extracción.

I.1 Características de las especies estudiadas.

Chaetoceros sp.

Esta especie es una diatomea (clase Bacillariophyceae), de origen local (Bahía de Ensenada) que fue aislada de una muestra tomada cerca a un vertedero de desechos orgánicos. Esta microalga presenta un tamaño de tres a seis micras, posee setas cortas y altas tasas de crecimiento, que van de dos a tres divisiones por día.

Skeletonema costatum.

Esta cepa, aislada por Guillard en 1956, pertenece a la clase Bacillariophyceae, cuyos representantes son las diatomeas quienes se caracterizan por tener un exoesqueleto de sílice. Es una de las cepas más extensamente utilizadas en la acuicultura para el cultivo de peneidos, crece en cadenas (20-22 células) y con tasas de crecimiento de 1.5 a 1.2 divisiones por día (Voltolina et al. 1991). Su cultivo a nivel masivo generalmente ha sido de tipo estático (batch).

Thalassiosira sp.

Esta microalga también pertenece al grupo de las diatomeas, que por constituir un grupo abundante en el medio dulce y marino, es objeto de numerosos estudios. Esta cepa es de origen local, aislada en el Centro de

Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada a partir de una muestra de agua costera de la Bahía de Ensenada. Thalassiosira sp. presenta una tasa de reproducción de 2.5 divisiones por día (Voltolina et al. 1991).

Isochrysis sp.

Esta microalga pertenece a la clase Prymnesiophyceae y fue aislada originalmente por K. Haines en 1977 y secundariamente por D. Voltolina en 1987. Presenta células de seis a ocho micras provistas de dos flagelos móviles. Es originaria de climas cálidos y es también conocida como Isochrysis "Tahiti" (T-ISO). A pesar de su origen, el campo óptimo de su crecimiento se encuentra a temperaturas que varían entre 16 y 20°C, salinidades de 25 a 28‰ y una iluminación de 4000 lux (Utting, 1985). Debido a su tamaño y al hecho que es un flagelado desnudo, con una pared celular orgánica liviana, es fácil de digerir por los organismos consumidores. Además, su alto valor nutritivo, comparable y algunas veces superior a Isochrysis galbana (Ewart y Epifanio, 1981, Helm y Laing, 1987) la sitúa entre las especies más importantes para la alimentación de bivalvos marinos (Utting, 1985; Fabregas et al. 1986).

Skeletonema menzeli

Esta microalga pertenece a la clase Bacillariophyceae y fue aislada por R. Guillard en 1959 de una muestra del Mar de los Sargazos. Esta cepa presenta un tamaño de tres a cuatro micras, una tasa de crecimiento de 2 a 3.5 divisiones por día y cadenas aisladas de dos a tres células (Guillard et al. 1974).

Thalassiosira pseudonana.

Esta especie, que forma parte del grupo de las diatomeas, ha sido utilizada extensamente en bioensayos relacionados con los cambios fisiológicos y bioquímicos que sufre la célula al encontrarse limitada por algún nutriente, principalmente nitrógeno y fósforo (Paasche, 1973; Goldman et al. 1982). Desde hace unos años su utilización en la acuicultura, como alimento para larvas y juveniles de algunos moluscos, se ha intensificado (Flaak y Epifanio, 1978; Ewart y Epifanio, 1981; Gallagher y Mann, 1981; Webb y Chu, 1982; Whyte, 1987) dado que se demostró que es mejor alimento que Isochrysis "Tahiti" (T-ISO) para algunos organismos (Volkman et al., 1989).

I.2 OBJETIVOS

Este estudio tiene los siguiente objetivos:

1.- Determinar experimentalmente la tasa de dilución económica de cultivos semicontinuos de algunas cepas de microalgas de interés actual o potencial para la Acuicultura.

2.- Medir el contenido protéico de la biomasa producida para tres cepas de microalgas seleccionadas previamente.

a) Determinar las condiciones óptimas de extracción de proteínas para las cepas de microalgas seleccionadas.

b) Cuantificar el contenido protéico en diferentes fases de crecimiento de un cultivo estático para las tres especies de microalgas seleccionadas.

c) Comparar los valores de contenido protéico obtenidos en cultivo semicontinuo y estático.

II MATERIALES Y METODOS

Las seis cepas de microalgas utilizadas en este trabajo (Tabla I), se obtuvieron del Laboratorio de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Isochrysis sp., Skeletonema costatum y Thalassiosira pseudonana se escogieron en base a su interés y utilización actual y las restantes en base a su interés potencial.

II.1 Cultivos primarios

Las seis especies de microalgas se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura, $20 \pm 1^\circ\text{C}$; salinidad, $32.5 \pm 0.5\%$; iluminación continua, 2.5-3 Klux con 2 lámparas laterales de luz blanca de 40 W c/u. Los cultivos primarios necesarios para el desarrollo de este trabajo se obtuvieron al inocular con cada cepa una serie de matraces erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio f (Guillard y Ryther, 1962) y f/2 modificado (Tabla II), esterilizados previamente en autoclave a 121°C y 15.3 Kg/cm^2 de presión por 30 minutos. Las vitaminas fueron añadidas después de la esterilización. Los matraces se mantuvieron en el laboratorio en las condiciones estándar antes mencionadas y con agitación manual diaria para mantener las células en suspensión.

Tabla I.- Cepas de microalgas probadas, referencia CICESE y lugar de origen de la cepa.

Nombre y Clave Internacional	Clave CICESE	Procedencia
<u>Chaetoceros</u> sp.	CH-X-3	CICESE
<u>Isochrysis</u> sp. "Tahiti" (T-ISO)	IS-X-1	S.C.B.F.
<u>Skeletonema costatum</u> (SKEL)	SK-C-2	B.L.O.S.
<u>Skeletonema menzeli</u> (Men-5) Guillard et al.	SK-M-4	CICESE
<u>Thalassiosira pseudonana</u> (3H) Hasle y Heimdahl	TH-P-1	B.L.O.S.
<u>Thalassiosira</u> sp.	TH-X-1	CICESE

Abreviaciones

CICESE.- Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

B.L.O.S.- Bigelow Laboratory for Ocean Sciences.

S.C.B.F.- Sociedad Cooperativa de Bahía Falsa.

TABLA II.- Soluciones stock para la preparación del medio f de Guillard y Ryther (1962) y f/2 modificado.

NUTRIENTES	CONCENTRACION EN 1 L DE MEDIO	
	f	f/2 modificado
NaNO_3	1.760 ml	0.880 ml
NaH_2PO_4	0.072 "	0.036 "
Na_2SiO_3	0.108 "	0.216 "
<u>Metales Traza</u>		
Zinc	0.16 μM	0.08 μM
Manganeso	0.18 "	0.09 "
Molibdeno	0.06 "	0.03 "
Cobalto	0.10 "	0.05 "
Cobre	0.08 "	0.04 "
Hierro	23.40 "	11.70 "
EDTA	23.40 "	11.70 "
Tris	1.32 "	0.66 "
<u>Vitaminas</u>		
Cianocobalamina	1.00 μg	0.50 μg
Biotina	1.00 "	0.50 "
Tiamina HCL	200.00 "	100.00 "

11.2 Inóculos

Estos cultivos primarios, una vez alcanzada una densidad suficiente, determinada arbitrariamente en base a la coloración del cultivo y a su densidad apreciada al microscopio, se utilizaron para inocular los minicarboys que se mencionan más adelante, y los matraces Fernbach de 2.8 litros con dos litros de medio f y f/2 modificado, que a su vez sirvieron como inóculo para los cultivos semicontinuos de mayor volumen (10 L) empleados para la determinación de la tasa de dilución económica (óptima) y para la producción de biomasa.

El agua de mar utilizada para los cultivos a nivel minicarboy y carboy, fue filtrada a través de filtros de cuno de porosidad decreciente hasta 5 μm , pasada por luz ultravioleta y fue esterilizada agregando hipoclorito comercial al 5% a razón de 3 mL/L, para después de 12 horas neutralizarlo con tiosulfato de sodio (150 mg/L) y aireación (Voltolina *et al.*, 1989).

Todos los cultivos en carboy fueron mantenidos en condiciones constantes: temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$; salinidad, $32.5 \pm 0.5\%$; iluminación continua con 2 lámparas de luz blanca y 2 lámparas luz de día, dispuestas en forma lateral y en agitación con aire enriquecido con la cantidad de CO_2 suficiente para mantener el pH entre 7.5 y

8.7.

II.3 Selección de especies de microalgas y de tasas de dilución.

Las tres cepas de microalgas escogidas para la determinación de su contenido protéico fueron seleccionadas por ser fácilmente cultivables en cultivos semimasivos en un sistema semicontinuo y/o por su aceptación de medios de cultivo simplificados.

Chaetoceros sp.

Esta especie fue cultivada hasta nivel carboy de 18 L de volumen con 9 L de medio f (Guillard y Ryther, 1962) e inóculo de 1 L. Al alcanzar la fase de crecimiento lento se probaron las diluciones de 40% y 60%. El crecimiento fue monitoreado diariamente por medio de lecturas de fluorescencia *in vivo* y por conteo de células.

Isochrysis sp.

Isochrysis sp. se cultivó a nivel carboy en medio f sin silicatos. Se probaron inicialmente las tasas de dilución diaria de 40%, 50% y 60% a partir de la parte final de la fase de crecimiento exponencial, monitoreando su crecimiento sólo mediante lecturas de fluorescencia *in vivo*. A partir de los resultados preliminares obtenidos y por su aceptación de medios de cultivo simplificados, se eligió como una de las tres microalgas a estudiar y se

probaron, en base a los datos de dilución y lo reportado por Pares-Sierra y Leyva (1982), las razones de dilución de 40%, 30-50% alternada y 40-60% alternada, durante un lapso de 20 días.

Skeletonema costatum

El cultivo de esta microalga se llevó hasta nivel carboy en medio f. Alcanzada la fase de crecimiento lento se diluyó diariamente en un 20%, 50% y 60%. La biomasa se monitoreó por medio de fluorescencia *in vivo* y conteo de células.

Skeletonema menzeli

Esta cepa se cultivó en carboy invertido (Fig. 2) y en medio f/2 modificado. La elección del carboy invertido obedece a resultados de otros experimentos (González-Leonardo, 1991; Trujillo-Valle, CICESE, com. per.) que indicaron que este tipo de microalga forma grumos que precipitan y que es necesario eliminar. Las tasas de dilución probadas fueron de 50% y .75%, para mantener los cultivos en la fase de crecimiento exponencial, y su desarrollo se siguió sólo por lecturas de fluorescencia. En función de los resultados obtenidos y de la aceptación de medios de cultivo simplificados esta especie se eligió para ser estudiada sólo a nivel minicarboy.

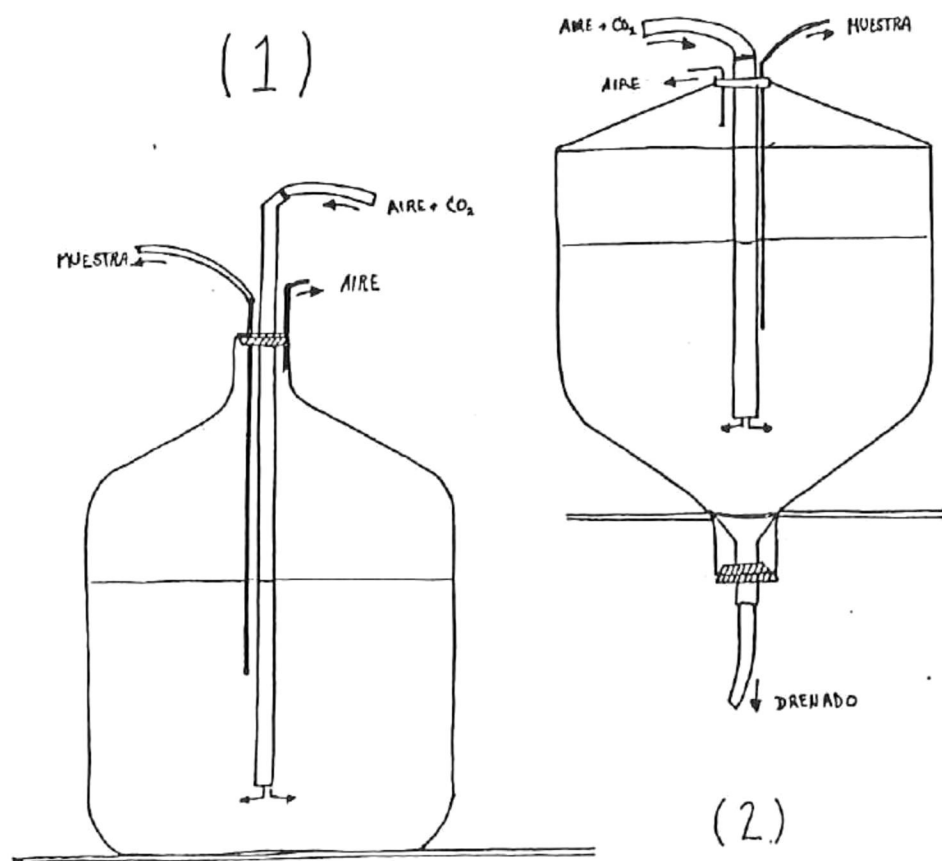


Figura 2.- Sistemas de cultivo semimasivo de microalgas. En el sistema 1 se cultivó *Isochrysis* sp. y *Thalassiosira pseudonana* y en el 2 *Skeletonema menzeli*.

Thalassiosira sp.

Esta especie se llevó hasta cultivos en carboy, pero no se pudieron realizar diluciones, ya que el cultivo, después de un rápido crecimiento, se colapsaba en un tiempo muy corto.

Thalassiosira pseudonana

Thalassiosira pseudonana se cultivó en carboy con medio f/2 modificado. Las tasas de dilución preliminares fueron 30%, 40% y 50%. Después de elegirla como la tercera especie a estudiar, en base a los resultados obtenidos, se probaron por duplicado las razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.

II.4 Curva de Crecimiento

Para obtener la curva de crecimiento hasta el inicio de la fase estacionaria y la variación en la concentración de proteínas durante este periodo, se hizo uso de cultivos en botellas plásticas (minicarboys) de 2 L, invertidas y dispuestas de la manera ilustrada en la figura 3, con un litro de medio f/2 modificado y f para Thalassiosira pseudonana e Isochrysis sp. respectivamente. Skeletonema menzeli se cultivó en un recipiente de vidrio de 1.5 L con tres bocas y con un agitador magnético como se observa en

la figura 3, en un litro de medio f/2 modificado. El control del crecimiento de cada cultivo fue realizado cada 24 horas.

II.5 Control de Crecimiento

El control de crecimiento de las microalgas en los diferentes cultivos se realizó mediante lecturas *in vivo* de clorofila por medio de un fluorímetro marca Turner modelo 111 y por conteo celular en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, utilizando un microscopio Olympus BH2. El primer método permitía realizar una evaluación inmediata del estado del cultivo, como en el caso de los cultivos semicontinuos, lo cual posteriormente sería corroborado por el conteo celular.

Una buena correlación lineal entre los datos obtenidos con los dos métodos, en la evaluación de la densidad los cultivos estáticos, indicaría la factibilidad de calcular los parámetros poblacionales en base al método que aporte mayor número de datos. Para nuestro caso los datos de unidades de fluorescencia se utilizaron para tal fin ya que se obtuvieron coeficientes de correlación mayores que 0.96 cuando los cultivos se encontraban en las fases de crecimiento exponencial y de crecimiento lento.

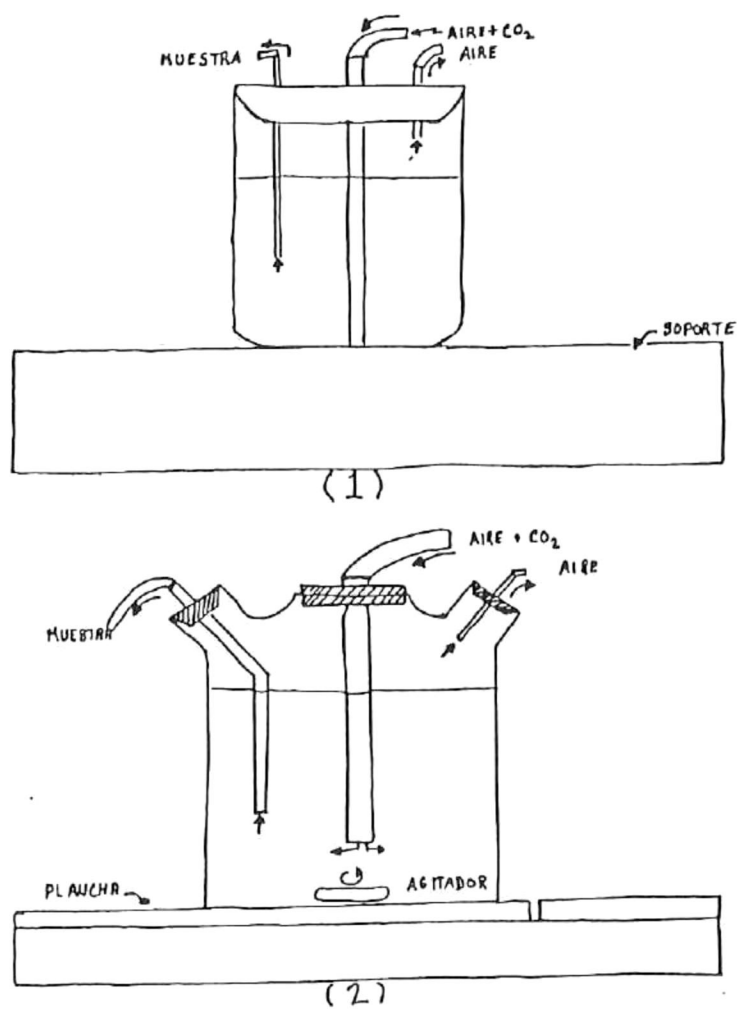


Figura 3.- Sistema de cultivo estático a nivel minicarboy, para Isochrysis sp. y Thalassiosira pseudonana (1), y Skeletonema menzelii (2) en un volumen de 1 L

II.6 Cálculo de Parámetros Poblacionales

Para el cálculo de los parámetros poblacionales, en base a unidades de fluorescencia, se utilizaron las fórmulas siguientes, tomadas de Fogg y Thake (1987).

$$\mu = \log_2(B1/B0)/(t1-t0)$$

$$Td = \log_2 2/\mu = 1/\mu$$

donde:

B1= Biomasa final (unidades de fluorescencia)

B0= Biomasa inicial (unidades de fluorescencia)

t1= Tiempo final

t0= Tiempo inicial

μ = Tasa de crecimiento

Td= Tiempo de duplicación

II.7 ANALISIS BIOQUIMICOS

En muestras preservadas, como se menciona posteriormente, de los cultivos a nivel minicarboy (curva de crecimiento) y carboy (tasa de dilución óptima), se realizaron los análisis de peso seco, peso seco libre de cenizas, contenido de cenizas y concentración de proteínas. Los resultados de los dos primeros se expresaron en microgramos por millón de células y de los dos últimos en porcentajes de los dos pesos.

II.7.1 Peso Seco y Contenido de Cenizas

Para peso seco y cenizas se utilizaron filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio de 4.7 cm de diámetro y porosidad nominal de 1.2 micras, previamente quemados a 480°C en una mufla por cuatro horas y pesados en una balanza analítica.

Para la curva de crecimiento se tomaron muestras de los cultivos cada 24 horas. Se filtraron por duplicado 20 mL de cultivo, enjuagándose posteriormente el filtro con una solución al 3% de Formato de Amonio. Los filtros fueron secados a 60°C en una estufa durante seis horas, pesados en una balanza analítica con una precisión de 0.1 mg y después quemados a 480°C en una mufla por seis horas y pesados nuevamente para la obtención del contenido de cenizas (Sorokin, 1973). Por diferencia de pesos se obtuvo el peso seco libre de cenizas.

Durante la fase estable de los cultivos semicontinuos, se tomaron cuatro muestras, en días elegidos al azar, se filtraron por duplicado 80-100 mL de cultivo, se enjuagaron los filtros con agua destilada y se trataron en la misma forma que los anteriores. Se eligió tomar sólo cuatro muestras, dado que según los resultados de López-Ellias (1990) éstas serían suficientes para poder determinar eventuales variaciones dentro del mismo cultivo.

Para Isochrysis sp. sólo se tomaron tres muestras,

dado que después de la tercera el cultivo se contaminó con una alta cantidad de bacterias y microflagelados que impidió la toma de una cuarta muestra.

II.7.2 Análisis de proteínas

Para la determinación de proteínas en los cultivos a nivel minicarboy y carboy, primero se determinaron las condiciones óptimas de extracción para cada una de las microalgas elegidas, empleando el método de Rausch (1981) y la técnica de López-Ellias (1990). Para esta parte del trabajo se utilizaron filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio de 2.5 cm de diámetro, previamente quemados en las condiciones ya mencionadas.

II.7.2.1 Extracción.

Un cultivo a nivel Fernbach, de cada especie, fue mantenido bajo condiciones estándar hasta alcanzar la fase de crecimiento lento. En este momento se tomaron 100 muestras de 10 mL de cultivo y se filtraron. Los filtros se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis.

Las concentraciones del NaOH (0.1, 0.5 y 1.0 N), usado como agente extractor, las temperaturas del baño maría (60, 80 y 100°C) y los tiempos (10, 20 y 30 minutos) con que se trataron las muestras, fueron elegidas en función de los resultados obtenidos por Rausch (1981), Clayton *et al.* (1988) y López-Ellias (1990).

a) Rutina de extracción de proteínas

-El filtro fue colocado en un tubo de centrifuga y se le agregaron 0.5 mL de NaOH, macerando después con una varilla de vidrio. La muestra se llevó hasta un volumen de 3 mL con el mismo NaOH y se mantuvo en baño maría a la temperatura y por el tiempo predeterminados.

- Los tubos fueron colocados después en agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente y se centrifugaron a 4000 r.p.m por 15 minutos.

- El sobrenadante se pasó a otro tubo y el precipitado fue sometido a una segunda extracción, igual a la primera.

- Los dos sobrenadantes se mezclaron.

II.7.2.2 Determinación

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry et al. (1953) modificado por Malara y Charra (1972).

Del extracto de proteínas se tomaron 0.5 mL, se le añadieron 0.5 mL de agua destilada, si la extracción había sido con NaOH 0.1 N, o 0.5 mL de HCl (0.5 o 1.0 N) para neutralizar el hidróxido de sodio de la normalidad respectiva, utilizado en la extracción.

A este mililitro se le añadieron 5 mL de una solución 100:1:1 de NaOH 0.1 N + 2% de carbonato de sodio (Solución A), sulfato cáprico al 0.5% (Solución B) y tartrato de

sodio y potasio al 1% (Solución C). Después de 10 minutos se agregaron 0.5 mL de la solución de Folin-Ciocalteu con agua destilada (1:1), y se agitó inmediatamente. Se dejó reposar 90 minutos a temperatura ambiente y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro BL 210 a una longitud de onda de 700 nm. La curva de calibración se realizó con estándares de 0, 10, 20, 50, 80 y 100 μg de albúmina de suero de bovino.

Para la determinación de las proteínas en los cultivos a nivel minicarboy se filtraron 5-15 mL de cultivo cada 24 horas y para los de nivel carboy 10 mL cada día señalado para el muestreo. Posteriormente se siguió la metodología de extracción determinada como óptima.

II.8 Tratamiento Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se hicieron previamente las determinaciones de normalidad y homogeneidad de varianzas, mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Bartlett respectivamente. En el caso de datos normales y homoscedásticos, éstos se procesaron mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y las diferencias se identificaron a través de las pruebas de comparación múltiple Student-Newman-Keuls (SNK) y Mínima Diferencia Significativa (LSD). Para los datos no normales se utilizó

un tratamiento no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple. Para todas las pruebas el nivel de significancia establecido fue $\alpha = 0.05$.

Los datos sometidos a este tipo de análisis estadístico fueron: lecturas de fluorescencia, extracción de proteínas, concentración de proteínas, peso seco y peso seco libre de cenizas. La comparación entre diluciones y réplicas se realizó conjuntamente mediante la misma prueba.

La factibilidad de emplear los datos de fluorescencia como una indicación del aumento de número de células en los cultivos, se estableció mediante una prueba de correlación lineal.

Para las pruebas de normalidad, ANOVA, comparaciones múltiples (LSD) y correlación lineal se empleó el programa STATGRAF Versión 2.1, para la prueba *a posteriori* (SNK) se usó el programa PECS y para los tratamientos por Kruskal-Wallis y sus comparaciones múltiples, se utilizó el programa ESISML en la versión modificada por el Dr. Chagoya del C.I.C.E.S.E.

III RESULTADOS

Se presentan primeramente los resultados obtenidos con los cultivos en carboy, de las especies no seleccionadas para el desarrollo total de este estudio y después de éstos, se exponen los resultados de las tres seleccionadas. En ambos casos las cepas están ordenadas en orden alfabético, sin tomar en cuenta la clase a la que pertenecen.

III.1 Chaetoceros sp.

Chaetoceros sp. se probó sólo a nivel carboy en forma preliminar. En la tabla III y la figura 4 se muestran los resultados referidos al crecimiento de esta microalga y a su respuesta a las diluciones probadas.

El cultivo se mantuvo 7 días, durante los cuales se realizaron dos diluciones de un 40% y una de 60% en los días cuatro, cinco y seis respectivamente.

Para el cuarto día, cuando se iniciaron las diluciones, el cultivo había alcanzado una densidad de 12.2 millones de células por mililitro y presentaba una tasa de crecimiento de 0.75 divisiones por día, por lo cual la tasa de dilución, durante dos días, fue solamente del 40%. Para el sexto día la razón de dilución se aumentó hasta 60%, que resultó en una disminución de la biomasa (en unidades de fluorescencia) sin que se notara un aumento de la tasa de

TABLA III.- Parámetros poblacionales de *Chaetoceros* sp. en cultivo semimasivo (10 L), a razones de dilución de 40% (días 4* y 5*) y 60% (día 6^). Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

DIAS	0	1	2	3	4*	5*	6^	7
BIOMASA	7.5	9.4	10.4	11.1	11.8	11.7	11.7	10.9
CELULAS 10^6 /mL		4.9	7.5	9.8	12.2			
TASA DE CRECIMIENTO (μ)		1.92	1.00	0.65	0.75	0.62	0.44	0.62

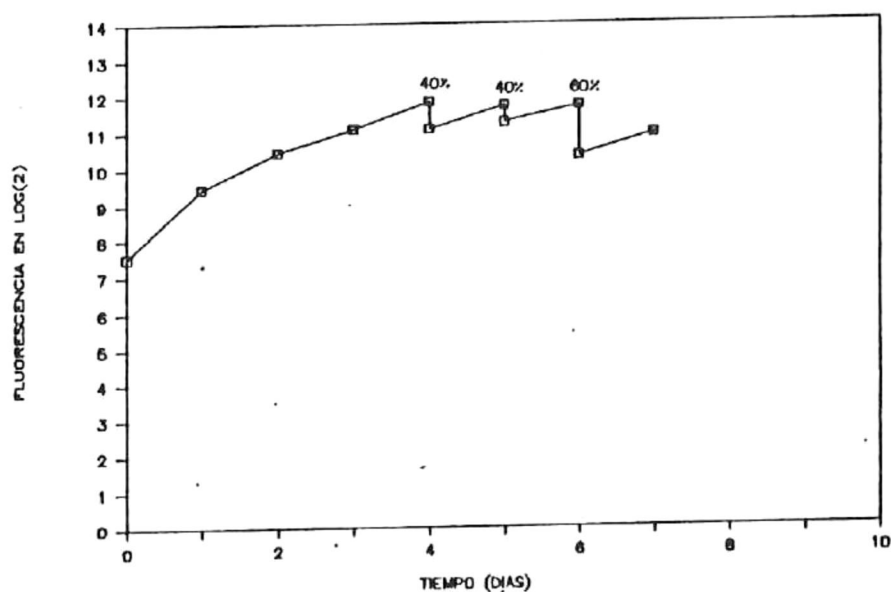


Figura 4.- Curva de crecimiento y de dilución de 40% (días 4 y 5) y 60% (día 6) de *Chaetoceros* sp. en experimentos preliminares. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

crecimiento con respecto a los días anteriores. No se obtuvieron datos posteriores a este día debido a que el cultivo, después de la dilución del 60%, no pudo regresar a su biomasa anterior y pronto se contaminó de bacterias y microflagelados. La máxima tasa de crecimiento se dió en el primer día y fue de 1.92 div./día. Para los siguientes días éstas se mantuvieron casi constantes a 0.6. Sin embargo, la densidad celular fue alta desde los primeros días. Hay que señalar que para el quinto día el cultivo empezó a contaminarse con bacterias, y las células a formar pequeños grumos que tendían a sedimentarse en el fondo.

III.2 Skeletonema costatum

Esta microalga, al igual que Chaetoceros sp. sólo se cultivó a nivel semimasivo (carboy 10 L) en la fase preliminar del experimento. Se obtuvo la curva de crecimiento que se muestra en la figura 5 y las densidades y parámetros poblacionales se resumen en la tabla IV. Esta cepa se mantuvo sólo por 8 días, la densidad más alta, de 13 millones de células por mililitro, se alcanzó en los días seis y siete; durante los primeros días se tuvieron las tasas de crecimiento más altas (2.6, 0.6 y 1.0 div./día). En el día cinco, cuando se empezó la dilución del cultivo, se presentó una tasa de crecimiento baja, que era de sólo 0.2 divisiones por día. La primera dilución fue del 20% durante los días cinco y seis, se aumentó hasta el 60% el séptimo día y se disminuyó al 50% para el octavo. Para este tiempo, aún cuando los valores de la tasa de crecimiento presentaron un aumento relativo, sólo llegaron hasta 0.60 en el último día, cuando el cultivo empezó a contaminarse y a formar grumos y cadenas muy largas de células, que se sedimentaron causando el colapso del cultivo.

TABLA IV.- Parámetros poblacionales de *Skeletonema costatum* en cultivo semimasivo (10 L), a razones de dilución de 20% (días 5* y 6*), 50% (día 8+) y 60% (día 7^). Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

DIAS	0	1	2	3	4	5*	6*	7^	8+
BIOMASA	7.2	7.4	10.1	10.7	11.8	12.1	11.8	12.1	11.4
CELULAS $\times 10^6$ /mL	0.2	0.4	1.8	3.8	6.1	11.6	13.1	13.0	
TASA DE CRECIMIENTO (μ L)		0.2	2.6	0.6	1.0	0.2	0.3	0.5	0.6

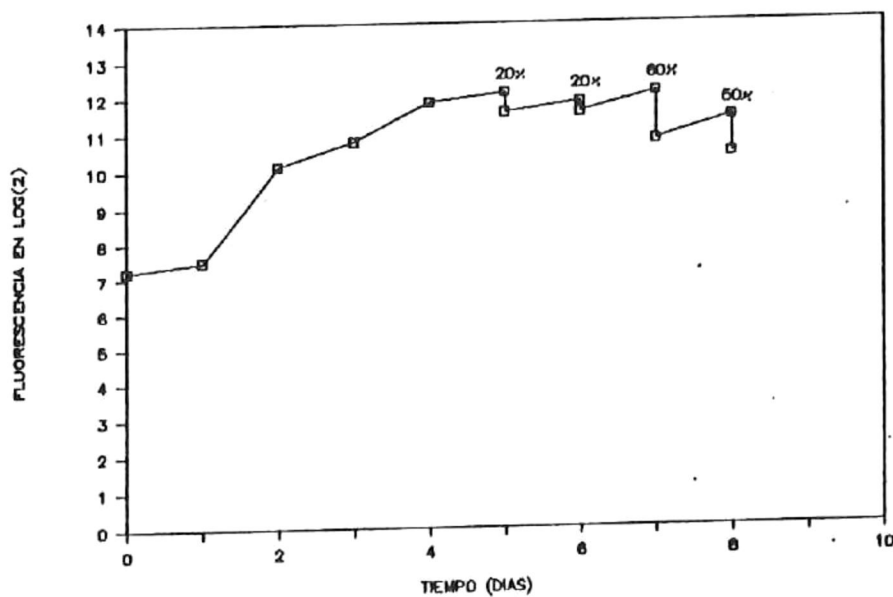


Figura 5.- Curva de crecimiento y de dilución de 20% (días 5 y 6), 60% (día 7) y 50% (día 8) de *Skeletonema costatum*. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

III.3 Thalassiosira sp.

Esta especie fue imposible de cultivarse a nivel semimasivo por más de dos días, ya que el cultivo se colapsaba casi inmediatamente. La mayor fluorescencia obtenida fue de 250 unidades, que representa un valor muy bajo, aún cuando faltan datos para poderlo referir a concentración celular, dado que las células en todo momento se encontraron aglutinadas en grumos, que propiciaban un desarrollo rápido de bacterias y el colapso del cultivo. Ante tales eventos se decidió no continuar trabajando con esta cepa.

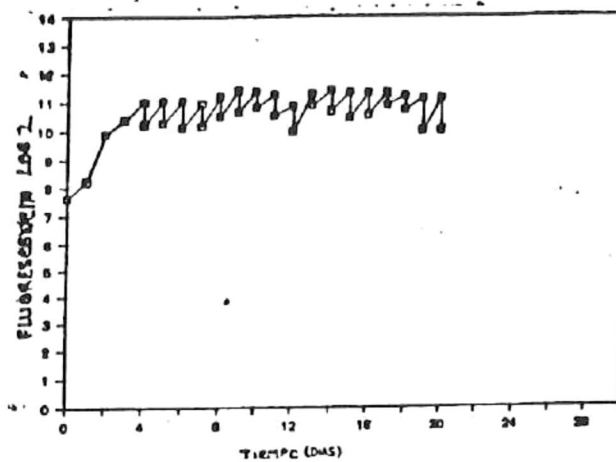
III.4 Isochrysis sp.

III.4.1 Cultivo Semicontinuo

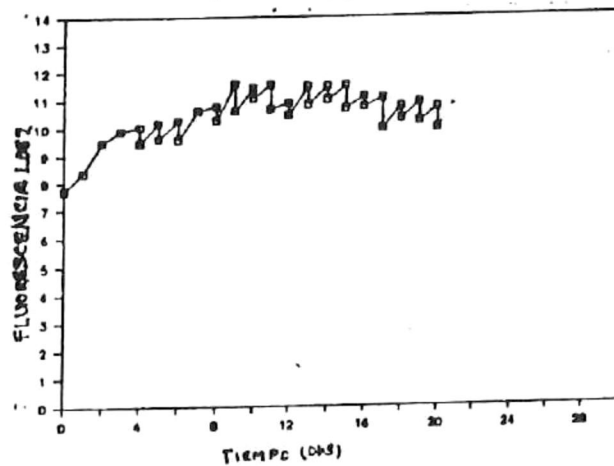
Los cultivos semicontinuos, para las tres razones de dilución se mantuvieron por 20 días (Fig. 6). A partir del cuarto día y hasta el día 20 los cultivos se mantuvieron estables, después de esta fecha la biomasa disminuyó, probablemente debido a problemas de contaminación por bacterias y microflagelados. La mayor biomasa correspondió a las diluciones de 40% y de 30-50% (alternada) con las cuales se tuvieron en promedio $6.1 \pm 1.2 \times 10^6$ y $6 \pm 1.8 \times 10^6$ células por mililitro respectivamente; con la dilución de 40-60% (alternada) la biomasa fue notablemente inferior ($4.8 \pm 1.1 \times 10^6$ cél./mL) (Tabla V).

Los valores de fluorescencia de cada dilución, en los cuales no hubo diferencias entre réplicas, no resultaron normales. El análisis estadístico correspondiente demostró diferencias significativas entre las diluciones de 40% y de 30-50% con la dilución de 40-60% (Tabla VI).

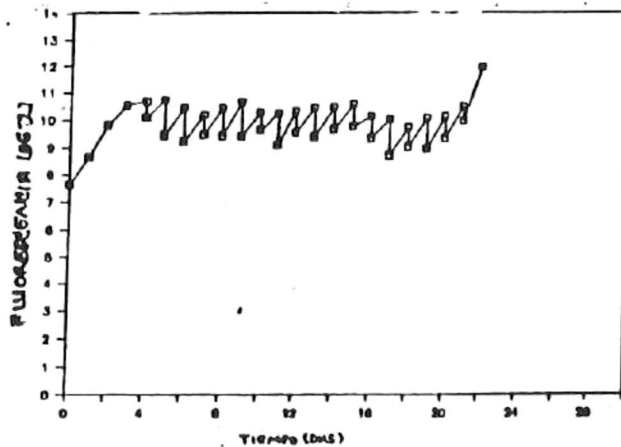
Los datos de pesos seco y seco libre de cenizas y de proteínas de las tres diluciones demostraron ser normales y que no había diferencias significativas entre réplicas. Así, los datos de peso seco y peso seco libre de cenizas fueron tratados con la prueba ANOVA de una vía (Tabla VII) que mostró que no existían diferencias significativas entre



(a)



(b)



(c)

Figura 6.- Curvas de crecimiento y de dilución, a(40%), b(30-50%) y c(40-60%), de *Isochrisis* sp.. Biomasa en log₂ de unidades de fluorescencia.

TABLA V.- Valores promedio de los parámetros medidos en cultivo semimasivo de *Isochrysis* sp. a razones de dilución de 40%, 30-50% (alternada) y 40-60% (alternada).

RAZON DE DILUCION (%)	40	30-50	40-60
UNIDADES DE FLUORESCENCIA	2372	2220	1272
CELULAS x 10 ⁶ /mL	6.1±1.2	6.0±1.8	4.8±1.1
PESO SECO (µg/10 ⁶ cel.)	23±6	27±9	30±15
PESO SECO LIBRE DE CENIZAS (µg/10 ⁶ cel.)	19±3	24±8	22±10
CENIZAS (%)	18	12	27
PROTEINAS (% de peso seco)	30	31	31
PROTEINAS (% de peso seco libre de cenizas)	38	35	35

TABLA VI.- Decisión de la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple para los datos promedio de fluorescencia de *Isochrysis* sp. en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 30-50% (alternada) y 40-60% (alternada).

--Al nivel de significancia de 0.05 H ₀ es rechazada. (S)			
Comparaciones Múltiples			
DILUCIONES	40%	30-50%	40-60%
40%	---	N.S	S
30-50%		---	S
40-60%			---

TABLA VII.- Análisis de varianza de una vía para los datos de (A) peso seco y (B) peso seco libre de cenizas de *IschrYSIS* sp. en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 30-50% (alternada) y 40-60% (alternada).

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	.002045	2	1.02251 ⁻⁴	.405	.6711 (N.S)
DENTRO DE GRUPOS	.0068205	27	2.52611 ⁻⁴		
TOTAL	.0070250	29			

(B)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	.0000905	2	4.52615 ⁻⁵	.583	.5653 (N.S)
DENTRO DE GRUPOS	.0020974	27	7.76798 ⁻⁵		
TOTAL	.0021879	29			

los tres tratamientos (diluciones). Los valores promedio se encontraron entre 23 y 30 μg de peso seco y 19 y 24 μg de peso seco libre de cenizas por millón de células.

De la misma manera, el contenido protéico celular por miligramo de peso seco y por miligramo de peso seco libre de cenizas tratado con la prueba de ANOVA, no mostró diferencias significativas entre las tres razones de dilución (Tabla VIII) y los valores promedio referidos a peso seco se distribuyeron entre 300 y 310 μg , y entre 350 y 370 μg en base a peso seco libre de cenizas; lo que indica un contenido aproximado del 30% y 36%, de proteína respectivamente.

III.4.2 Curva de Crecimiento

Los cultivos estáticos en minicarboys alcanzaron la fase estacionaria en el noveno día de cultivo, cuando tenían una densidad celular de 8.5 millones de células por mililitro (Tabla IX y Fig. 7). Aún cuando en la figura 7 se aprecia un continuo incremento de la fluorescencia, el conteo de células, así como los valores de la tasa de crecimiento muestran que el crecimiento fue casi nulo. Las mayores tasas de crecimiento se dieron durante los primeros tres días y se mantuvieron aproximadamente constantes, con algunas irregularidades hacia el final del experimento.

TABLA VIII.- Análisis de varianza de una vía para los datos de (A) porcentaje de proteínas en peso seco y (B) porcentaje de proteínas en peso seco libre de cenizas de *Isochrysis* sp. en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 30-50% (alternada) y 40-60% (alternada).

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	178.70	2	89.3507	.016	.9838 (N.S)
DENTRO DE GRUPOS	207789.69	38	5468.1498		
TOTAL	207968.40	40			

(B)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	2770.89	2	1385.4435	.237	.7900 (N.S)
DENTRO DE GRUPOS	221972.96	38	5841.3937		
TOTAL	224743.85	40			

TABLA IX.- Parámetros poblacionales de *Isochrysis* sp. en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

DIAS	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BIOMASA	5.2	7.4	8.9	9.8	10.2	10.6	10.9	11.7	12.0	12.5	12.9
CELULAS $\times 10^6$ /mL	0.1	0.4	1.1	2.0	2.3	2.6	4.6	5.9	6.3	8.5	8.6
TASA DE CRECIMIENTO (μ)		2.1	1.5	0.8	0.3	0.3	0.3	0.7	0.3	0.5	0.3
TIEMPO DE DUPLICACION		0.4	0.6	1.1	2.6	2.5	2.9	1.3	3.0	1.9	2.7

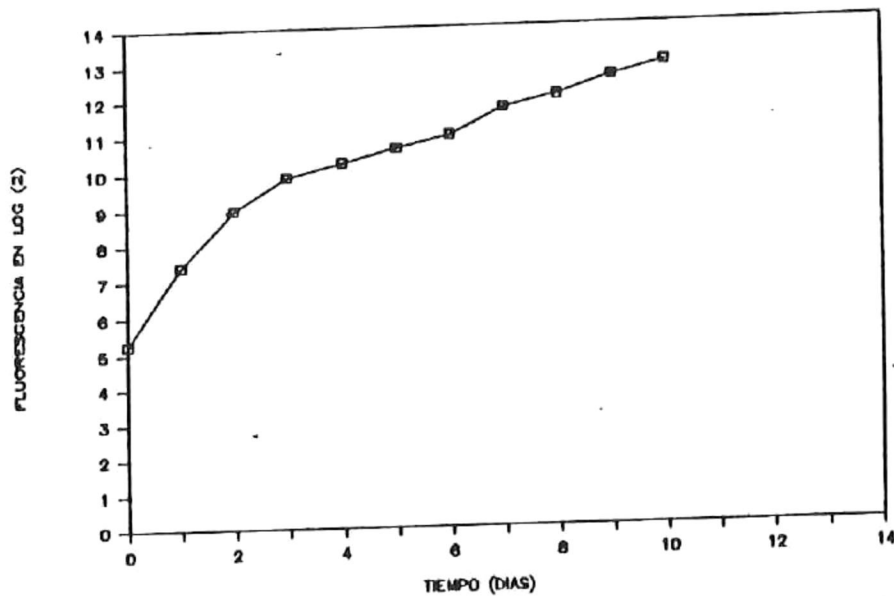


Figura 7.- Curva de crecimiento de *Isochrysis* sp. en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

mayores tasas de crecimiento se dieron durante los primeros tres días y se mantuvieron aproximadamente constantes, con algunas irregularidades hacia el final del experimento.

Los valores promedio de peso seco, peso seco libre de cenizas y porcentaje de contenido de cenizas (Tabla X) muestran una variación temporal sin una tendencia bien definida. Sin embargo, los valores más altos de cenizas se encuentran en los días ocho y nueve que marcan, como se mencionó anteriormente, el inicio de la fase de crecimiento estacionario.

III.4.3 Extracción de Proteínas

Los datos obtenidos en esta fase fueron normales. La tabla XI presenta los resultados obtenidos en la prueba ANOVA de una vía y el análisis *a posteriori* de comparación múltiple (LSD) realizados con el fin de establecer las mejores condiciones de extracción. A partir de los resultados estadísticos y del hecho de que los mayores valores se dieron en las condiciones límites de normalidad (0.1 N), de temperatura (60 y 100°C) y de tiempo (10 minutos) se decidió realizar unas pruebas adicionales, fuera de estos límites, para verificar si los valores obtenidos correspondían a los óptimos. Estos valores adicionales, aunque altos (Tabla XII), fueron menores a los valores más altos obtenidos anteriormente y confirman que

TABLA X.- Peso seco y peso seco libre de cenizas ($\mu\text{g}/10^6$ cel.) y cenizas (%) de Isocrhysis sp. en cultivo estático.

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PESO SECO ($\mu\text{g}/10^6$ cel.)	39.0 ± 0	30.4 ± 0	23.2 ± 4	32.5 ± 0	41.8 ± 6	23.9 ± 5	28.0 ± 2	32.8 ± 1	43.6 ± 5
PESO SECO LIBRE DE CENIZAS ($\mu\text{g}/10^6$ cel.)	36.4 ± 0	28.0 ± 0	21.3 ± 4	31.9 ± 2	39.2 ± 7	21.7 ± 5	25.1 ± 2	30.6 ± 4	36.8 ± 1
CENIZAS (%)	6.5	7.9	7.2	7.2	7.7	7.7	7.3	12.7	12.7

TABLA XI.- (A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (LSD) para los datos de extracción de proteínas en *Isochrysis* sp. a normalidad de NaOH, temperatura (°C) y tiempo (min.) diferentes.

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	169107.39	26	6504.1302	21.9	.0000 (B)
DENTRO DE GRUPOS	16008.75	54	296.4511		
TOTAL	185115.75	80			

(B)			
TRATAMIENTO	MEDIA		HOMOGENEIDAD DE GRUPOS
Normalidad °C	minutos		
1.0	100	10	185.28
1.0	100	20	208.51
1.0	60	30	213.37
0.5	100	30	215.33
0.5	100	10	217.90
0.1	60	20	220.48
0.5	100	20	221.07
0.1	80	30	229.72
0.1	80	20	231.92
1.0	80	10	238.77
1.0	80	20	241.92
0.5	80	10	248.92
1.0	80	30	251.18
0.1	100	30	257.70
0.5	80	20	258.51
1.0	60	10	258.55
0.1	60	10	261.90
0.5	80	30	266.10
1.0	100	30	267.48
0.1	100	20	267.67
0.1	60	30	271.34
0.1	80	20	282.30
0.1	80	10	297.22
0.1	100	10	341.11
0.5	60	30	343.06
0.5	60	20	360.53
0.5	60	10	363.21

TABLA XII.- Pruebas adicionales para determinar las condiciones óptimas de extracción de proteínas en Isochrysis sp.

Normalidad	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	µg/mg peso seco
0.05	100	10	315
0.10	100	10	335
0.50	50	10	323

la tendencia es hacia normalidades bajas (0.05, 0.1) y temperaturas altas (100°C) preferentemente o normalidad media (0.5) a baja temperatura (60°C). De los resultados anteriores se tiene que las condiciones óptimas de extracción fueron NaOH 0.5 N, una temperatura de 60°C y un tiempo de 10 minutos.

III.4.4 Proteínas

Establecidas las condiciones óptimas de extracción de proteínas, se analizaron las muestras correspondientes a los días 2,3,6,7,8 y 9 de cultivo. En los datos se observa una marcada tendencia de la concentración de proteínas a disminuir después del tercer día (Tabla XIII y Fig. 8). El contenido protéico celular va de un máximo de 58.7% para peso seco y 63.1% en peso seco libre de cenizas para el tercer día, hasta 35.8% y 43.5% respectivamente, para el noveno día.

TABLA XIII.- Variación en la concentración de proteínas (% de peso seco y % de peso seco libre de cenizas) en *Isochrysis* sp. en cultivo estático.

DIAS	2	3	6	7	8	9
PROTEINAS (% de peso seco)	24.7	58.7	44.7	41.8	39.0	35.8
PROTEINAS (% de peso seco libre de cenizas)	26.9	63.1	49.0	46.7	46.1	43.5

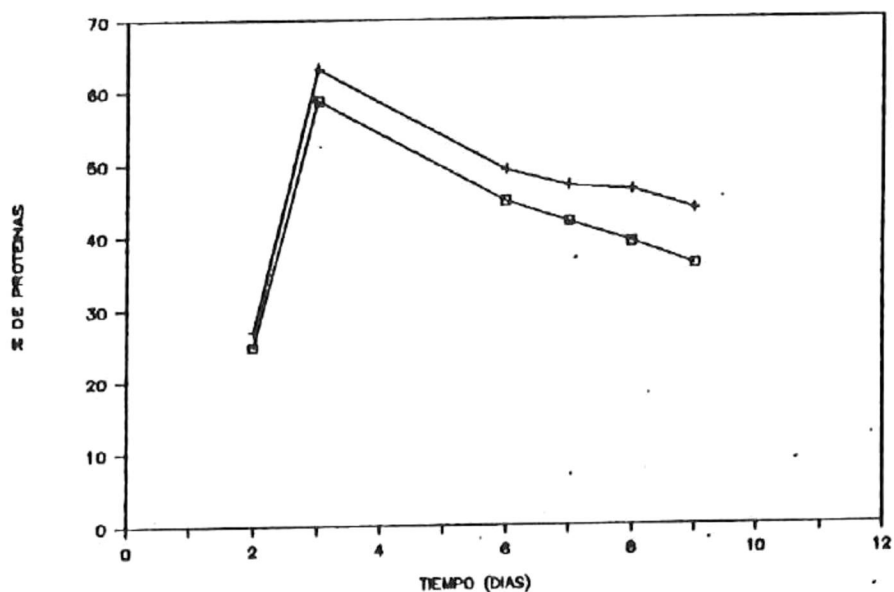


Figura B.- Porcentaje de contenido protéico celular de *Isochrysis* sp. en base a peso seco (O) y peso seco libre de cenizas (+).

III.5 Skeletonema menzelii

III.5.1 Cultivo Semicontinuo

La figura 9 ilustra los resultados del único de los varios intentos de cultivo de S. menzelii que resultó exitoso, aunque las variaciones de crecimiento dieron como resultado una curva anómala. Durante los primeros días de dilución se observó una disminución muy pronunciada de la biomasa y una alta concentración de bacterias, lo cual se trató de remediar mediante una serie de diluciones de 50% (día 3) y 80% (día 5) después de las cuales el cultivo se recuperó y su biomasa aumentó rápidamente en los tres días siguientes, que fue cuando se alcanzó un estado estable del cultivo con diluciones diarias del 65% (día 10) y 75% durante los siguientes seis días. Después de éstos, la biomasa disminuyó notablemente, encontrándose una alta concentración de bacterias y de microflagelados.

III.5.2 Curva de crecimiento

Los cultivos estáticos en minicarboys alcanzaron la fase estacionaria en el quinto día, con una densidad celular de 1.7 millones de células por mililitro (Tabla XIV y Fig. 10); la máxima tasa de crecimiento (2.6 div./día) se dió en el primer día, donde se observa una pendiente pronunciada y las mayores durante los primeros tres días. Estas disminuyeron hacia el final del experimento, cuando

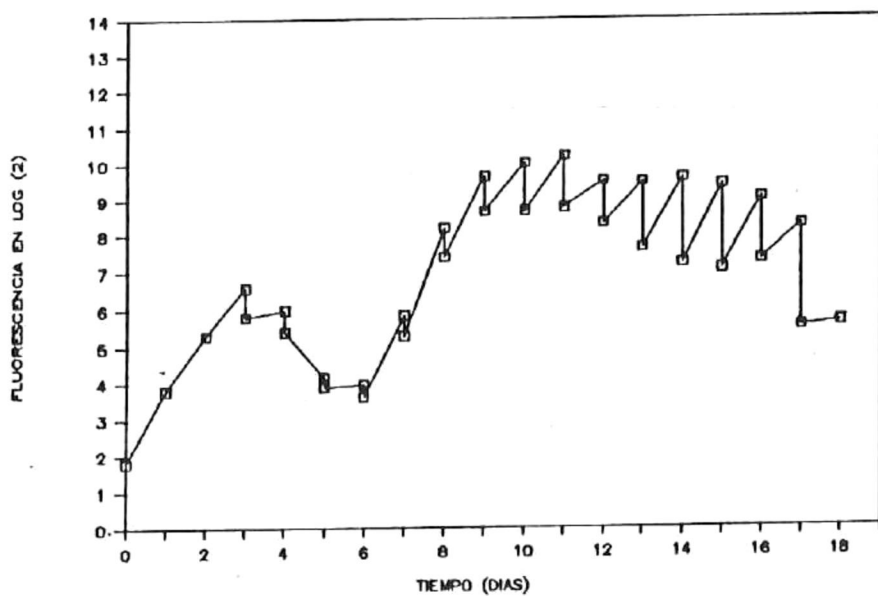


Figura 9.- Curva de crecimiento de *Skeletonema menzeli* a nivel semimasivo (10 L) en un sistema semicontinuo. Fase estable del día 10 al 15 con una dilución del 75% y una tasa de crecimiento de 1.3-2.0 div./día. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

TABLA XIV.- Parámetros poblacionales de Skeletonema menzeli en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

DIAS	0	1	2	3	4	5	6	7
BIOMASA	3.5	6.2	7.3	8.4	9.2	9.9	9.7	9.9
CELULAS $\times 10^6$ /mL	0.1	0.3	0.4	1.0	1.3	1.7	1.6	1.7
TASA DE CRECIMIENTO (μ)		2.6	1.0	1.1	0.8	0.7	-0.1	0.2
TIEMPO DE DUPLICACION		0.3	0.9	0.9	1.2	1.3		4.8

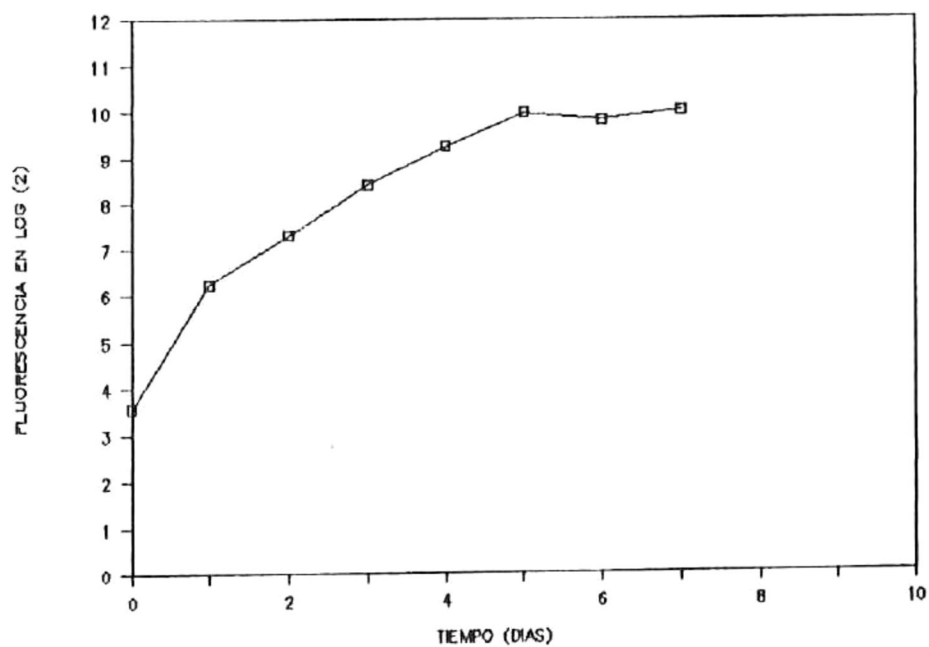


Figura 10.- Curva de crecimiento de Skeletonema menzeli en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

las células comenzaron a formar grumos, a crecer anormalmente y a aumentar de tamaño. Durante todo el experimento las células formaron grumos lo cual dificultó el conteo celular, por lo que el número de células aquí reportado tiene que considerarse aproximado.

Los valores de peso seco, peso seco libre de cenizas y porcentaje de cenizas presentan una tendencia a decrecer conforme el tiempo avanza (Tabla XV), existiendo una variación del 50% entre los valores inicial y final de peso seco y peso seco libre de cenizas. La variación en porcentaje de cenizas es mínima, manteniéndose alrededor del 69% con excepción del quinto día en el que se dieron los valores más bajos para las tres fracciones.

III.5.3 Extracción de Proteínas

La Tabla XVI presenta los datos obtenidos y los resultados del análisis de varianza y comparación múltiple (LSD), del cual se desprende que algunos de los resultados obtenidos con NaOH de normalidad inferior a 1.0 N son significativamente superiores e iguales entre sí. También se observa que las temperaturas más adecuadas son 80 y 100°C a tiempos de 20 y 30 minutos para la primera y de 10 minutos para la segunda, y que la normalidad de NaOH predominante es de 0.5, pero la mayor extracción se logró

TABLA XV.- Peso seco y peso seco libre de cenizas ($\mu\text{g}/10^6$ cel.) y cenizas (%) de Skeletonema menzeli en cultivo estático.

DIAS	2	3	4	5	6
PESO SECO ($\mu\text{g}/10^6$ cel.)	400 \pm 90	273 \pm 44	202 \pm 43	91 \pm 6	162 \pm 40
PESO SECO LIBRE DE CENIZAS ($\mu\text{g}/10^6$ cel.)	118 \pm 19	86 \pm 14	62 \pm 4	50 \pm 9	55 \pm 19
CENIZAS (%)	70	69	69	45	66

TABLA XVI.- (A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (LSD) para los datos de extracción de proteínas de Skeletonema menziesii a normalidad de NaOH, temperatura (°C) y tiempo (min.) diferentes.

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	53843.711	26	2070.9119	5.796	.0000 (S)
DENTRO DE GRUPOS	19295.528	54	357.3246		
TOTAL	73139.239	80			

(B)				
TRATAMIENTO	MEDIA		HOMOGENEIDAD DE GRUPOS	
Normalidad °C	minutos			
0.1	60	10	99.65	
0.1	60	20	127.24	
1.0	80	20	140.46	
0.5	60	10	149.08	
0.5	60	20	158.85	
0.1	80	10	162.88	
0.1	60	30	163.45	
0.1	80	20	164.03	
1.0	80	30	165.75	
1.0	60	30	165.75	
0.5	100	30	168.63	
0.1	80	30	170.35	
1.0	100	10	179.55	
1.0	60	20	184.15	
0.5	80	10	185.87	
1.0	100	20	187.02	
0.5	100	20	189.89	
0.1	100	20	191.62	
0.5	100	10	191.62	
0.5	80	30	192.77	
0.5	80	20	195.07	
1.0	80	10	195.64	
1.0	100	30	197.37	
0.5	60	30	200.24	
1.0	60	10	203.11	
0.1	100	30	206.56	
0.1	100	10	220.36	

con la normalidad de 0.1. De acuerdo a estos resultados se decidió que las condiciones óptimas de extracción eran con NaOH 0.1 N, temperatura de 100°C y tiempo de 10 minutos.

III.5.4 Proteínas

Los resultados obtenidos se dan como porcentaje de proteínas en peso seco total y peso seco libre de cenizas (Tabla XVII). Las proteínas tienden a incrementarse con el tiempo, variando de 1.7% hasta 8.3% en peso seco y de 5.7% a 22.9% en peso seco libre de cenizas (Fig. 11).

TABLA XVII: Variación en la concentración de proteínas en *Skeletonema menzeli* en cultivo estático.

DIAS	2	3	4	5	6
PROTEINAS (% de peso seco)	1.7	2.3	3.7	7.2	8.3
PROTEINAS (% de peso seco libre de cenizas)	5.7	6.9	11.7	17.4	22.9

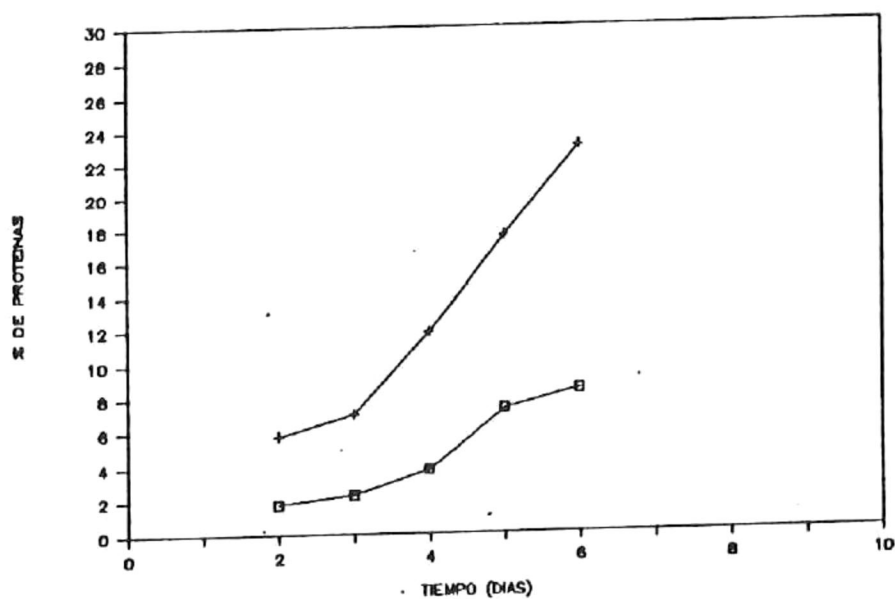


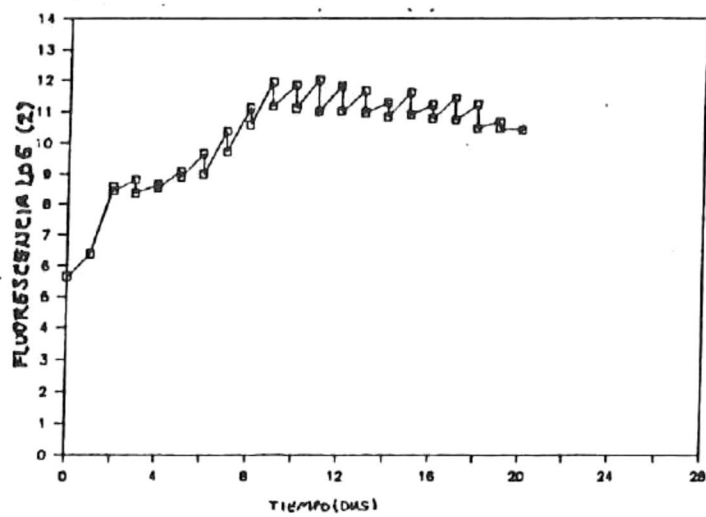
Figura 11.- Porcentaje de contenido proteico celular de *Skeletonema menzeli* en base a peso seco (Q) y peso seco libre de cenizas (+).

III.6 Thalassiosira pseudonana (3H)

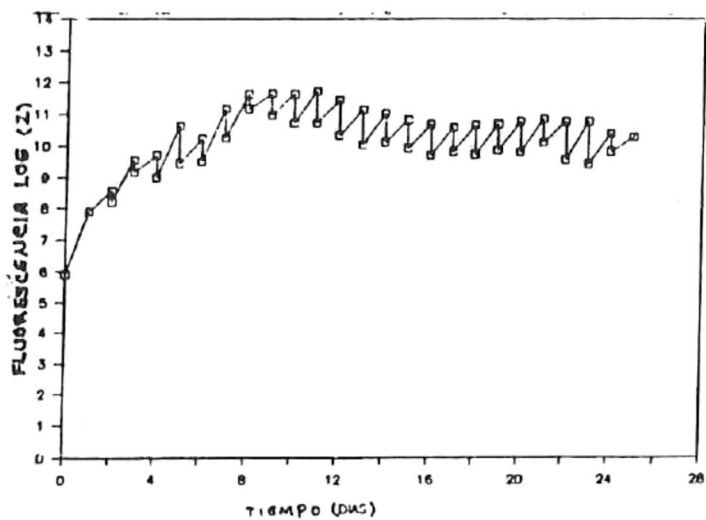
III.6.1 Cultivo Semicontinuo

El análisis estadístico de los resultados de fluorescencia, obtenidos con Thalassiosira pseudonana cultivada en un sistema semicontinuo a razones de dilución 40%, 50%, 60% y 70%, demostró que no había diferencias significativas entre réplicas, por lo cual se decidió emplear los valores promedio de cada dilución para representar el crecimiento y la fase de estabilización de la microalga.

Los cultivos semicontinuos se mantuvieron por un total de 26 días, a excepción del cultivo correspondiente a la dilución de 40%, el cual sólo se mantuvo por 20 días. La fase estable inició en el día 11 y duró un lapso de nueve días para la dilución de 40% y 15 días para el resto de los cultivos; después de estas fechas los cultivos decayeron, y se notaron altas concentraciones de bacterias y de microflagelados en todos ellos (Fig. 12). En los días nueve y diez se observaron los valores máximos de biomasa en todos los cultivos, que después decrecieron un poco y se estabilizaron a diferentes niveles, según las tasas de dilución. La biomasa obtenida durante la fase estable para cada uno de los cultivos se muestra en la tabla XVIII. La

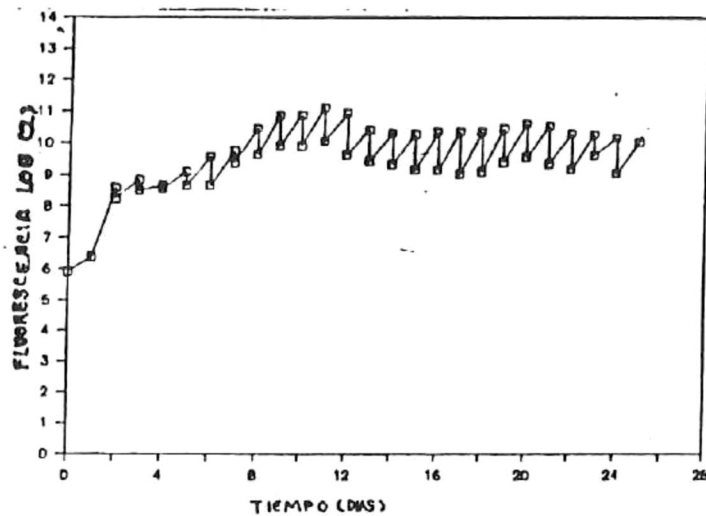


(a)

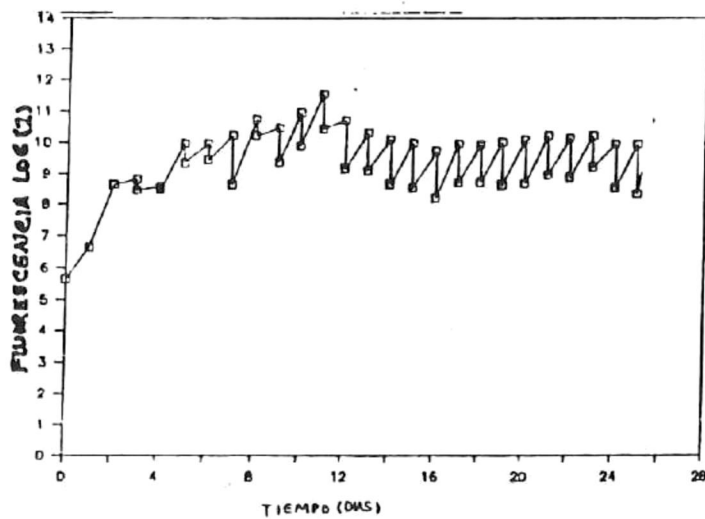


(b)

Figura 12.- Curvas de crecimiento y de dilución, a(40%) y b(50%), de *Thalassiosira pseudonana*. Biomasa en log₂ de unidades de fluorescencia.



(c)



(d)

Figura 12 cont.- Curvas de crecimiento y de dilución, c(60%) y d(70%), de Thalassiosira pseudonana. Biomasa en \log^2 de unidades de fluorescencia.

TABLA XVIII.- Valores promedio de los parámetros medidos en un cultivo semimasivo de *Thalassiosira pseudonana* a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.

DILUCION (%)	40	50	60	70
UNIDADES DE FLUORESCENCIA	2883	1843	1461	1299
CELULAS $\times 10^6$ /mL	6.1 \pm 1.8	4.9 \pm 1.2	4.1 \pm 0.8	3.9 \pm 1.2
PESO SECO (μ g/ 10^6 cel.)	68 \pm 11	74 \pm 10	56 \pm 22	85 \pm 12
PESO SECO LIBRE DE CENIZAS (μ g/ 10^6 cel.)	29 \pm 5	32 \pm 6	28 \pm 11	36 \pm 3
CENIZAS (%)	58	57	50	58
PROTEINAS (% de peso seco)	17	18	24	21
PROTEINAS (% de peso seco libre de cenizas)	42	43	57	50

biomasa por unidad de volumen fue inversa a la razón de dilución, por lo que la mayor biomasa se logró con la menor dilución.

Los valores promedio de biomasa, en unidades de fluorescencia, comparados con la prueba no paramétrica de una vía (Kruskal Wallis) no mostraron diferencias significativas entre las diluciones de 40% y 50% y entre 60% y 70%, pero existieron diferencias significativas entre los dos grupos (Tabla XIX).

Dado que no había diferencias significativas entre réplicas, se compararon los datos de peso seco y peso seco libre de cenizas de cada razón de dilución y no se encontraron diferencias significativas, en peso seco, entre la dilución de 40% y las de 50% y 60% y entre la de 50% y la de 70% (Tabla XX). En cuanto a peso seco libre de cenizas, sólo resultaron diferentes las diluciones de 60% y 70% (Tabla XXI). El mayor valor promedio de peso seco y peso seco libre de cenizas correspondió a la mayor dilución que es del 70%.

En cuanto a contenido protéico, las diluciones de 40% y 50% fueron las únicas que no resultaron significativamente diferentes (Tablas XXII y XXIII)

TABLA XIX.- Decisión de la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple para los datos de fluorescencia de Thalassiosira pseudonana en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.

---Al nivel de significancia de 0.05 H0 se rechaza (S).				
Comparación Múltiple				
DILUCIONES	40%	50%	60%	70%
40%	---	N.S	S	S
50%		---	S	S
60%			---	N.S
70%				---

TABLA XX.- (A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (SNK) para los datos de peso seco de *Thalassiosira pseudonana* en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA A
ENTRE GRUPOS	0051773	3	.0017258	7.947	.0002 (S)
DENTRO DE GRUPOS	.0095552	44	.0002172		
TOTAL	.0147325	47			

(B)				
DILUCIONES	40%	50%	60%	70%
40%	---	N.S	N.S	S
50%		---	S	N.S
60%			---	S
70%				---

TABLA XXI.- (A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (SNK) para los datos de peso seco libre de cenizas en Thalassiosira pseudonana en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	.0004582	3	1.5273 ⁻⁴	2.808	.0505 (N.S)
DENTRO DE GRUPOS	.0023929	44	5.43840 ⁻⁵		
TOTAL	.0028511	47			

(B)				
DILUCIONES	40%	50%	60%	70%
40%	---	N.S	N.S	N.S
50%		---	N.S	N.S
60%			---	S
70%				---

TABLA XXII.- (A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (SNK) para los datos de proteínas, en base a peso seco, de *Thalassiosira pseudonana* en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo, a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	50828.115	3	16942.705	13.60 2	.0000 (S)
DENTRO DE GRUPOS	85946.111	69	1245.596		
TOTAL	136774.23	72			

(B)				
DILUCIONES	40%	50%	60%	70%
40%	---	N.S	S	S
50%		---	S	S
60%				S
70%				---

TABLA XXIII.- (A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (SNK) para los datos de proteínas en base a peso seco libre de cenizas de Thalassiosira pseudonana en cultivo semimasivo (10 L) y semicontinuo, a razones de dilución de 40%, 50%, 60% y 70%.

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	288480.80	3	96160.267	13.52 9	.0000 (S)
DENTRO DE GRUPOS	490427.76	69	7107.649		
TOTAL	778908	72			

(B)				
DILUCIONES	40%	50%	60%	70%
40%	---	N.S	S	S
50%		---	S	S
60%			---	S
70%				---

Los valores de peso seco, peso seco libre de cenizas y proteínas aumentaron ligeramente conforme aumentó la dilución, exceptuando los pesos correspondientes a la dilución del 60% que fueron los menores, con la más alta desviación estándar, pero que presentaron los más altos valores de contenido protéico. Así tenemos que las proteínas mostraron porcentajes de 17% y 42% (dil. 40%), 18% y 43% (dil. 50%), 24% y 57% (dil. 60%), y 21% y 50% (dil. 70%) en peso seco y peso seco libre de cenizas respectivamente. El contenido de cenizas para todos los cultivos fue de 50 a 60% del peso seco.

III.6.2 Curva de crecimiento

Los cultivos se mantuvieron en un sistema estático durante ocho días, alcanzando la mayor densidad celular (10.4 millones de células por mililitro) en el séptimo día (Tabla XXIV y Fig. 13). La densidad disminuyó significativamente al octavo día, cuando se observó que las células se aglutinaron, formando grumos que se precipitaron al fondo del minicarboy sin que existiera una alta concentración de bacterias. Las más altas tasas de crecimiento se presentaron durante los tres primeros días.

Los valores de peso seco y peso seco libre de cenizas, obtenidos a partir de las muestras tomadas los días 1, 3, 5, 6 y 7 de cultivo (Tabla XXV), mostraron los mayores

TABLA XXIV.- Parámetros poblacionales de *Thalassiosira pseudonana* en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

DIAS	0	1	2	3	4	5	6	7	8
BIOMASA	6.3	7.9	9.6	11.0	11.4	11.7	11.9	12.1	11.9
CELULAS $\times 10^6$ /mL	0.3	1.0	1.5	4.6	5.3	7.0	9.3	10.4	8.2
TASA DE CRECIMIENTO (μ)		1.5	1.6	1.4	0.4	0.2	0.1	0.2	-0.1
TIEMPO DE DUPLICACION		0.6	0.5	0.7	2.4	3.5	5.3	4.4	

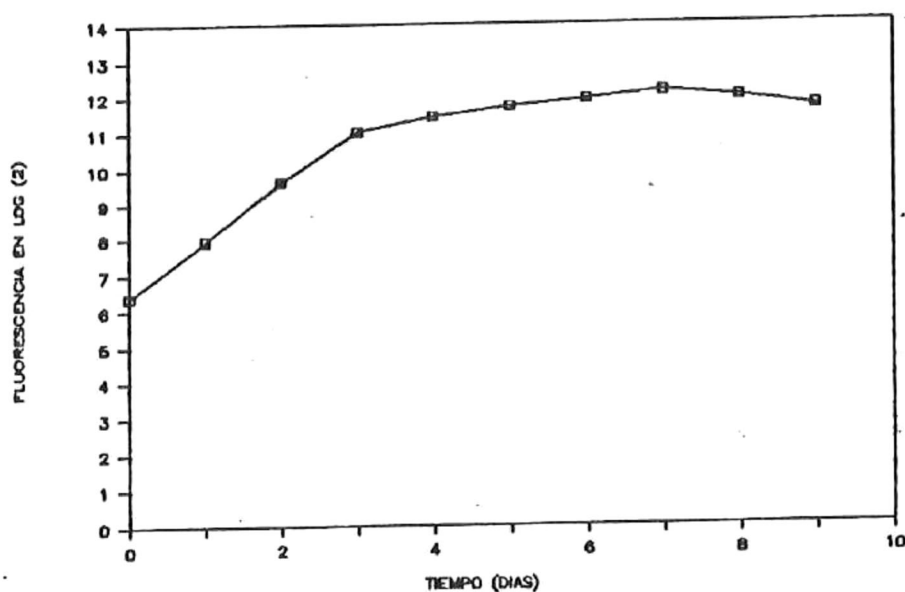


Figura 13.- Curva de crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* en cultivo estático. Biomasa en \log_2 de unidades de fluorescencia.

TABLA XXV.- Peso seco y peso seco libre de cenizas ($\mu\text{g}/10^6$ cel.) y cenizas (%) de Thalassiosira pseudonana en cultivo estático.

DIAS	1	3	5	6	7
PESO SECO ($\mu\text{g}/10^6$ cel)	28 \pm 5	20 \pm 3	31 \pm 1	27 \pm 4	32 \pm 7
PESO SECO LIBRE DE CENIZAS ($\mu\text{g}/10^6$ cel.)	20 \pm 3	19 \pm 3	24 \pm 0	20 \pm 4	25 \pm 6
CENIZAS (%)	30	4	22	25	21

pesos en los días quinto y séptimo, y valores de cenizas muy variables, con el valor más alto (30%) el primer día y un valor muy fuera de lo normal (4%) para el tercer día. A este último día correspondieron también el valor más bajo de peso seco (20 µg) y una de las tasas de crecimiento más altas (1.4 div./día). En general, estos resultados tuvieron una tendencia a permanecer estables, a excepción de los valores del tercer día.

III.6.3 Extracción de Proteínas

La Tabla XXVI presenta los resultados de las pruebas ANOVA y LSD de las cuales se desprende que los resultados obtenidos con NaOH de normalidad inferior a 1.0 y temperaturas de 80 y 100°C fueron significativamente superiores e iguales entre sí. A partir de estos resultados estadísticos, se realizaron pruebas adicionales a las condiciones establecidas, cuyos resultados se dan en la tabla XXVII. En las dos tablas se observa que los valores más altos se dieron a una normalidad de 0.1 por tiempos prolongados (30, 40 minutos) y temperaturas altas, y que a una normalidad de 0.5 los tiempos son cortos (10, 20 minutos) a temperaturas altas; mientras que el uso de NaOH 1.0 N resultó en valores bajos de proteínas. De estos resultados se decidió que las condiciones óptimas de extracción eran con NaOH 0.5 N, a temperatura de 80°C y un

TABLA XXVI.- (A) Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y (B) comparación múltiple (LSD) para los datos de extracción de proteínas de *Thalassiosira pseudonana* a normalidad de NaOH, temperatura (°C) y tiempo (min.) diferentes.

(A)					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L	CUADRADOS MEDIOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	382156.13	26	143698.313	75.064	.0000 (S)
DENTRO DE GRUPOS	10573.70	54	195.89		
TOTAL	392729.83	80			

(B)				
TRATAMIENTO	Normalidad		MEDIA	HOMOGENEIDAD DE GRUPOS
	°C	minutos		
0.1	60	10	186.73	
0.1	60	20	192.96	
0.1	60	30	208.78	
0.1	80	10	281.19	
1.0	100	30	294.34	
0.5	60	10	320.73	
0.5	100	10	336.87	
1.0	60	10	339.32	
0.5	60	20	363.05	
0.1	100	10	363.76	
1.0	60	20	369.00	
1.0	80	30	369.74	
0.5	60	30	370.56	
1.0	60	30	371.32	
1.0	100	20	373.76	
1.0	80	20	388.20	
0.5	80	20	389.28	
0.1	100	30	391.46	
0.1	100	20	400.56	
0.5	80	30	402.43	
1.0	80	10	403.32	
0.5	100	10	419.22	
1.0	100	10	420.27	
0.5	80	10	424.29	
0.5	100	10	424.69	
0.5	80	20	429.17	
0.1	80	30	429.54	

TABLA XXVII.- Pruebas adicionales para determinar las condiciones óptimas de extracción de proteínas de Thalassiosira pseudonana.

Normalidad	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	ug
0.1	100	30	400
0.1	80	30	436
0.1	80	40	426
0.5	100	10	428
0.5	80	20	451
1.0	100	10	305

tiempo de 20 minutos.

III.6.4 Proteínas

Las proteínas decrecieron con el tiempo de cultivo, aunque se incrementaron repentinamente en el séptimo día que también correspondió a los valores de peso seco y peso seco libre de cenizas más altos (Tabla XXVIII y Fig. 14).

TABLA XXVIII.- Variación en la concentración de proteínas durante el crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* en cultivo estático.

DIAS	1	3	5	6	7
PROTEINAS (% de peso seco)	50	52	31	26	35
PROTEINAS (% de peso seco libre de cenizas)	72	54	40	35	44

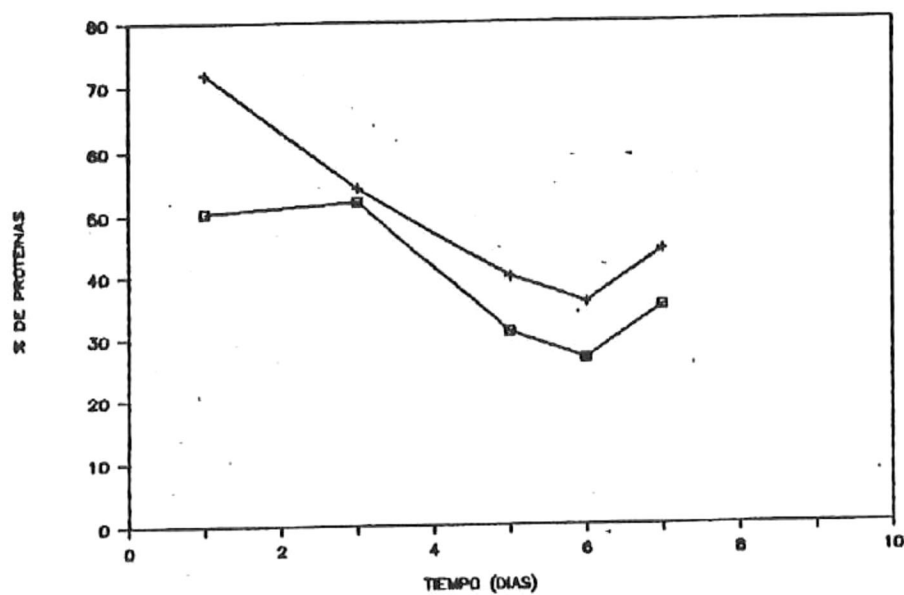


Figura 14.- Contenido protéico de *Thalassiosira pseudonana* en cultivo estático en base a peso seco (D) y peso seco libre de cenizas (+).

IV DISCUSION

IV.1 Chaetoceros sp.

Los resultados negativos de las diluciones mayores de 40% comprobaron que esta cepa, como otras del mismo género, sólo acepta diluciones menores del 60% (López-Ellias, 1990; Roadhouse *et al.*, 1983). A la vez, la baja tasa de crecimiento favorece la acumulación de productos extracelulares, producidos por la microalga (Guillard, 1983), ayudando así a que las células se aglutinen y formen grumos (Kiorbe *et al.*, 1990) que propician el desarrollo de bacterias y por consiguiente la aparición de microflagelados y el colapso del cultivo.

González-Leonardo (1991) encontró que esta cepa, cultivada en un medio simplificado, alcanza niveles de tasa de crecimiento y de biomasa similares a los obtenidos en medio f, pero éstos solo se mantienen por dos o tres días, después de los cuales se presentan células anormales.

Los resultados arriba mencionados mostraron claramente que no sería costeable el cultivo de esta microalga, dado que todavía no se definió la técnica de su cultivo y además porque sería difícil reducir los costos implicados en la preparación del medio de cultivo, ya que la cepa no acepta fácilmente medios de cultivo simplificados.

IV.2 Skeletonema costatum

Los resultados obtenidos confirmaron la alta tasa reproductiva de S. costatum, que permitió alcanzar concentraciones de 11 millones de células por mililitro en sólo cinco días, pero indicaron que su crecimiento, en condiciones de alta concentración celular, sólo permite diluciones inferiores al 50%, lo que produce grandes cantidades de exudados y la consiguiente tendencia a aglutinarse y sedimentarse (Kiorbe et al., 1990). Esto, y el hecho de no aceptar medios simplificados (González-Leonardo, 1991) fueron las razones para no incluir esta especie en nuestro estudio, dada la cantidad de información disponible sobre cultivos estáticos de esta cepa (Voltolina et al., 1989)

IV.3 Thalassiosira sp.

El cultivo de esta especie sólo fue a nivel semimasivo y con resultados negativos, dado que las células tendieron a aglutinarse y precipitarse al fondo, logrando que el cultivo se colapsara.

Por sus características de tamaño, tasa de reproducción alta y por ser de origen local podría ser una cepa de posible explotación si fuera posible determinar la técnica adecuada para su cultivo.

IV.4 Isochrysis sp.

IV.4.1. Cultivo

Las razones de dilución probadas exitosamente con esta especie fueron menores a las máximas tasas de crecimiento de la microalga. Esto confirma el resultado obtenido con el experimento de crecimiento, o sea que esta cepa tiene una larga fase de crecimiento lento, con una μ aproximadamente constante dentro de un amplio rango de concentraciones celulares, dado que los cultivos para las tres diferentes razones de dilución se mantuvieron aproximadamente estables por 16 días (Fig. 6). Esto comprueba que la microalga puede ser cultivada a cualquiera de las tres diluciones sin correr riesgo de lavar al cultivo. Sin embargo, existió una diferencia significativa en biomasa entre la dilución de 60-40% (alternada) con las dos restantes (Tabla VI), teniendo la primera los valores menores.

La dilución del 40% presentó la mayor densidad celular con una desviación estándar de sólo un millón de células y poca variación durante su fase estable, lo que la señaló como la mejor razón de dilución probada. La dilución de 30-50%, aunque presentó una densidad celular similar a la anterior, mostró variaciones en su fase estable que hacen que tenga una desviación estándar de casi dos millones, que

es una variación del 30%. Esta variación pudo deberse a que las diluciones de 30% y 50% mantuvieron en desequilibrio al cultivo, dado que una de ellas cae dentro de la fase de crecimiento lento (30%) y la otra representa la tasa máxima que soporta la microalga (Cordero-Esquivel, C.I.C.E.S.E., com. pers.).

Los tres diferentes cultivos no mostraron diferencias significativas en peso seco, peso seco libre de cenizas y porcentaje de proteínas (Tablas VII y VIII), lo cual confirmaría que las células se encuentran en la misma fase de crecimiento lento. Algo similar reportó Whyte (1987), quien sólo encontró ligeras diferencias en porcentajes de proteínas entre la fase exponencial y la estacionaria. Aunque no confirmado estadísticamente, se obtuvieron valores ligeramente superiores, en peso seco, peso seco libre de cenizas y porcentaje de cenizas, con la mayor dilución.

En promedio, se obtuvieron de 23 a 30 $\mu\text{g}/10^6$ cél. en peso seco, y de 19 a 24 μg de peso seco libre de cenizas, lo cual es comparable a los 20.8 μg obtenidos por Helm y Laing (1987) para esta microalga durante la fase de crecimiento exponencial. Asimismo, los porcentajes de materia orgánica atribuibles a las proteínas (35 a 42%) son comparables al 34.9% y 49% obtenido por Ben-Amotz *et al.* (1983) y Fernández-Reiriz *et al.* (1989) respectivamente en

la fase de crecimiento exponencial.

En este trabajo se obtuvieron porcentajes de cenizas de 12% a 27%, correspondiendo el mayor a la máxima dilución. Tan Tiu et al. (1989) reportaron 16.8% de cenizas para la fase estacionaria y Whyte (1987) sólo un 12% para la misma fase, aunque Fernández-Reiriz et al. (1989) obtuvieron porcentajes de cenizas de hasta el 30% en la fase estacionaria. Tales diferencias pueden deberse al tratamiento de las muestras, o a diferencias en el medio utilizado, o a la mayor o menor edad del cultivo al momento de tomar la muestra. Si las muestras filtradas o centrifugadas no son enjuagadas suficientemente se corre el riesgo de que queden residuos de sales provenientes del mismo medio.

Dado que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de peso seco total y libre de cenizas y de proteínas de las tres diluciones probadas, la producción a nivel masivo podría variar en función de las necesidades diarias de biomasa del acuicultor, en el sentido que el recambio de medio y la cosecha pueden ser variados conforme se vayan presentando las necesidades y por ende los costos de producción pueden ser disminuidos en algún porcentaje en función de la cosecha y recambio de medio que se realice, dado que un menor recambio, significa una menor utilización de nutrientes, medio de cultivo, energía y mano de obra.

IV.4.2 Curva de crecimiento

Los datos obtenidos en cultivo estático demostraron que esta cepa alcanza rápidamente, a una densidad celular todavía no muy elevada, la fase de crecimiento lento, y que ésta es de larga duración. La máxima tasa de crecimiento (2.1 div./día) es comparable a las obtenidas por González-Leonardo (1991). A partir del tercer día la tasa de crecimiento fluctuó entre valores altos como 0.8, 0.7 y 0.5 div./día con otros menores de 0.3. Los valores altos disminuyeron conforme avanzó el cultivo en el tiempo; así, por etapas, se fue de 0.8 a 0.7 a 0.5, teniendo valores intercalados de 0.3 (Tabla IX). Estos datos apoyan la idea que esta cepa sólo podría soportar diluciones mayores del 50% si el cultivo se mantuviera a densidades celulares incompatibles con fines productivos.

La fase estacionaria temprana comenzó entre los días 9 y 10, lo que concuerda con la curva de crecimiento obtenida por Fernández-Reiriz *et al.* (1989), en la cual el inicio de la fase estacionaria se dió en los días 10-12, obteniendo una tasa de crecimiento de 1.2 para los primeros días de cultivo, y una densidad celular de 8.3 millones de células por mililitro en la fase estacionaria, que es comparable con los 8.8 obtenidos en este trabajo, para la misma fase (Tabla IX).

El comportamiento de los valores de peso seco y peso seco libre de cenizas está caracterizado por una gran variabilidad, dado que no siguen una tendencia a aumentar o disminuir en forma constante (Tabla X). Tal variabilidad, debida probablemente al aumento o disminución en el tamaño de la célula, coincide con tres etapas marcadas plenamente por los incrementos súbitos en el número de células (Tabla IX). Después de un alto incremento en la biomasa como número de células, donde podrían tenerse células pequeñas, se obtuvieron los menores valores de ambos pesos.

Las cenizas por otra parte se mantuvieron sin variaciones significativas hasta el séptimo día, alrededor de un 7.4%, para después incrementarse hasta un 12.7% en los dos siguientes días, que marcaron presumiblemente la terminación de la fase de crecimiento lento (Tabla X). Los valores de cenizas corresponden a los mencionados por otros autores (Whyte, 1987; Tan Tiu, et al., 1989) para la fase exponencial y estacionaria.

Los porcentajes de proteína disminuyen con el tiempo en forma análoga a lo reportado por Utting (1985) para Isochrysis galbana, con la cual obtuvo un máximo de 67% de proteína en base a peso orgánico durante el crecimiento exponencial, y un 41% para la fase estacionaria, que coinciden con los valores de 63 y 43% obtenidos en este

trabajo (Tabla XIII y Fig. 8), y que son notablemente superiores a lo reportado por Fernández-Reiriz et al. (1989), de 42% y 20% respectivamente.

Los valores obtenidos demuestran que conforme el cultivo avanza en el tiempo y se acerca a la fase estacionaria, sufre cambios morfológicos y bioquímicos, dado que aumentan sus pesos secos total y libre de cenizas y el contenido de cenizas, mientras que baja la proporción de proteínas. Dado que estas variaciones en pesos y en contenido protéico están relacionadas con la tasa de crecimiento y con la edad del cultivo, sería posible establecer rutinas de cultivo que proporcionen biomasa de calidad conocida, de acuerdo a los requerimientos del acuicultor.

IV.5 Skeletonema menzeli

IV.5.1 Cultivo

El cultivo semimasivo (10 L), en un sistema semicontinuo, de esta microalga no ha dado buenos resultados; el mejor resultado que se obtuvo fue una fase estable de cinco días de duración. Esto se debe al hecho de que su crecimiento es muy rápido y que produce una gran cantidad de exudados, que pronto empiezan a aglutinar a las células causando la formación de grumos celulares, los cuales son un sustrato atractivo para el desarrollo de bacterias y con ello la proliferación de microflagelados que conllevan al colapso del cultivo (Rico-Mora, C.I.C.E.S.E., com. pers.; González-Leonardo, 1991).

Este cultivo creció en forma anómala en los primeros días. La dilución mejor, a la cual el cultivo retornaba a la biomasa anterior y se lograba eliminar gran cantidad de productos extracelulares y grumos de células sedimentados, fue de 75% (Fig. 10). Por no existir una réplica de este cultivo y dado que no existe información sobre su utilización como alimento y sobre la forma de cultivarla, es difícil dar un juicio sobre su uso potencial como dieta, por lo menos hasta encontrar el medio o técnica de cultivo apropiados para evitar la acumulación, si no la secreción de productos extracelulares y mantener al mismo tiempo una

alta tasa de crecimiento.

Por su rápido crecimiento, cualquier medio a desarrollarse deberá contar con una alta concentración de silicatos, que pueden ser limitantes en el crecimiento de las diatomeas (Paasche, 1973), dado que a bajas concentraciones de este nutriente se puede inhibir la división celular.

IV.5.2 Curva de crecimiento

En cultivo estático, Skeletonema menzeli registró una tasa de crecimiento de 2.6 div./día (Tabla XIV) la cual se aproxima al valor obtenido por Guillard et al., (1974) quienes reportan 3 divisiones por día para esta especie. También se notó que la fase de crecimiento lento fue casi inexistente, y fue seguida inmediatamente por la fase de decaimiento del cultivo (Fig. 11). Las tasas de crecimiento hacen suponer que esta cepa es capaz de soportar razones de dilución bastante altas, lo cual se comprobó con los cultivos semimasivos. Sin embargo, la densidad celular máxima alcanzada no superó los dos millones de células por mililitro (Tabla XIV). Este dato debe de tomarse como aproximado dada la dificultad que se tuvo en el conteo de células. En este momento las células empezaron a deformarse y aumentar en tamaño, lo que podría ser debido a divisiones celulares incompletas por un

fenómeno de limitación en algún factor, posiblemente un nutriente o algún otro que permita la asimilación de silicio, como sucede con la diatomea Thalassiosira pseudonana para la cual el fósforo es un factor limitante en la asimilación de los silicatos (Paasche, 1973). Este inconveniente podría ser resuelto, tal vez, con una adición extra de silicatos o determinando la naturaleza del factor limitante para suplirlo en concentración suficiente para el desarrollo del cultivo. También cabe la posibilidad de que ciertas bacterias inhiban el crecimiento de la microalga, como sucede en T. pseudonana en presencia de Pseudomonas (Kiorbe *et al.* 1990).

A pesar de la baja densidad celular del cultivo, se obtuvieron pesos secos y pesos secos libres de cenizas muy elevados, que van de 400 μg y 118 μg respectivamente, hasta 91 μg y 50 μg para el quinto día, lo cual es una disminución del 50% en peso, para después elevarse ligeramente en el último día. Los mayores valores de pesos se presentaron en los primeros días que fue cuando se observó la dominancia de células muy grandes, probablemente a punto de dividirse. En este caso, estos pesos tendrían que ser referidos a una cantidad doble de células. También la célula podría haberse encontrado en una etapa de almacenamiento de algún elemento para su utilización

posterior, como sería el nitrógeno en la forma de aminoácidos libres para síntesis a proteínas (Dortch et al., 1984).

Las proteínas en base a peso seco y peso seco libre de cenizas se incrementaron conforme avanzó el tiempo del cultivo, desde un mínimo para el segundo día de 1.7% y 5.7% en peso seco y peso orgánico respectivamente, hasta un 8.3% y 22.9%. Tales resultados concuerdan con lo sugerido por Fernández-Reiriz et al. (1989), quienes mencionan un incremento en las proteínas conforme avanza el tiempo de cultivo para las diatomeas en general. Esto puede deberse a la utilización del nitrógeno inicialmente almacenado como otros productos y que ahora es convertido a proteínas. Los valores que estos autores obtuvieron para Phaeodactylum tricornutum y Chaetoceros calcitrans en base a peso orgánico varió de 2% (fase exponencial), para ambas especies, hasta 17% y 14% (fase estacionaria) respectivamente. Whyte (1987), reporta también un incremento en el porcentaje de las proteínas hacia la fase de crecimiento estacionario en Ch. calcitrans, de 31% a 37%. Sin embargo, otros autores reportan una disminución en el porcentaje de proteínas de la célula conforme aumenta la edad del cultivo (Myklestad, 1974; López-Ellias, 1990).

Estos resultados contradictorios pueden deberse a las condiciones de cultivo, al medio utilizado, a las

condiciones ambientales (luz principalmente), a la etapa en la que se tomó la muestra, y posiblemente a la forma de extracción y de determinación de las proteínas (Webb y Chu, 1982; Fernandez-Reiriz et al., 1989; Volkman et al., 1989).

Para el caso de S. menzeli en medio f/2 modificado, la concentración de proteínas aumentó con respecto al tiempo. Al inicio del cultivo la microalga se encuentra altamente silicificada, lo que significa que presenta una fuerte pared celular difícil de romper, por lo que la extracción de las proteínas pudiera haber sido incompleta.

IV.6 Thalassiosira pseudonana

IV.6.1 Cultivo

T. pseudonana, cultivada a cuatro diferentes razones de dilución, presentó un mayor tiempo de cultivo y de estabilidad (25 y 15 días respectivamente) a diluciones mayores del 40%. Con la dilución del 40% sólo se obtuvo una duración de cultivo de 20 días, con nueve días de estabilidad, en los cuales las células se mantuvieron aisladas por un corto tiempo para después aglutinarse y formar grumos que precipitaban al fondo, facilitando el crecimiento de bacterias. Kiorbe et al. (1990) sugieren que tal formación de agregados se da en esta especie cuando se alcanzan altas densidades, hay limitación de nutrientes y baja la división celular, provocando una elevada excreción de mucus y de polisacáridos.

La comparación estadística entre las unidades de fluorescencia de las cuatro diluciones, mostró la formación de dos grupos, 40 y 50% y 60 y 70%, con una mayor biomasa en número de células (6.1×10^6 cél./mL) en la menor dilución. Volkman et al. (1989) reportan como producción óptima una densidad celular de 6.3×10^6 cél./mL.

Dado que la dilución del 50% es la que mostró una mayor estabilidad, se le consideró como la que dió mejor resultado. Paasche (1973) reportó haber cultivado esta

microalga, que mantuvo su estado estable a la razón de dilución de 50%. Los resultados obtenidos a partir de las dos diluciones restantes sólo confirman que esta cepa tiene la capacidad de recuperarse y mantenerse hasta diluciones del 70%. Esta información, junto con la que posteriormente se menciona, es de gran ayuda en la planeación de la producción de microalgas de acuerdo a nuestros requerimientos.

Los resultados promedio de peso seco, peso seco libre de cenizas y los porcentajes de proteínas mostraron una clara tendencia a incrementarse paralelamente con la dilución, con la excepción de los correspondientes a peso seco y peso orgánico de la dilución del 60%, donde se tuvieron los valores menores. Gallagher y Mann (1981) encontraron un aumento en la razón C/N a la dilución de 60%, que es una variación opuesta a la tendencia al aumento de las proteínas conforme aumenta la dilución, que sería indicada por una menor razón C/N.

Las comparaciones estadísticas entre pesos secos mostraron que a la dilución de 60% el peso fue significativamente menor que a las de 50% y 70% y que el de la dilución de 70% fue mayor que del que se obtuvo con el 40%. En peso seco libre de cenizas existieron solamente diferencias significativas entre los valores menores observados en la dilución de 60% y los máximos obtenidos en

la de 70%. Los valores de peso seco libre de cenizas se encuentran entre 29 y 36 $\mu\text{g}/10^6$ células en todas las diluciones.

Las diferencias en peso seco deben de todas formas tomarse con cautela, dado que el enjuagado de los filtros con agua destilada, pudo haber sido insuficiente para remover en su totalidad las sales del medio de cultivo en el filtro.

Las proteínas variaron de la misma manera, en cuanto a su relación con el peso seco y el peso seco libre de cenizas, no existiendo diferencias significativas entre las diluciones de 40% y 50% y con valores mayores en la mayor dilución.

Varios autores reportan concentraciones variables de proteínas en una misma fase: Epifanio *et al.* (1981) reportan 40% en base peso a seco. Flaak y Epifanio (1978) reportan 22% para la fase estacionaria y 44% en la fase exponencial, mientras que Whyte (1987) sólo reporta 21% para la fase exponencial y 17% para la fase estacionaria. Estos valores son superiores a los encontrados en este trabajo, donde el máximo es de 24% en base a peso seco; sin embargo, estos autores obtuvieron un porcentaje de cenizas de 20-30%, aproximadamente la mitad de lo que aquí se reporta (50-58%). Las cenizas no tuvieron una variación

significativa si se excluye el valor de la dilución de 60%, aunque Paasche (1973) menciona que las células se encuentran más silicificadas conforme la tasa de dilución aumenta, debido a una más rápida asimilación del silicato.

En general y agrupando todos los valores, la mejor dilución correspondería al 50%, con la cual se obtiene una estabilidad del cultivo, una alta densidad celular, un peso orgánico no diferente de los otros y un contenido de proteínas del 43% del peso orgánico.

IV.6.2 Curva de crecimiento.

El cultivo estático alcanzó su máxima densidad (10.4 millones de células por mililitro) en sólo ocho días, después de lo cual hubo formación de grumos y un rápido decaimiento de la biomasa, que podría deberse, según Kiorbe *et al.* (1990), a la alta densidad, a una limitación por nutrientes, a una excesiva excreción de polisacáridos consiguiente a la muy baja tasa de crecimiento y, tal vez, a la aparición de Pseudomonas, bacterias que inhiben el crecimiento de la microalga y que en el caso mencionado causaron el colapso del cultivo en sólo dos días. Los factores anteriores provocan una fase estacionaria muy corta si no se controlan o evitan. En la Tabla XXIV se observa que es en los primeros cuatro días que se dieron las mayores tasas de crecimiento y que éstas después

decrecieron bruscamente. La máxima tasa de crecimiento que fue de 1.6 div./día, está por debajo de la de 2.5 obtenida por otros autores, como Guillard y Rhyter (1962), Paasche (1973) y Voltolina *et al.* (1991). Flaak y Epifanio (1978) cultivaron esta cepa en un medio y a condiciones similares a este trabajo, obteniendo tiempos de generación de 0.46 días para el segundo día y 1.4 para el cuarto día, los cuales se encuentran cerca de los aquí reportados.

Los pesos secos total y libre de cenizas tendieron a permanecer constantes durante la fase exponencial y hasta el inicio de la fase estacionaria (Tabla XXV), comportándose de igual manera el porcentaje de cenizas. Esta falta de variación indica que las células mantuvieron un tamaño similar durante toda su curva de crecimiento y que contaron con la concentración de sílice necesaria para su división y la construcción de nuevos frústulos, ya que una limitación en este nutriente decrece la tasa de crecimiento de la población y promueve un cultivo con células menos silicificadas (Paasche, 1973). Flaak y Epifanio (1978) no encontraron diferencias en peso entre las fases de crecimiento del cultivo de esta cepa.

Sin embargo, una disminución constante en la concentración de proteínas de la célula (Fig. 14) indica que existen variaciones bioquímicas dentro de estas

últimas. Estas, probablemente fueron debidas al agotamiento del nitrógeno o a la limitación de otros nutrientes (fósforo) o a factores ambientales (luz), que favorecen el envejecimiento del cultivo.

Flaak y Epifanio (1978), encontraron que las proteínas constituyen un 44% y 22% del peso seco, en la fase de crecimiento exponencial y estacionaria respectivamente. Epifanio *et al* (1981) reportaron un 40% de proteínas en la fase exponencial, lo que coincide con los valores aquí mencionados. Whyte (1987) reportó sólo un 21% en la misma fase, pero utilizando medio f/2, lo cual pudo haber originado fenómenos de limitación tempranos afectando así la producción de proteínas.

La variación en las proteínas afecta el valor nutricional de las microalgas producidas, ya que la razón C/N aumenta, lo cual es indicativo de células viejas (Gallager y Mann, 1981).

Tomando en cuenta los valores obtenidos con el cultivo semicontinuo y con la curva de crecimiento, se puede considerar que el acuicultor podrá estar seguro de obtener un peso orgánico constante y que lo único que deberá determinar serán sus necesidades en proteínas y biomasa. Las altas concentraciones de silicato que parece requerir esta cepa para su cultivo pueden ser una limitante en su utilización masiva, el alto gasto de este compuesto. A

pesar de ésto, su rápido crecimiento, su alto contenido protéico y su peso orgánico constante aconsejarían su utilización, por lo menos en dietas mixtas.

IV.7 Extracción de Proteínas

La diferencia en los resultados obtenidos para las condiciones óptimas de extracción de proteínas para cada microalga, soporta la idea de que las características propias de la pared celular de la especie tienen una influencia directa sobre la extracción, y por ende sobre la determinación del contenido protéico, que debe de ser tomada en cuenta cuando se trabaje con muestras de cultivos unialgales.

Las diferencias significativas entre los varios tratamientos a los que se sometió cada microalga en particular, demuestran que existen condiciones de extracción a las cuales se obtiene un máximo de proteínas y que se puede considerar como óptimas para esa especie. Las variaciones entre diferentes condiciones pueden llegar a ser hasta más del 50%.

Isochrysis sp., presenta una pared celular compuesta por escamas de material orgánico (pectina principalmente), de tal modo que las condiciones de extracción tienden a ser menos severas como lo refleja el hecho de que se requieran bajas temperaturas (60 y 80°C), tiempos cortos (10 y 20 minutos) y normalidades bajas y medias (0.1 y 0.5) para realizar la extracción (Tabla XI y XII). Para el caso de las diatomeas, como es el caso de Skeletonema menzeli y

Thalassiosira pseudonana, las cuales presentan un exoesqueleto de sílice, las condiciones de extracción son severas: se requiere de tiempos medios y largos (20 y 30 minutos), temperaturas altas (80 y 100°C) y normalidades bajas y medias (0.1 y 0.5) para una extracción óptima (Tablas XVI, XXVI y XXVII). Estos resultados, aunque difíciles de comparar, dada la cantidad de técnicas empleadas, concuerdan con aquellos obtenidos por Price (1961), Hedenskog et al. (1970), Rausch (1981) y López-Ellias (1990).

Las variaciones internas entre los diferentes tratamientos para cada microalga, y que de alguna manera no muestran una tendencia bien clara, pueden deberse a fallas en el manejo de las muestras antes del análisis.

IV.8 Control de crecimiento

El uso de datos de fluorescencia (unidades arbitrarias) como base para la determinación de parámetros poblacionales de las microalgas aquí tratadas, es justificado dada la alta correlación existente entre éstos y el número de células de la población correspondiente. Esta buena correlación existe cuando la densidad del cultivo no es muy alta o el cultivo se encuentra como máximo en el inicio de la fase estacionaria ya que en caso contrario diferentes factores, como por ejemplo la variación en el estímulo de la clorofila por la luz dada por el efecto de sombreado) y biológicos (sustancias excretadas en el medio) (Loftus et al., 1975) pueden hacer que se obtengan lecturas que sobre o subestimen el valor real, como parece ser el caso de Isochrysis sp. en el último día de cultivo estático. Por lo tanto, esta técnica debe de ser usada con precaución y con el apoyo de otro tipo de monitoreo.

V CONCLUSIONES

Isochrysis sp. y Thalassiosira pseudonana pueden ser cultivadas a nivel semimasivo (10 L) en un sistema semicontinuo, con diluciones óptimas de 40% y 30-50% (alternada) para la primera, y de 50% para la segunda.

Skeletonema menzelii es una especie cuyo potencial para la producción de biomasa se podrá determinar después de que se establezca una técnica de cultivo apropiada.

En cultivo estático, Isochrysis sp. presenta una variación porcentual en su contenido protéico y un aumento en su peso seco, peso orgánico y porcentaje de cenizas, conforme avanza el tiempo.

Thalassiosira pseudonana presenta altas tasas de crecimiento. En cultivo estático su contenido protéico decrece conforme el tiempo avanza, mientras que su peso seco, peso orgánico y su porcentaje de cenizas se mantienen constantes.

Skeletonema menzelii presenta una curva de crecimiento similar a Thalassiosira pseudonana, durante la cual su peso

seco y peso orgánico disminuyen grandemente y en forma rápida, el porcentaje de cenizas se mantiene constante y su contenido protéico aumenta con el tiempo de cultivo.

Refiriendose a producción, Isochrysis sp. presenta la opción de ser cultivada a diferentes razones de dilución, dentro de la fase de crecimiento lento, obteniendo células con características similares.

La utilización de Thalassiosira pseudonana es una buena opción cuando se quiera contar con un cultivo de crecimiento rápido y con densidades celulares medias, que en cualquier momento puede satisfacer las altas necesidades de el acuicultor.

VI RECOMENDACIONES

Para el cultivo de Isochrysis sp. y Thalassiosira pseudonana se recomienda que las condiciones de cultivo descritas como óptimas en este trabajo se tomen sólo como un antecedente para establecer las técnicas adecuadas al sistema que se esté diseñando. Esto se debe a que las condiciones de cultivo nunca serán iguales, lo cual puede causar reacciones diferentes de la microalga.

El acuicultor que cultive Isochrysis sp. en un sistema semicontinuo y la utilice como fuente de proteína, tendrá la posibilidad de variar la razón de dilución en base a la biomasa requerida, dada la poca variación en contenido protéico de la célula. Esto podría permitir un ahorro en costos de producción, dada la menor necesidad de áreas y volúmenes dedicados al cultivo.

Thalassiosira pseudonana es una microalga de crecimiento rápido, cuyo cultivo es relativamente caro dada la alta concentración de silicatos que necesita, pero que puede servir, en algún momento, como una alternativa de alimento o ser utilizada en dietas mixtas por el acuicultor.

Los medios de cultivo, en los que se quiera crecer Skeletonema menzeli deberán de contar con altas concentraciones de silicatos y tal vez una menor proporción

del medio f de los otros nutrientes. Para establecer una técnica adecuada de cultivo tendrá que tomarse en consideración la necesidad de emplear tasas de dilución muy elevadas.

Cuando se realice un análisis del contenido protéico de cualquier microalga cultivada, se recomienda que primeramente se determinen las condiciones óptimas de extracción y que se establezcan técnicas estándar para cada especie. Datos obtenidos con técnicas diferentes tendrían que ser comparados con cautela, sobre todo cuando no se cuente con información sobre la técnica de extracción.

VII LITERATURA CITADA

- Ben-Amotz, A., R. Fishler y A. Schneller. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.* 95:31-36.
- Berland, B.R., D.J. Bonin, R.A. Daumas, P.L. Laborde y S.Y. Maestrini. 1970. Variations du component physiologique de l'algae Monallantus salina (Xantophyceae) en culture. *Mar. Biol.* 7:82-92.
- Blazka, P. 1966. Bestimmung der Proteine im Material aus Binnengewassern. *Limnologica* 4:387-396.
- Canzonier, W.J. y R. Brunetti. 1975. Low-cost continuous algal culture system. En: 10th. European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium. 1:27-31.
- Clayton, J.R., Q. Dortch, S.S. Thoresen y S.I. Ahmed. 1988. Evaluation of methods for the separation and analysis of proteins and free amino acids in phytoplankton samples. *J. Plank. Res.* 3:341-358.
- Darley, W.M. 1987. *Biologia de las algas. Enfoque fisiológico.* Ed. Limusa. Mexico. 236 pp.

- De Pauw, N. y G. Persoone. 1988. Microalgae for aquaculture 197-221. En: Borowitzka M.A. y L.J. Borowitzka (Eds.) Micro-Algal Biotechnology, Cambridge University Press. Cambridge, New York. 477 pp.
- Dorsey, T.E., P. Macdonald y D.A. Roebbs. 1978. Measurements of phytoplankton-protein content with the heated Biuret--Folin assay. J. Phycol. 14:167-171.
- Dortch, Q., J. Clayton, J.S. Thoresen y S. Ahmed. 1984. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. Marine Biology. 81:237-250.
- Droop, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. En: 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend Belgium. 1:71-23.
- Dunstan, W.M y K.R. Tenore. 1972. Intensive outdoor culture of marine phytoplankton enriched with treated sewage effluent. Aquaculture, 1:181-192.
- Durand-Chastel, H. 1980. Production and use of Spirulina in Mexico. 51-64. En: Shelef G. y C.J. Soeder (Eds.). Algae Biomass. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press:51-64.

- Enright, C.T., G.F. Newirk, J.S. Craigie y J.D. Castell. 1986. Growth of juvenile Ostrea edulis L. fed Chaetoceros gracilis Scutt of varied chemical composition. J. exp. Mar. Biol. Ecol. 96:15-26.
- Epifanio, C., C. Valenti y C. Turk. 1981. A comparison of Phaeodactylum tricornutum as foods for the oyster, Crassostrea virginica. Aquaculture. 23:347-353.
- Ewart, J. y C. Epifanio. 1981. A tropical flagellate food for larval and juvenile oysters, Crassostrea virginica. Aquaculture. 22:297-300.
- Fabregas, J., C. Herrero, B. Cabezas y J. Abalde. 1986. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga Isochrysis galbana Parke at varying nutrient concentrations. Aquaculture, 53:101-113.
- Fernández-Reiriz, M, A. Perez-Camacho, M. Perreiro, J. Blanco, M. Planas, J. Campos y U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (Total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. Aquaculture 83:17-37.
- Flaak, A.R. y C. Epifanio. 1978. Dietary protein levels and growth of the oyster Crassostrea virginica. Mar. Biol. 45:157-163.

- Fogg, G.E. y B. Thake. 1987. Algal cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press, London. 257 p.
- Gallager, S. y R. Mann. 1981. The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankton Thalassiosira pseudonana (3H) on its food value to the bivalve Tapes japonica. Aquaculture. 26:95-105.
- Goldman, J., J. McCarthy y D. Peavey. 1979. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. Nature. 279:210-215.
- Goldman, J. y R. Mann. 1980. Temperature-Influenced variations in speciation and chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures. J. exp. mar. Biol. Ecol. 46:29-39.
- Goldman, J., Y. Azov, C. Riley y M. Dennett. 1982. The effect of pH in intensive microalgal cultures I.-Biomass regulation. J. exp. mar. Biol. Ecol. 57:1-13.
- González-Leonardo, M.I. 1991. Diseño y selección de medios alternativos para el cultivo de microalgas. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. México. 130 p.

- Guillard, R.L. 1983. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. 108-132. En: Berg C.J. (Ed). Culture of Marine Invertebrates.
- Guillard, R.L., E.J. Carpentier y B. Reimann. 1974. Skeletonema menzelii sp. nov., a new diatom from the Western Atlantic Ocean. *Phycologia*. 13:131-138.
- Guillard, R.L. y J.H. Rhyter. 1962. Studies on marine planctonic diatoms I.-Cyclotella nana Husted and Detonula confervacea (Cleve) Gran. *Can. J. Micro.* 8:229-239.
- Halmann, H. 1972. Chemical ecology. Evidence for phosphorous as the only factor limiting algal growth in Lake Kinneret. *Israel Journal of Chemistry*. 10:841-855.
- Helm, M. y Z. Laing. 1987. Preliminary observations on the nutritional value of "Tahiti" Isochrysis to bivalve larvae. *Aquaculture*. 62:281-288.
- Hedenskog, C., H. Mogrea y L. Enebo. 1970. A method for obtaining protein concentrates from microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 12:947-959.
- Horstmann, U. 1985. The use of microalgae in aquaculture. *Arch. Hydrobiology*. 20:153-156.

- Krey, J., K. Banse y E. Hagmeier. 1957. Ober die biestimmung von Eiweilim Plankton mittels der Biuretreaktion. Kiel. Meeresforsh. 13:35-40.
- Ketchum, B.H. y A.C. Redfield. 1938. A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole. 75:165-169.
- Kiorbe, T., K. Andersen y H. Dam. 1990. Coagulation efficiency and aggregate formation in marine phytoplankton. Marine Biology. 107:235-245.
- Langton, R.W. y G.U. Mckay. 1976. Growth of Crassostrea gigas (Thunberg) spat under different feeding regime in a hatchery. Aquaculture. 7:225-233.
- Loftus, M. y H. Seliger. 1975. Some limitations of the "In vivo" fluorescence technique. Chesapeake Science. 16(2):79-92.
- López-Ellias, J.A. 1990. Cultivos semi continuos 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 p.

- Lowry, O.; N.J. Rosebrough, A.L. Farr y H.I. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Malara, G. y R. Charra. 1972. Dosage des proteines particulaires selon la méthode de Lowry. Notes de Travail, Univ. de Paris. Station Zoologique-Villefranche-sur-mer.
- Mayzaud, P. y J.L.M Martin. 1975. Some aspects of the biochemical and mineral composition of marine plankton. J. exp. mar. Biol. Ecol. 17:297-310.
- Monod, J. 1942. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Hermann et Cie, Paris. 210 p.
- Myklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine plankton diatoms. J. exp. mar. Biol. Ecol. 15:261-274.
- Oswald, W.J. 1988. The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. 255-281. En: Lembi, C.A. y J.R. Wooland (Eds.) Algae and Human Affairs. Cambridge University Press. Cambridge. 590 p.
- Paasche, E. 1973. Silicon and the ecology of marine plankton diatoms I. Thalassiosira pseudonana grown on a chemostat with silicate as limiting nutrient. Marine Biology. 19:117-126.

- Pares-Sierra G. y G. Leyva. 1982. Cultivo semicontinuo de las microalgas Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica Kylin (Butch) para uso como alimento de larvas y adultos de Mytilus californianus. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. México. 57 p.
- Parsons, T.R., K. Stephens y J.D.H. Strickland. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada. 18:1001-1006.
- Price, C.A. 1965. A membrane method for determination of total protein in dilute algal suspensions. Anal. Biochem. 12:213-218.
- Rausch, T. 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. Hydrobiologia. 78:237-251.
- Richmond, A. 1986. Microalgaculture. CRC Critical Reviews in Biotechnology. 4:369-438.
- Roadhouse, P., C. Roden y M.E. Somerville-Jacklin. 1983. Nutritional value of micro-algal mass cultures to the oyster Ostrea edulis. Aquaculture. 32:11-18.

- Shaw, W. 1977. The use of phytoplankton for aquaculture needs a status report. NOAA Tech. Rep.- NMFS Circ. Mar. 1981-82, 442:19-24.
- Soeder, C.J. 1986. An historical outline of applied algology. En: Richmond, A. (Ed.). CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc.. Boca Raton, Florida. 528 p.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J.R. (Ed.). Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press. Cambridge. 448 p.
- Tan Tiu, A., D. Vaughan, T. Chiles y K. Bird. 1989. Food value of eurytopic microalgae to bivalve larvae of Cystopleura costata (Linnaeus, 1758), Crassostrea virginica (Gmelin, 1791) y Mercenaria mercenaria (Linnaeus, 1758). J. of Shellfish Res. 8:399-405.
- Taub, F. 1980. Use of continuous culture techniques to control nutritional quality. 707-721. En: Shelef, G. y J. Soeder (Eds.). Algal Biomass. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Ukeles, R. 1980. American experience in the mass culture of microalgae for feeding larvae of the american

- oyster, Crassostrea virginica. En: Shelef G. y J. Soeder (Eds.). Algal Biomass. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. Aquacult. Eng. 4:175-190.
- Volkman, J., S. Jeffrey, D. Nichols, G. Rogers y C. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J. exp. mar. Biol. Ecol. 128:219-240.
- Voltolina, D., L.F. Buckle-Ramírez y E. Morales-Guerrero. 1989. Manual de metodología y alternativas para el cultivo de microalgas. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. Informe especial OC-89-01. 64 p.
- Voltolina, D., M.L. Trujillo-Valle y M.I. González-Leonardo. 1991. La colección de cepas de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México, Comunicaciones Académicas CTACT-91-01, 49B.

- Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. 117-145. En: Richmond A. (Ed.). CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Boca Raton, Florida. 528 p.
- Webb, K. y E. Chu. 1982. Phytoplankton as food for bivalve larvae. 272-291. En: Pruder G.D., C.J. Langdon y D.E. Conklin (Eds.). Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to shellfish nutrition. Louisiana State University Press.
- Whyte, J. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture. Aquaculture. 60:231-241.
- Wikfors, G., J. Twarog Jr. y R. Ukeles. 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, Crassostrea virginica. Nat. Mar. Fish. Ser. Northeast Fish. Center. Biol. Bull. 167:251-263.
- Zeitzschel, B. 1978. Why study phytoplankton? En: Sournia, A. (Ed.). Phytoplankton Manual. UNESCO. 337 p.