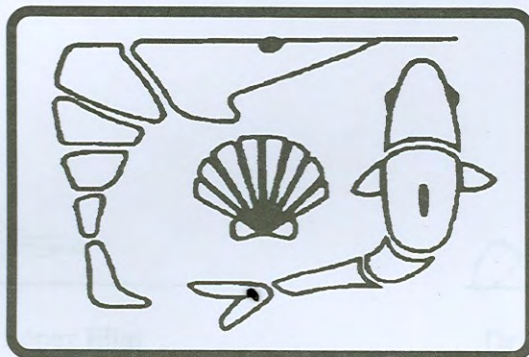




EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN ACUACULTURA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA



**CONSUMO DE NITRATOS DE *Tetraselmis chuii* EN DIFERENTES
MEDIOS DE CULTIVO A TRES TEMPERATURAS**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS, con especialidad en Cultivo de Crustáceos

Presenta:

KARINA ROBLES FIGUEROA

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

	PÁGINA
APROBACIÓN.....	<i>i</i>
DEDICATORIA.....	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS.....	<i>iii</i>
CONTENIDO	<i>iv</i>
RESUMEN.....	<i>vi</i>
ABSTRACT.....	<i>vii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	<i>viii</i>
INDICE DE TABLAS.....	<i>x</i>
I.- INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	1
II.- OBJETIVOS.....	8
II.1.- Objetivo General	8
II.2.- Objetivos Particulares.....	8
III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
III.1.- Área de Estudio	9
III.2.- Especie Utilizada	9
III.3.- Diseño del Experimento	9
III.4.- Determinación de la Biomasa.....	10
III.5.- Determinación de pH, Iluminación y Temperatura.....	10
III.6.- Determinación de Nitratos.....	11
III.7.- Análisis Estadístico.....	11
IV.-RESULTADOS.....	12
IV.1.- Parámetros Físico-Químicos.....	12
IV.2.- Crecimiento.....	15
IV.2.1.- Medios F's.....	15
IV.2.2.- Crecimiento de Tetraselmis Chuii en razones N:P 15 y 30.....	21
IV.3.- Tasas de Crecimiento en Medios F's.....	28

IV.4.-Tasas de Crecimiento en Razones N:P 15 y 30.....	30
IV.5.- Determinación de Nitratos.....	32
1V.5.1.- Medios F's.....	32
IV.5.2.- Razones N:P 15 y 30.....	35
V.- DISCUSIONES	40
V.1.- Crecimiento celular y tasas de crecimiento de los medios F's y razones N:P.....	40
V.2.- Absorción de Nitratos en los medios F's y razones N:P.....	42
VI.- CONCLUSIONES.....	44
VII.- RECOMENDACIONES.....	45
VIII.- BIBLIOGRFÍA.....	46
IX.- ANEXOS.....	53

RESUMEN

El establecimiento de medios de cultivo del fitoplancton es fundamental en los sistemas de producción masiva al exterior por lo que en esta investigación se analizó el efecto de la temperatura y medios de cultivo sobre la absorción de nitratos y el crecimiento de la microalga *Tetraselmis chuii*. Se utilizó un diseño experimental simple con un arreglo al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Se experimentó con tres temperaturas; 25, 30 y 35°C y con ocho medios de cultivo: F/2, F, 2F y 4F y a cuatro de estos se les modificó la razones N:P a 15:1(1), 15:1(2), 30:1(1) y 30:1(2). Las microalgas se dejaron crecer por 4 días bajo condiciones constantes de luz y temperatura y se midieron la concentración celular y la absorción de nitratos cada 12 horas. En general se encontró que la densidad celular varió de 8.04×10^5 a 1.73×10^6 cél./mL al final del cultivo, obteniéndose las concentraciones celular mas elevadas en los medios de cultivo donde se manipuló la razón N:P a 30:1 (1.48 a 1.73×10^6 cél./mL). Los resultados mostraron que la cantidad de nitratos en el medio no garantiza la obtención de densidades celulares elevadas como fue el medio 4F (8.37×10^5 - 1.03×10^6 cél./mL). A la temperatura de 25°C se obtuvieron las concentraciones celulares mayores mientras que a 35°C se obtuvieron las menores. En cuanto al consumo de nitratos en general se presentó un consumo acelerado las primeras 24 horas para después continuar sin variaciones significativas hasta el final del cultivo, también se encontró que a 30°C fue donde se presentaron los mayores consumos en la mayoría de los medios y temperaturas. En conclusión se observaron las mayores densidades en los medios con razón N:P de 30:1 a la temperatura de 25°C.

ABSTRACT

An experimental study was carried out to evaluate the effect of temperature on nitrate uptake and growth on the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. A single factor completely randomized experimental design with four replicas per treatment were used. Three temperatures were tested: 25, 30 and 35°C and 4 culture mediums: F/2, F, 2F and 4F and 4 N:P ratios: 15:1(1), 15:1(2), 30:1(1) and 30:1(2). Microalgae grew out for 4 days under constant light and temperature conditions, the cell concentration and nitrate uptake were measured every 12 hours. In general, it was found that at the end of the cultures the cellular density varied from 8.04×10^5 to 1.73×10^6 cel./mL. The results gotten with the culture medium 4F (8.37×10^5 - 1.03×10^6 cel./mL) showed that high concentrations of nitrates in the culture medium did not mean high biomass, but the ratio N:P does. The microalgae at 25°C showed the best growths and at 35°C we found the lowest. In general, nitrate uptake had an active process the first 24 hours and after it, it continued without great variations until the end of the experiment, also it was observed for the majority of the mediums and ratios N:P that at 30°C the experiment charted bigger nitrate uptakes. In conclusion, the best growths were with the combination of ratio N:P 30:1 at 25°C.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Gráfica de pH de los medios F's a 25°C.....	13
2	Gráfica de pH de los medios F's a 30°C.....	13
3	Gráfica de pH de los medios F's a 35°C.....	13
4	Gráfica de pH de las razones N:P a 25°C.....	14
5	Gráfica de pH de las razones N:P a 30°C.....	14
6	Gráfica de pH de las razones N:P a 35°C.....	14
7	Curvas de crecimiento de <i>T. chuii</i> a 25, 30 y 35°C en Medio F/2	15
8	Curvas de crecimiento de <i>T. chuii</i> a 25, 30 y 35°C en Medio F...	16
9	Curvas de crecimiento de <i>T. chuii</i> a 25, 30 y 35°C en Medio 2F.	16
10	Curvas de crecimiento de <i>T. chuii</i> a 25, 30 y 35°C en Medio 4F.	17
11	Gráfica de interacción de dos vías a las 48 horas.....	18
12	Gráfica de interacción dos vías a las 72 horas.....	19
13	Gráfica de interacción dos vías a las 96 horas.....	20
14	Curvas de crecimiento de <i>T. chuii</i> a 25, 30 y 35°C en Medio 15:1(1).....	21
15	Curvas de crecimiento de <i>T. chuii</i> a 25, 30 y 35°C en Medio 15:1(2).....	22
16	Curvas de crecimiento de <i>T. chuii</i> a 25, 30 y 35°C en Medio 30:1(1).....	22
17	Curvas de crecimiento de <i>T. chuii</i> a 25, 30 y 35°C en Medio 30:1(2).....	23
18	Gráfica de interacción de dos vías a las 48 horas.....	25
19	Gráfica de interacción de dos vías a las 72 horas.....	26
20	Gráfica de interacción de dos vías a las 96 horas.....	27
21	Tasas de crecimiento acumulada, promedio y máxima de los medios F/2, F, 2F y 4F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	29
22	Tasas de crecimiento a las 24, 48, 72 y 96 horas de los medios F/2, F, 2F y 4F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	29

23	Tasas de crecimiento acumulada, promedio y máxima de las razones 15:1(1), 15:1(2), 30:1(1) y 30:1(2) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	31
24	Tasas de crecimiento a las 24, 48, 72 y 96 horas de las razones 15:1(1), 15:1(2), 30:1(1) y 30:1(2) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	31
25	Determinación de Nitratos del medio F/2 a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	32
26	Determinación de Nitratos del medio F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	33
27	Determinación de Nitratos del medio 2F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	34
28	Determinación de Nitratos del medio 4F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	35
29	Determinación de Nitratos de la razón 15:1(1) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	36
30	Determinación de Nitratos de la razón 15:1(2) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	37
31	Determinación de Nitratos de la razón 30:1(1) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	38
32	Determinación de Nitratos de la razón 30:1(2) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.....	39

INDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
I	Microalgas de mayor uso en la acuicultura.....	3
II	Proporciones de Nitrato y Fosfato para cada uno de los medios de cultivo.....	10
III	Valores medios y desviaciones estándar de pH en cada uno de los Tratamientos.....	12
IV	Relación Temperatura-Medios a las 48 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas a un $\alpha = 0.05$	18
V	Relación Temperatura-Medios a las 72 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas a un $\alpha = 0.05$	19
VI	Relación Temperatura-Medios a las 96 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas a un $\alpha = 0.05$	20
VII	Relación Temperatura-Razones a las 48 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas a un $\alpha = 0.05$	24
VIII	Relación Temperatura-Razones a las 72 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas a un $\alpha = 0.05$	25
IX	Relación Temperatura-Razones a las 96 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas a un $\alpha = 0.05$	26

I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El término acuicultura engloba todas las actividades que tienen por objeto la producción, desarrollo y comercialización de organismos acuáticos, animales o vegetales, de aguas dulces, salobres o saladas. Esto implica el control de las diferentes etapas, desde huevo hasta la cosecha, proporcionando a los organismos los medios adecuados para su crecimiento y engorda. Algas, moluscos, crustáceos y peces son los grandes grupos objetivo de la acuicultura. Ésta, se puede dividir en acuicultura marina y acuicultura continental (Márquez y col., 1982).

La acuicultura se practica desde hace siglos en algunas partes del mundo (Bardach y col., 1972); por ejemplo, hay registros que datan desde el siglo V AC. de que los chinos han “cultivado” peces en estanques construidos a propósito o en los arrozales inundados. También se sabe que los romanos cultivaban ostras desde muchos siglos atrás. Este tipo de cultivo es la primera forma conocida de acuicultura y ha prevalecido de una manera u otra hasta nuestros días (Rodríguez y Maldonado, 1996; Batis y Kaelin, 2000). Actualmente la acuicultura se practica de alguna forma en todos los países del mundo, con excepción, posiblemente del continente Antártico (Wheaton, 1982). China, India, Japón, Filipinas e Indonesia son los principales países productores a nivel mundial (FAO, 2001). Ecuador, Brasil y México están dentro los principales productores de América Latina.

Sin embargo, no ha sido hasta las últimas décadas cuando la acuicultura se ha consolidado como una actividad económica de importancia (Martínez-Córdova, 1998). Esta actividad ha atraído la atención de diversos sectores, por el significado que puede tener para compensar el estancamiento en las capturas mundiales, ya que la actividad pesquera ha sobre explotado una variedad de recursos, ocasionando así problemas ecológicos y como consecuencia, una disminución en los volúmenes de pesca, incrementando así los costos de operación, captura y procesamiento (Cifuentes y col., 1990). Además se ha señalado a la acuicultura como una actividad que puede potenciar el desarrollo de comunidades de pescadores, y más recientemente se le ha estado considerando por las importantes inversiones que está atrayendo y por los efectos negativos que está causando sobre los ecosistemas marinos.

Debido a que uno de los más grandes problemas a los que se enfrenta la población mundial, es el abastecimiento adecuado de alimentos y particularmente los de calidad

nutritiva, la acuicultura puede constituir una opción importante para la nutrición en muchas partes del mundo, debido a su gran productividad en muchas situaciones así como por el hecho de que las cosechas acuáticas son principalmente cosechas de proteínas (Bardach y col., 1986). De hecho, la acuicultura es el sector de producción de alimentos de crecimiento más rápido en el mundo, con una tasa de crecimiento anual del 11% desde 1984 en adelante, comparado con el 3.1% de la producción de carne terrestre en granjas y el 0.8% de la producción de las capturas pesqueras (FAO, 2001).

Para 1998 (FAO, 2001) entre las especies más cultivadas estuvieron los peces, que contribuyeron con más de la mitad del total en peso de la producción de acuicultura (20 millones de tm o 50.8%), representando el 55% del valor total de producción, seguido de los moluscos (9.1 millones de tm o 23.2%), con el 16% del valor total de producción y las plantas acuáticas (8.5 millones de tm o 21.7%), teniendo el 10% del valor total de producción. Los crustáceos constituyeron solo el 4% de la producción en peso, pero representaron el 18% del valor total de producción, en especial el cultivo de camarones peneidos que es el que mayor éxito económico ha tenido (Jones, 1999).

Los cultivos comerciales de microalgas a gran escala comenzaron a principios de la década de los 60's en Japón con cultivos de *Chlorella* y en los 70's con el establecimiento de cultivo de *Spirulina* en el Lago de Texcoco, México. Después en 1986, se cultivó *Dunalliella salina* como fuente de beta carotenos, llegando a ser esta la tercera industria de cultivo de microalgas más grande en Australia. Después se establecieron otras plantas productoras en Israel y en Estados Unidos. La producción de cianobacterias comenzó en la India en esos mismos años. Más recientemente en Estados Unidos y la India se han establecido plantas productoras de *Haematococcus pluvialis* como fuente de astaxantinas. De esta manera en un periodo de 30 años, la industria de la biotecnología de las microalgas ha crecido y se ha diversificado significativamente (Borowitzka, 2004).

La importancia de los cultivos de microalgas en acuicultura, radica en que éstas son el principal alimento de algunas especies comerciales como el camarón, en sus primeras etapas de desarrollo larvario (de 4 a 6 días) (Bardach, y col., 1990). Las microalgas han sido usadas en la dieta de los camarones, ejerciendo una notable influencia en la supervivencia de las larvas debido a que contienen las cantidades adecuadas de sus requerimientos nutricios (Benemann, 1992). Además el cultivo de organismos filtroalimentadores marinos como almeja, callo de hacha y ostión, bajo condiciones

controladas, requieren como fuente principal de alimento grandes cantidades de organismos fitoplanctónicos durante toda su vida (Guillard y Ryther, 1975). Las microalgas también son esenciales en el cultivo de algunas especies de peces como la tilapia y la carpa plateada, así como en el cultivo de zooplancton, que sirve como alimento vivo para juveniles de numerosos crustáceos y peces tanto de agua dulce como marina.

Tabla I.- Microalgas de mayor uso en acuicultura.

Clase	Género	Organismos Alimentados
<i>Bacilliarophyceae</i>	<i>Skeletonema</i>	Peneidos, Moluscos
	<i>Thalassiosira</i>	Peneidos, Moluscos
	<i>Phaeodactylum</i>	Peneidos, Moluscos, <i>Artemia</i>
	<i>Chaetoceros</i>	Peneidos, Moluscos
	<i>Nitzschia</i>	<i>Artemia</i>
<i>Haptophyceae</i>	<i>Isochrysis</i>	Peneidos, moluscos, <i>Artemia</i>
<i>Chrysophyceae</i>	<i>Monochrysis</i>	Moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>
<i>Prasinophyceae</i>	<i>Tetraselmis</i>	Peneidos, Moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Dunaliella</i>	Moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>
	<i>Clamydomonas</i>	Moluscos
	<i>Chlorella</i>	Moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>
	<i>Scenedesmus</i>	<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>
	<i>Nannochloris</i>	Moluscos, <i>Brachionus</i> , Copépodos
	<i>Brachiomonas</i>	Moluscos
<i>Cyanophyceae</i>	<i>Spirulina</i>	Peneidos, Moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>

Fuente: Abalde y col. 1995.

Tanta es la importancia de las microalgas para la industria acuícola que casi el 90% de las 14.5 millones de toneladas métricas de alimento producido por acuicultura en 1993 fue cultivado, usando fitoplancton como fuente de alimento durante una o más etapas de su desarrollo (Duerr y col., 1998).

Para seleccionar una microalga como alimento para acuicultura, ésta tiene que

cubrir ciertos aspectos como: tamaño adecuado en función de la especie que se va a alimentar, características de la pared celular, ya que su composición, grosor y tamaño están relacionadas con su digestibilidad. Además, se prefieren las especies móviles puesto que las inmóviles suelen precipitar en el fondo de los tanques por lo que dejan de ser disponibles. También es de vital importancia la composición química de las microalgas, no solo su composición mayoritaria sino también por su perfil de aminoácidos y lípidos (Abalde y col., 1995).

Cultivar microalgas en laboratorio implica altos costos de producción, se ha calculado que hasta el 70% del costo total de la cría de larvas de camarón es debido a la producción y mantenimiento de microalgas; los elevados costos se deben a varios factores, algunos de ellos son los costos de los nutrientes requeridos para elaborar los medios de cultivo (generalmente grado reactivo), la gran cantidad de energía eléctrica necesaria a fin de mantener las condiciones adecuadas de luz y temperatura en los cultivos y además, los empleados que se necesitan en el área de producción (Fulks y Main, 1991). Algunas investigaciones han calculado que producir 1 Kg de microalga deshidratada genera gastos de al rededor de \$50 dólares (Duerr y col., 1998), debido a esto se ha propiciado un creciente interés en el manejo de las técnicas de cultivo a fin de minimizar dichos costos de producción (Benneman, 1992). Estas técnicas se dividen en dos categorías: cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio y cultivo en condiciones de intemperie para la producción de biomasa a gran escala en cultivos estáticos o semicontinuos (Heinen, 1980; DePawn y Leenheer, 1985; Martínez-Córdova, 1999).

Dependiendo de los requerimientos de las microalgas, se han desarrollado diversas técnicas de producción (Vonshak, 1988); en general se conocen tres tipos de cultivo:

Cultivo Estático: Este consiste en que a partir de un inóculo inicial se proporciona el medio de cultivo a las microalgas por primera y única ocasión, por lo que el sistema se fundamenta en la capacidad de crecimiento de la microalga a una determinada concentración de nutrimentos adicionados al medio y a la penetración de la luz en el interior del cultivo. Este sistema de cultivo soporta la multiplicación celular por un tiempo limitado, ya que se presentan cambios en la composición del medio y en la intensidad de luz del cultivo (Vonshak, 1988). El desarrollo del cultivo se realiza hasta la fase de crecimiento exponencial y se utiliza el volumen total del mismo y cuando se tiene la densidad deseada al tiempo establecido, se usa para alimentar directamente vertiéndose en

los estanques de cría. Generalmente, el uso de estos cultivos son para fines de bioensayos o bien para transferencia a volúmenes mayores (Torrentera y Tacon, 1989).

Cultivo Semicontinuo: Estos cultivos se llevan inicialmente hasta la fase de lento crecimiento, después se da una remoción regular de un volumen estándar de medio a ciertos intervalos de tiempo y el reemplazo de éste con medio nuevo es para obtener el volumen original. Regularmente se realiza una medición de la densidad celular a fin de estimar la razón y frecuencia de la dilución (Vonshak, 1998).

Cultivo Continuo: Es un sistema de flujo en el cual las células individuales están suspendidas en un volumen constante en un estado de equilibrio dinámico, establecido por una remoción de cultivo y adición de medio nutritivo por unidad de tiempo con tendencia al infinito (Kubitscheck, 1970). Lo anterior permite teóricamente el crecimiento exponencial del cultivo. Esto se logra cuando todos los factores que intervienen en el crecimiento están balanceados con aquellos que intervienen en su disminución, de tal forma que la biomasa se mantiene constante, practicando de manera continua pequeñas cosechas (Vonshak, 1998).

En la actualidad se cultivan las microalgas al exterior en cultivos masivos cuya producción es a gran escala en tanques u otros recipientes de volumen no controlado. Existen varias alternativas para la producción de microalgas en cultivo masivo, desde la utilización de tanques de plástico, madera, concreto hasta los estanques rústicos. Se pueden utilizar desde fertilizantes minerales de tipo agrícola hasta una gran variedad de excretas de ganado o aves como fuentes de nutrientes. En relación a la utilización de luz artificial o natural, ésta dependerá del tipo de infraestructura con que se cuente. El control de la temperatura será necesario en relación al tipo de microalga en cultivo y a la región climática en donde se establezca el mismo. Para muchas especies de diatomeas la temperatura óptima oscila entre los 15 y 20°C, pocas especies de esta familia crecen a más de 28°C. Las clorofíceas pueden soportar altas temperaturas; un ejemplo es el cultivo masivo a la intemperie de *Chlorella saccharophila*, cuyas temperaturas oscilan entre 12.5 a 30°C (Hirata y col., 1977; Torrentera, 1983). El crecimiento y la división celular son afectados por la intensidad de la luz y el fotoperíodo en relación también a la temperatura. Por ejemplo en diatomeas a 20°C y 1,000 lux se obtiene un crecimiento favorable (Torrentela y Tacon, 1989). El crecimiento de las microalgas en los laboratorios de la región de Bahía Kino es suficiente para alimentar a las larvas de camarón, a pesar de que

los cultivos masivos al exterior se crecen con temperaturas que oscilan entre 23 y 37°C (Aguirre-Rosas, 2001; Becerra-Dórame, 2005).

Independientemente del sistema de cultivo seleccionado pero aunado a las condiciones ambientales, uno de los factores que contribuyen al éxito en el cultivo de microalgas es el que se tenga un balance adecuado de los nutrientes o sales mayoritarias, que pueden ser limitantes dependiendo de la especie de microalga (Trujillo-Valle, Voltolina, 1994). En términos generales, los macronutrientes o factores limitantes del crecimiento son: carbono, nitrógeno, fósforo, silicio (diatomeas), magnesio, potasio y calcio, que se requieren en cantidades relativamente grandes, mientras que los llamados micronutrientes (hierro, manganeso, cobre, zinc, sodio, molibdeno, cloro y cobalto) se necesitan en menores cantidades (Stickney, 2000; Torrentela y Tacon, 1989).

Entre los macronutrientes que juegan un papel esencial en el crecimiento de las microalgas se encuentran el nitrógeno y el fósforo, que son necesarios en grandes cantidades pero están presentes en bajas concentraciones en el mar. Estos macro nutrientes son utilizados por el fitoplancton para fabricar sus proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y otras partes de la célula que el fitoplancton necesita para sobrevivir y reproducirse. Dado que el nitrógeno es el mayor compuesto de las proteínas, su deficiencia afecta la síntesis de éstas y puede favorecer la formación de compuestos almacenadores de energía como lo son carbohidratos y lípidos: Esta respuesta puede ser aprovechada cuando la producción de estos elementos es lo que se desea (Stickney, 2000).

Las microalgas necesitan nutrientes en proporciones muy precisas. Se sabe que por cada 106 átomos de carbono que se convierten en materia orgánica, se necesitan 16 átomos de nitrógeno y un átomo de fósforo; a esto se le conoce como Razón de Redfield (Baird y Middleton, 2004). Cuando no hay nutrientes limitantes, en general el fitoplancton tiene esta composición.

La mayoría de las microalgas no pueden utilizar el nitrógeno como gas (N₂) directamente, por lo que necesitan formas reactivas como el nitrato (NO₃⁻) o el amonio (NH₄⁺), siendo los nitratos la forma más utilizada en los laboratorios comerciales, debido a que el medio de cultivo que más emplean (F/2) es formulado con nitratos como la única fuente de nitrógeno (López-Elías y col., 2003). Dado que por lo general siempre hay dióxido de carbono suficiente, el fitoplancton continúa creciendo hasta que se agota el nitrógeno o el fósforo. En la mayoría de los casos es el nitrógeno el que se agota primero y

por eso se dice que el crecimiento está limitado por el nitrógeno (Spokes, 2003, García-Sánchez y col., 1993).

Para fines acuaculturales, se han desarrollado diferentes medios de cultivo a fin de satisfacer las necesidades nutricias de las microalgas. Estos van desde fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales, los cuales se usan principalmente para fines experimentales. Las principales fórmulas utilizadas incluyen: el Agua de Miguel, que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de End-Schreiber de 1934, hasta fórmulas específicas para familias de microalgas, como la fórmula del Laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas, Provasoli y col., 1975; Matthiesen & Thorner, 1966; McIachlan, 1973; Guillard F., 1973; Droop, 1975, 1979; Schoene, 1982, entre otros (Torrentela y Tacon, 1989).

La mayoría de las de microalgas empleadas en acuicultura son cultivadas en un medio completo como el F de Guillard y Ryther (1962), que presenta una razón N:P de 24:1, aunque se ha observado que las microalgas pueden crecer dentro de un intervalo de 5:1 a 30:1. En el océano, la razón Nitrógeno-Fósforo promedio es de 15:1. En estudios de laboratorio realizados en el DICTUS se ha encontrado que la especie *Tetraselmis chuii* crece mejor a una razón de N:P de 30:1 que con el medio F/2 (Dominguez y Guevara, 1994; Gonzáles, 2004), lo cual sugiere que en condiciones de laboratorio que las flageladas verdes como *Tetraselmis chuii* requieren una cantidad mayor de nitrógeno en el medio de cultivo.

Otro factor a considerar además de los nutrientes, es la temperatura a la cual crecen los cultivos de microalgas, ya que a temperaturas frías se retrasa el crecimiento y a temperaturas elevadas se acelera el proceso. En los cultivos al exterior el fitoplancton crece a temperaturas de alrededor de 35°C en verano y de 25°C en invierno, es por ello que para el presente estudio se seleccionó este rango de temperaturas.

Dado que el mayor reto en el cultivo de microalgas es reducir los costos de producción sin menoscabo de la eficiencia, esta investigación estuvo enfocada hacia la optimización en el aprovechamiento de los nutrientes de la microalga *Tetraselmis chuii*, en especial los nitratos, al evaluar 8 medios de cultivo con diferentes razones de Nitrógeno-Fósforo a tres temperaturas. Con ello se pretendió establecer el mejor medio de cultivo y la mejor temperatura para el crecimiento de esta microalga sin desperdiciar nutrientes cuyo costo es una de las limitantes del cultivo.

II.- OBJETIVOS

II.1.- Objetivo General

Estimar el crecimiento y absorción de nitratos de *Tetraselmis chuii* con diferentes medios de cultivo a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

II.2.- Objetivos Particulares

1. Evaluar el consumo de nitratos en un cultivo de *Tetraselmis chuii* por cuatro días en los diferentes medios de cultivo y a las tres temperaturas seleccionadas.
2. Evaluar el crecimiento y la tasa de crecimiento acumulada, promedio y máxima de *Tetraselmis chuii* en los diferentes medios y temperaturas de cultivo.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Área de Estudio

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Acuicultura del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

III.2.- Especie Utilizada

Para la realización de este experimento se utilizó la microalga marina *Tetraselmis chuii*. El género *Tetraselmis* es uno de los más ampliamente usados en acuicultura para alimentar herbívoros marinos debido a su habilidad de crecer en un amplio rango de condiciones físicas y químicas (Lourenco y col., 1997). Además esta microalga tiene el tamaño (10 -12 X 6 - 6.5 μ) y la calidad nutricia requerida para ser utilizada en el cultivo de camarones peneidos como alimento base en el último estadio de zoeas y como complemento en los estadios de mysis y postlarvas (Fábregas y col. 1985; Trujillo-Valle y Voltolina, 1994 y Martínez-Córdova, 1999).

Esta especie se encuentra en el cepario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) donde es mantenida en el medio F/2, a salinidad de 33 ppm en condiciones controladas de luz y temperatura.

III.3.- Diseño del Experimento

Se trabajó con cuatro medios de cultivo convencionales que fueron los medios F/2, F, 2F y 4F y otros cuatro diseñados para tener cuatro condiciones producto de dos razones nitrógeno-fósforo y dos concentraciones diferentes de nitrógeno. Estos medios fueron: 15:1(1), 15:1(2), 30:1(1) y 30:1(2). La composición de los medios se presenta en la Tabla II.

Los experimentos se iniciaron con una concentración de 100,000 cél/mL y tuvieron una duración de 4 días. Se utilizó un sistema estático.

La iluminación fue constante mantenida con lámparas de 40 watts, y la temperatura fue controlada a 25, 30 y 35 °C en una cámara climática para cada tratamiento.

Tabla II. Proporciones de Nitrato y Fosfato para cada uno de los medios de cultivo.

(gr)	2/F	F	2F	4F	15:1(1)	15:1(2)	30:1(1)	30:1(2)
Na₂NO₃	75	150	300	600	150	91.8	150	183.6
Na₂H₂PO₄.H₂O	5	10	20	40	16.22	10	8.05	10

*El resto de los nutrientes fueron igual para todos los medios y estuvieron basados en el medio F/2.

III.4.- Medición de la Biomasa

Los conteos celulares se hicieron dos veces al día, cada 12 horas durante 4 días. Para medir la biomasa celular se usó un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad. Este es recomendado para algas pequeñas de 2 a 30 micras. Consta de dos cámaras, cada una con una retícula de 9 cuadrados de 1 mm por lado, que a su vez están divididos en cuadros más pequeños. El volumen total de ambas cámaras es de 1.8 microlitros (López-Elías y col., 1995).

Previo al conteo, las muestras se fijaron con lugol. Se tomó un pequeño volumen de muestra, se introdujo por capilaridad en el hematocitómetro, y se contó en el microscopio compuesto.

Cuando la biomasa fue muy grande se hicieron diluciones para facilitar el conteo.

Para determinar el número de células se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{No. cél./mL} = (\text{No. de células totales contadas} / \text{No. cuadros contados}) \times 10,000.$$

Las observaciones al microscopio se hicieron con los objetivos de 10X y 20X normalmente y ocasionalmente se usó el objetivo de 40X para mayor exactitud (López-Elías y col., 1995).

III.5.- Determinación del pH, iluminación y temperatura

El pH se midió con un potenciómetro modelo Denver Instrument 215, el que fue previamente calibrado con los buffers de 7 y 10. La iluminación del cultivo se midió con un fotómetro en luxes y la temperatura con un termómetro de bulbo convencional de mercurio hasta 110°C. Estas mediciones se hicieron cada 24 horas.

III.6.- Determinación de Nitratos

Se tomaron muestras de los cultivos cada 12 horas y se almacenaron a 4°C. Los nitratos fueron determinados en el espectrofotómetro HACH DR4000 con el reactivo NitraVer 5 usando el método de reducción del cadmio descrito en Manual de Análisis de Agua HACH (2000).

III.7.- Análisis Estadístico

Para determinar si hubo diferencias en la velocidad de crecimiento con respecto a los diferentes medios de cultivo y si el crecimiento se vio afectado por las diferentes temperaturas, se llevó a cabo un análisis de pendientes además de un análisis de varianzas de una vía (Zar, 1984). Para determinar la interacción de los medios de cultivo y la temperatura con respecto a la concentración celular a las 48, 72 y 96 horas se llevaron a cabo análisis de varianzas de dos vías. Estos análisis se realizaron en el paquete Statistica (2000) y Sigma Stat.

Los datos iniciales para la obtención de las curvas de crecimiento fueron generados con estadística descriptiva como la media y la desviación estándar.

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Parámetros Físico-Químicos

La iluminación para los tratamientos a 25°C se mantuvo entre los 6.54 y 8.86 Klux, a 30°C entre 6.11 y 9.49 Klux y finalmente para la temperatura de 35°C se obtuvieron mediciones de 7.29 y 9.55 Klux.

En cuanto al pH, no se registraron amplias variaciones en los cultivos (entre 8.8 y 9.4). Los valores medios se pueden observar en la Tabla III. Se observó la tendencia de que a las 48 horas se presentó el pH más elevado en todos los tratamientos y a las tres temperaturas probadas (Figura 1, 2 y 3). Los valores de pH fueron en aumento de las 0 a las 48 horas en todos los tratamientos, manteniéndose después en valores al rededor de 9.5 (Fig. 1-6).

Tabla III. Valores medios y desviaciones estándar de pH en cada uno de los tratamientos.

	25°C	30°C	35°C
F/2	9.00±0.45	8.86±0.35	8.90±0.43
F	9.34±0.65	8.88±0.34	8.94±0.42
2F	9.06±0.61	8.74±0.42	8.88±0.53
4F	9.26±0.69	8.76±0.39	8.96±0.51
15:1(1)	9.40±0.64	9.00±0.40	9.08±0.43
15:1(2)	9.44±0.65	9.00±0.44	9.08±0.43
30:1(1)	8.92±0.55	9.00±0.43	9.04±0.44
30:1(2)	8.90±0.49	8.82±0.32	9.16±0.53

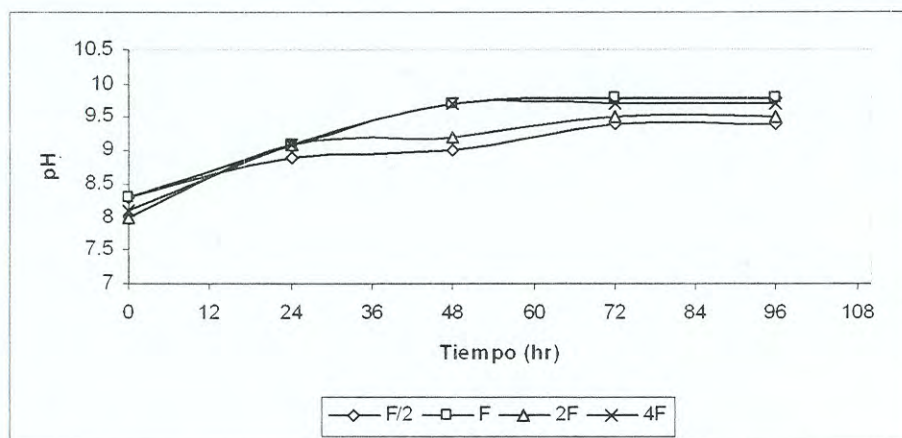


Figura 1. Comportamiento de pH en los medios F's a 25°C.

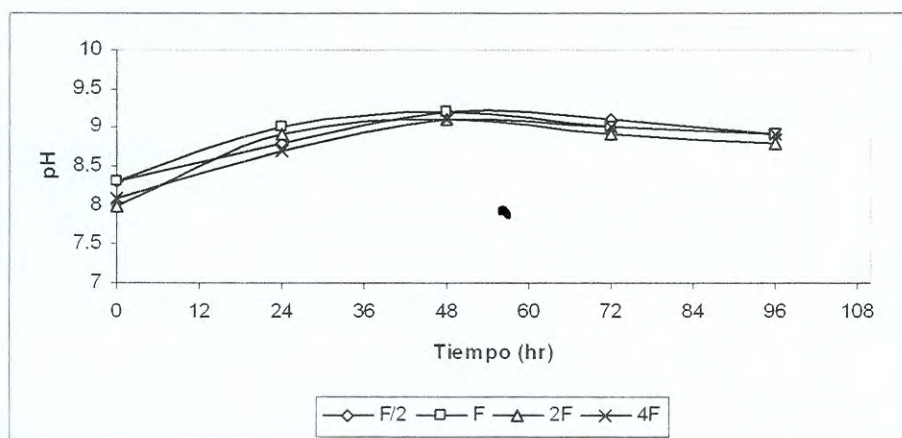


Figura 2. Comportamiento de pH en los medios F's a 30°C.

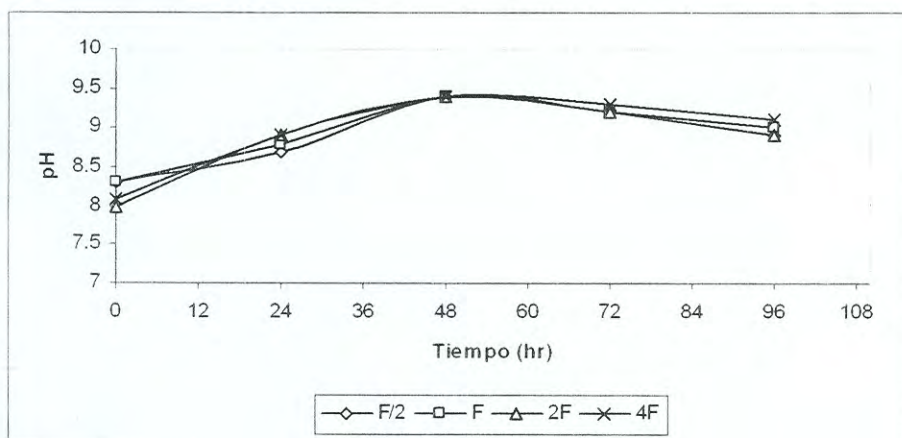


Figura 3. Comportamiento de pH en los medios F's a 35°C.

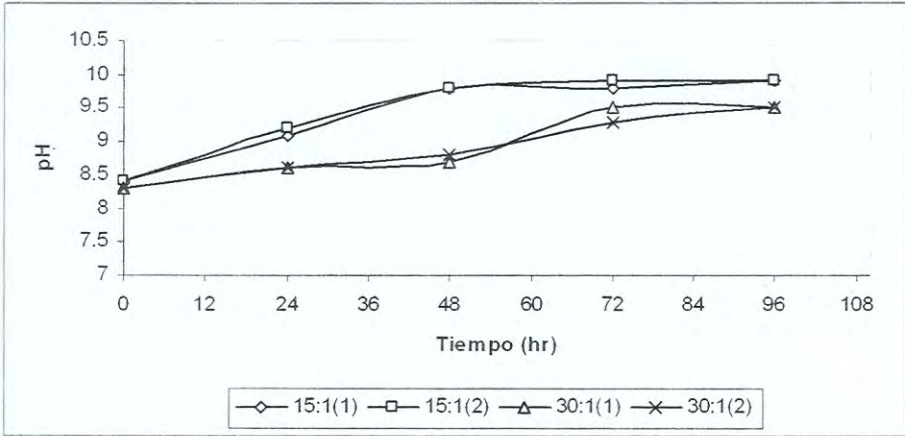


Figura 4. Comportamiento de pH en las diferentes razones N:P a 25°C.

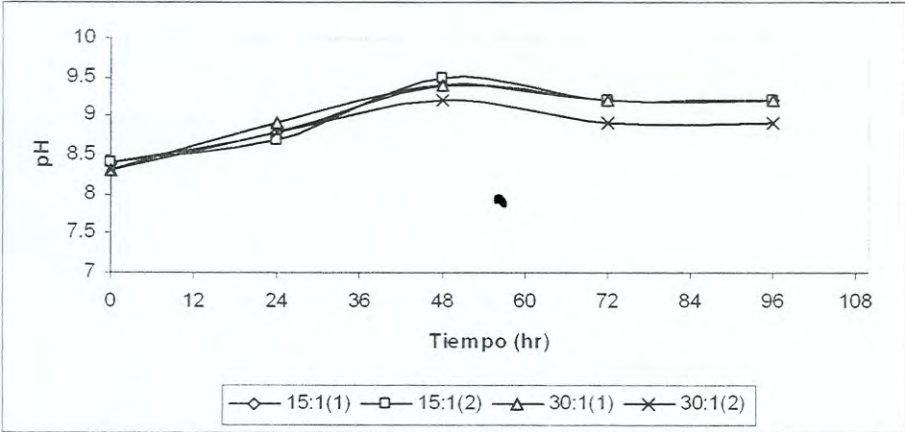


Figura 5. Comportamiento de pH en las diferentes razones N:P a 30°C.

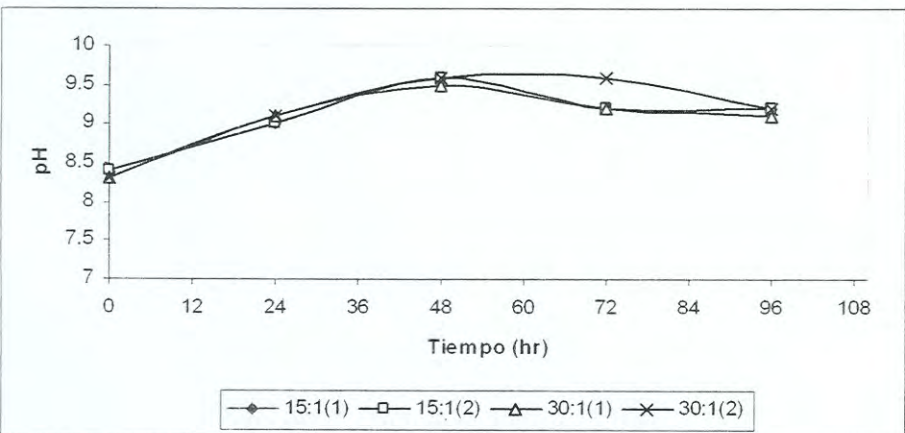


Figura 6. Comportamiento de pH en las diferentes razones N:P a 35°C.

IV.2.- Crecimiento

El crecimiento de *Tetraselmis chuii* se vio afectado tanto por el medio de cultivo, como por las temperaturas experimentadas.

IV.2.1.- Medios F's

La microalga en el medio F/2, alcanzó su máxima concentración celular al final del cultivo a la temperatura de 25°C llegando a un valor de 1.02×10^6 cél./mL. A 30°C el crecimiento fue ligeramente menor con una densidad de 9.96×10^5 cél./mL y el más bajo fue a la temperatura de 35°C con 8.04×10^5 cél./mL. Al analizar las pendientes de los tres ensayos no se encontraron diferencias significativas (Figura 7).

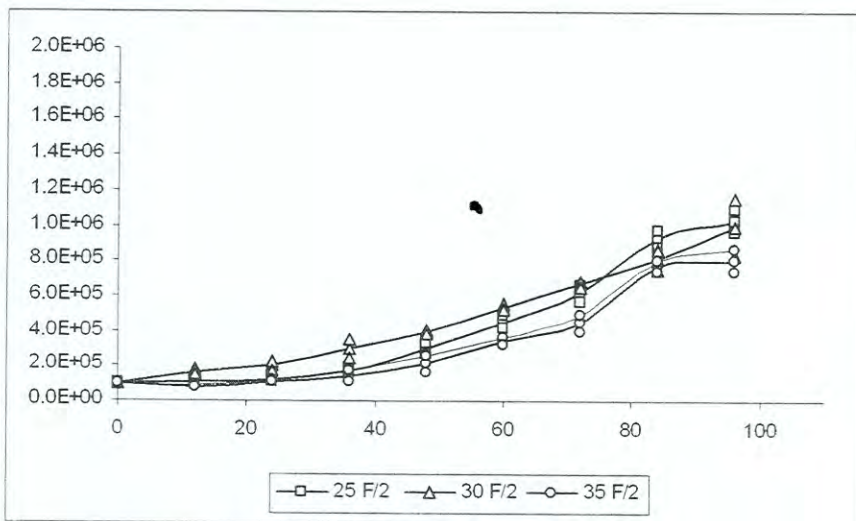


Figura 7. Curvas de crecimiento de *T. chuii* a 25, 30 y 35°C en Medio F/2.

En cuanto al medio F, los valores de de densidad celular máximos alcanzados al final fueron de 1.36×10^6 cél./mL a 25°C; 1.04×10^6 cél./mL a 30°C y 1.02×10^6 cél./mL a la temperatura de 35°C (Figura 8). En el análisis de pendientes no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

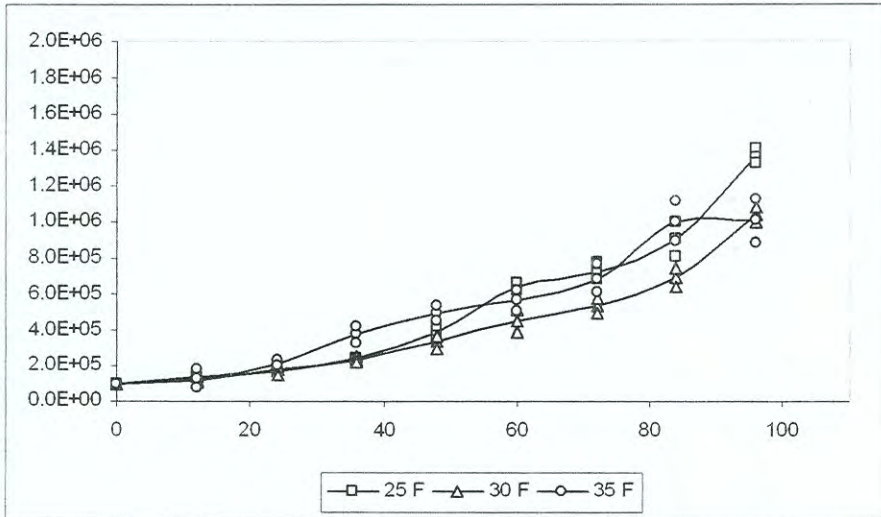


Figura 8. Curvas de crecimiento de *T. chuii* a 25, 30 y 35°C en Medio F.

En el medio 2F la microalga alcanzó densidades celulares más elevadas que en el resto de los medios F's, llegando hasta 1.44×10^6 cél./mL a 25°C, 1.14×10^6 cél./mL a 30°C y 1.33×10^6 cél./mL a la temperatura de 35°C. Las pendientes entre los tratamientos fueron iguales (Figura 9).

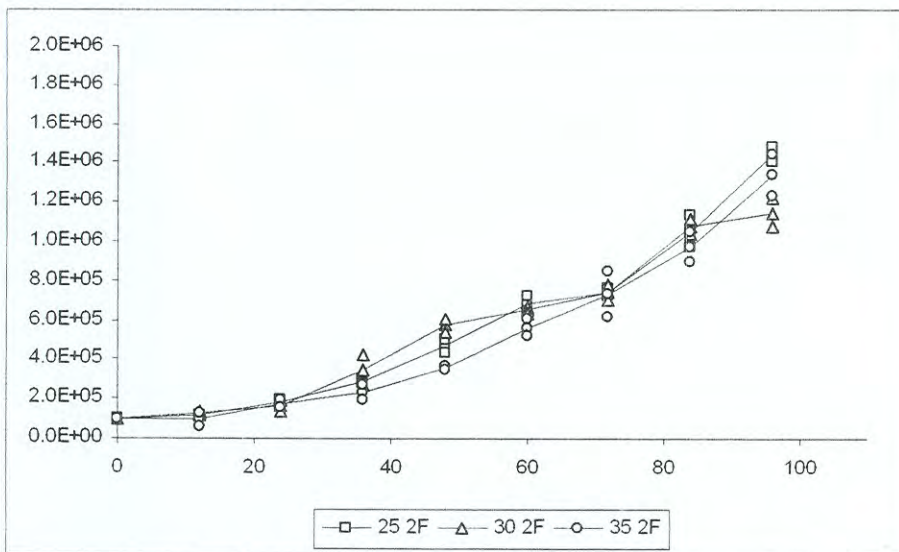


Figura 9. Curvas de crecimiento de *T. chuii* a 25, 30 y 35°C en Medio 2F.

En el medio 4F generalmente se obtuvieron las menores densidades celulares llegando hasta 1.03×10^6 cél./mL a 25°C , a 8.95 y 5.95×10^5 cél./mL a 30 y 35°C respectivamente. Al hacer el análisis de las pendientes no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 10).

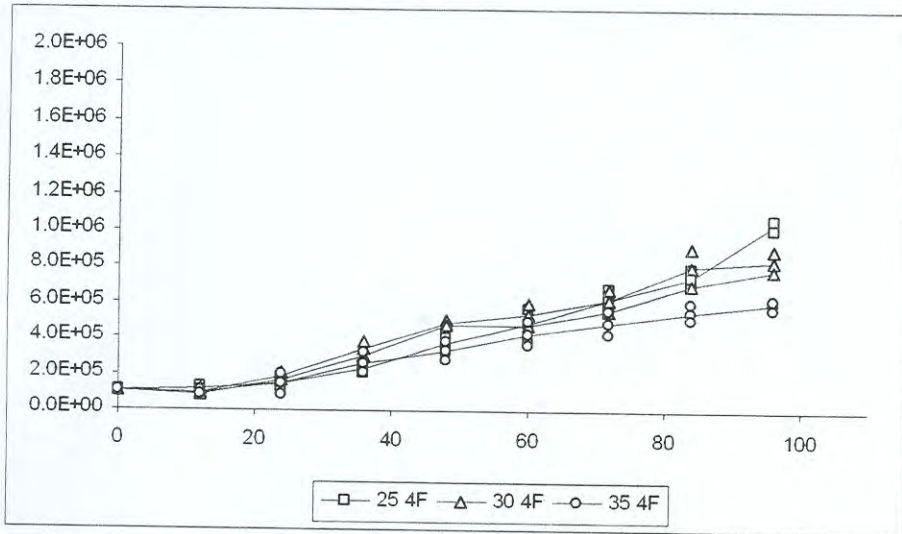


Figura 10. Curvas de crecimiento de *T. chuii* a 25 , 30 y 35°C en Medio 4F.

El ANDEVA de dos vías mostró que a las 48 horas todos los medios F's tuvieron crecimientos más bajos a la temperatura de 35°C , seguidos de los cultivos a 25°C y los mayores a los 30°C . En general con el medio 2F se obtuvieron las concentraciones celulares más elevadas, excepto a la temperatura de 35°C , donde los cultivos en el medio F fueron los más concentrados. Las densidades celulares más bajas se presentaron en los medios F/2 y 4F a las tres temperaturas (Figura 11, Tabla IV).

A las 72 horas el crecimiento a la temperatura de 35°C continuó teniendo los valores mínimos, sin embargo aquí se empezó a observar que las diferencias entre la temperatura de 25 y 30°C fueron menores, incluso el crecimiento en el medio F a 25°C superó al que la microalga tuvo a los 30°C , y en los medios F/2 y 4F se seguían manteniendo las concentraciones celulares más bajas (Figura 12, Tabla V).

A las 96 horas los cultivos alcanzan su máximo crecimiento a la temperatura de 25°C en todos los medios y a los 30°C se presentó un crecimiento ligeramente inferior que a los 35°C excepto en el medio F/2. La tendencia de crecimientos bajos en los medios a F/2 y 4F se mantuvo (Figura 13, Tabla VI).

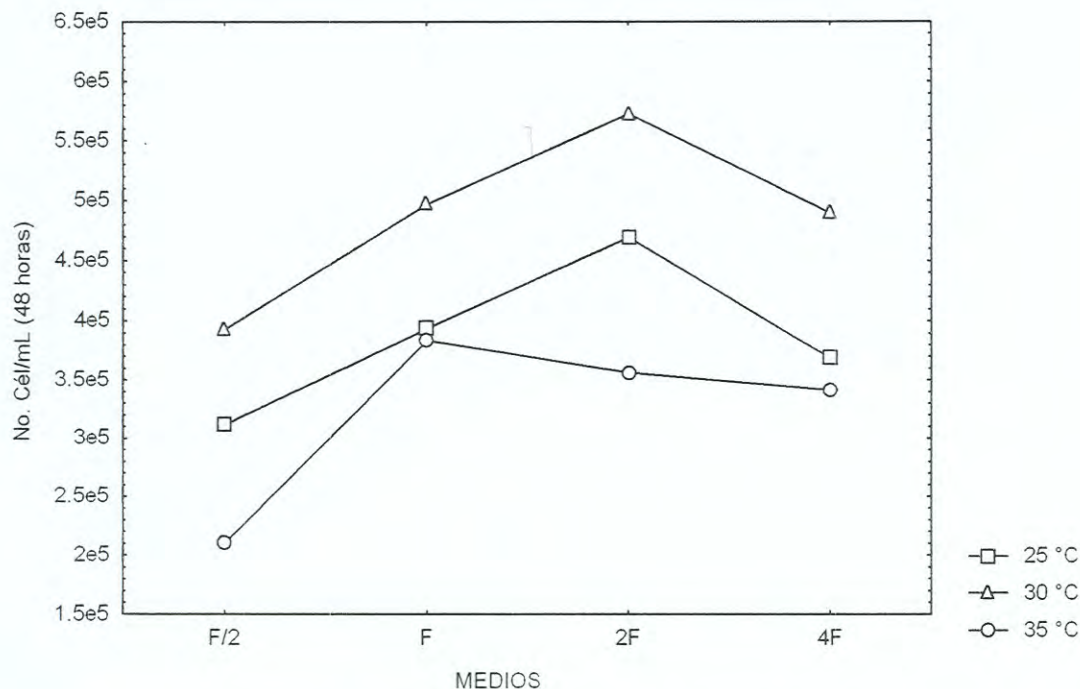


Figura 11. Interacción de dos vías a las 48 horas.

Tabla IV. Relación Temperatura-Medios a las 48 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$.

Temperatura-Medios	No. células promedio
25°C F/2	311,667±21,262 ^b
25°C F	393,750±23,936 ^c
25°C 2F	469,375±34,179 ^d
25°C 4F	368,750±34,065 ^{bc}
30°C F/2	392,813±10,327 ^c
30°C F	496,875±39,863 ^d
30°C 2F	572,500±35,414 ^e
30°C 4F	489,375±18,071 ^d
35°C F/2	209,688±45,602 ^a
35°C F	383,750±20,259 ^{bc}
35°C 2F	356,250±13,346 ^{bc}
35°C 4F	341,250±33,276 ^{bc}
35°C 4F	341,250±33,276 ^{bc}

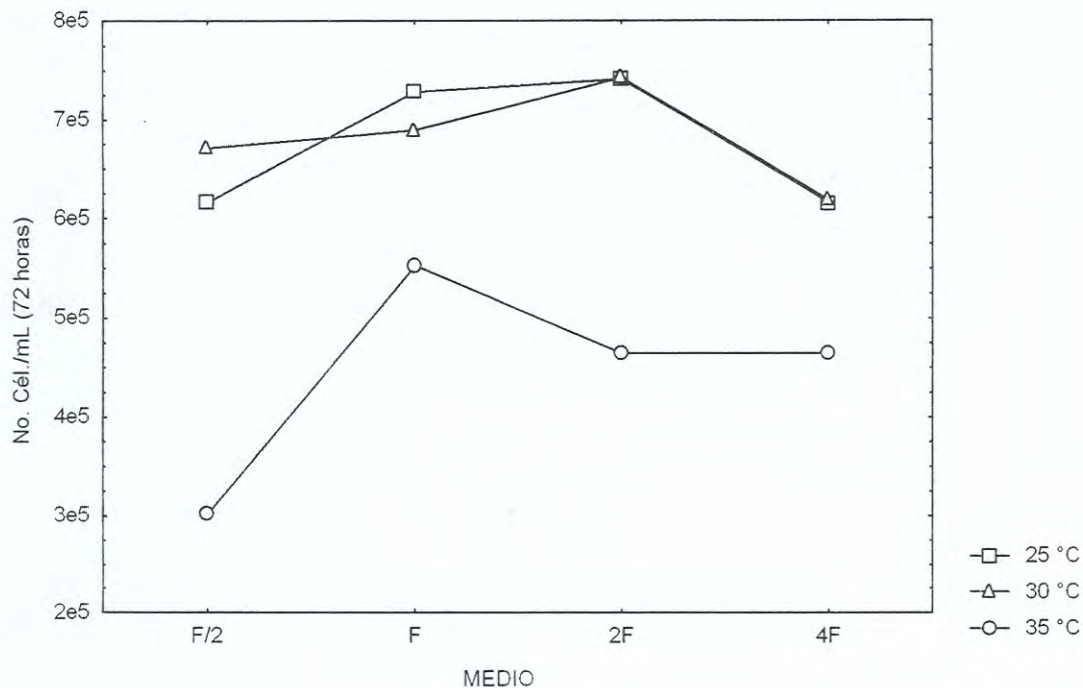


Figura 12. Interacción de dos vías a las 72 horas.

Tabla V. Relación Temperatura-Medios a las 72 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$.

Temperatura-Medios	No. células promedio
25°C F/2	615,938±49,785 ^{bcd}
25°C F	728,750±47,893 ^d
25°C 2F	741,563±19,455 ^d
25°C 4F	615,313±61,240 ^{bcd}
30°C F/2	670,938±14,839 ^{cd}
30°C F	689,375±75,894 ^{cd}
30°C 2F	743,125±38,480 ^d
30°C 4F	618,125±64,787 ^{bcd}
35°C F/2	301,563±46,316 ^a
35°C F	553,125±66,438 ^{bc}
35°C 2F	464,063±115,738 ^{ab}
35°C 4F	464,063±115,738 ^{ab}

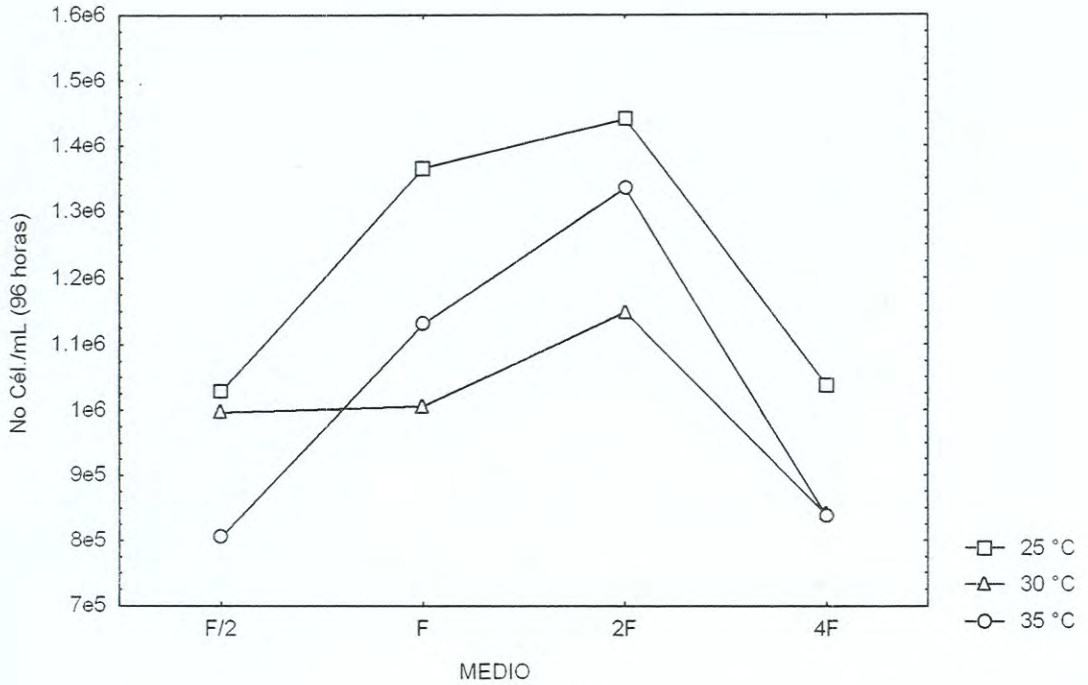


Figura 13. Interacción de dos vías a las 96 horas.

Tabla VI. Relación Temperatura-Medios a las 96 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$.

Temperatura-Medios	Promedio
25°C F/2	1,028,125±60,703 ^{bc}
25°C F	1,365,625±43,750 ^e
25°C 2F	1,440,625±38,696 ^e
25°C 4F	1,037,500±25,000 ^c
30°C F/2	996,563±158,691 ^{ab}
30°C F	1,005,625±117,710 ^{bc}
30°C 2F	1,148,438±75,065 ^{cd}
30°C 4F	839,063±55,989 ^{ab}
35°C F/2	804,688±63,199 ^a
35°C F	1,131,250±22,244 ^c
35°C 2F	1,287,500±107,831 ^{de}
35°C 4F	837,500±38,528 ^{ab}

IV.2.2.- Crecimiento de *Tetraselmis chuii* en razones N:P 15 y 30

El crecimiento de *T. chuii* en la razón de 15:1(1) alcanzó sus niveles máximos al cuarto día de cultivo a la temperatura de 25°C llegando hasta 1.18×10^6 cél./mL, seguido por el crecimiento a 30°C con 1×10^6 cél./mL y 8.83×10^5 cél./mL a 35°C. Los análisis de pendientes de los tres ensayos fueron iguales (Figura 14).

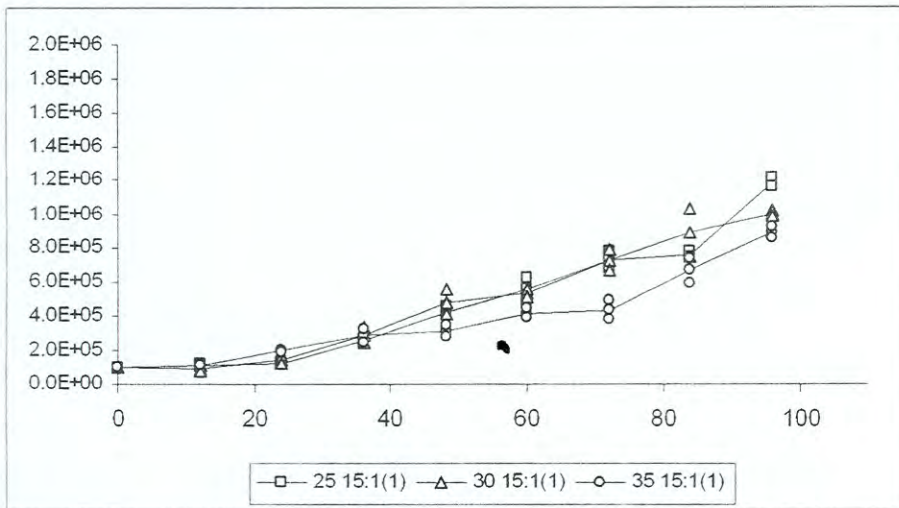


Figura 14. Curvas de crecimiento de *T. chuii* a 25, 30 y 35°C en Medio 15:1(1).

En la razón de 15:1(2) los valores de crecimiento máximos alcanzados al final del cultivo fueron de 1.23×10^6 cél./mL a 25°C, 1.07×10^6 cél./mL a 30°C y 6.71×10^5 cél./mL a 35°C (Figura 15). Al hacer el análisis de las pendientes no se encontraron diferencias significativas.

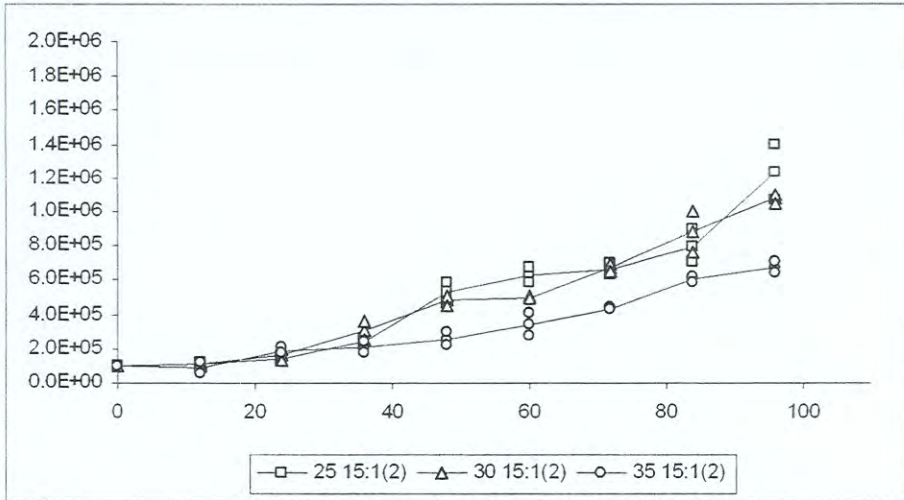


Figura 15. Curvas de crecimiento de *T. chuii* a 25, 30 y 35°C en Medio 15:1(2).

Los máximos crecimientos de *T. chuii* en la razón de 30:1(1) se obtuvieron al final del cultivo alcanzando densidades celulares de 1.48×10^6 cél./mL a los 25°C, 1.06×10^6 cél./mL a los 30°C y 1.13×10^6 cél./mL a los 35°C (Figura 16, Tabla VII). Al hacer el análisis de pendientes no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

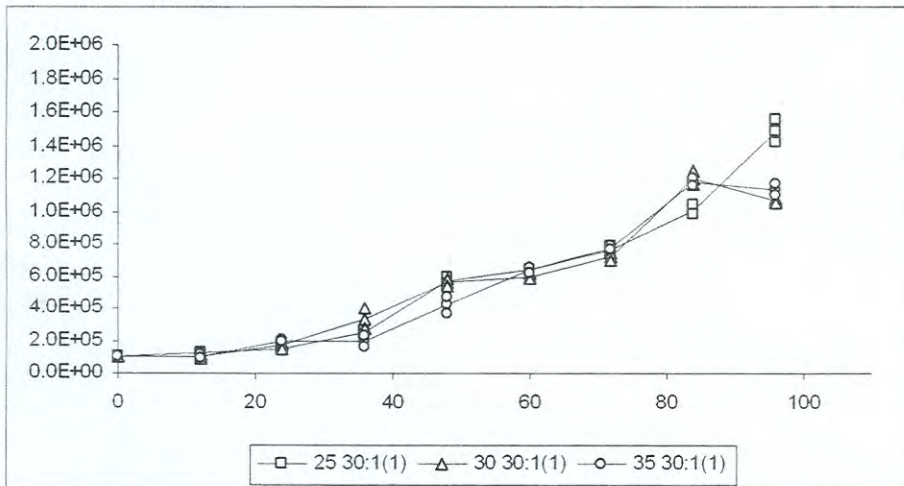


Figura 16. Curvas de crecimiento de *T. chuii* a 25, 30 y 35°C en Medio 30:1(1)

En general en la razón de 30:1(2) se obtuvieron los mejores crecimientos de la microalga, llegando a valores máximos al cuarto día de cultivo a los 25°C con una densidad de 1.74×10^6 cél./mL, seguido por 1.3×10^6 cél./mL a 30°C y 9.6×10^5 cél./mL a

los 35°C (Figura 17). Al hacer el análisis de pendientes se observaron diferencias entre las temperaturas de 25 y 35°C.

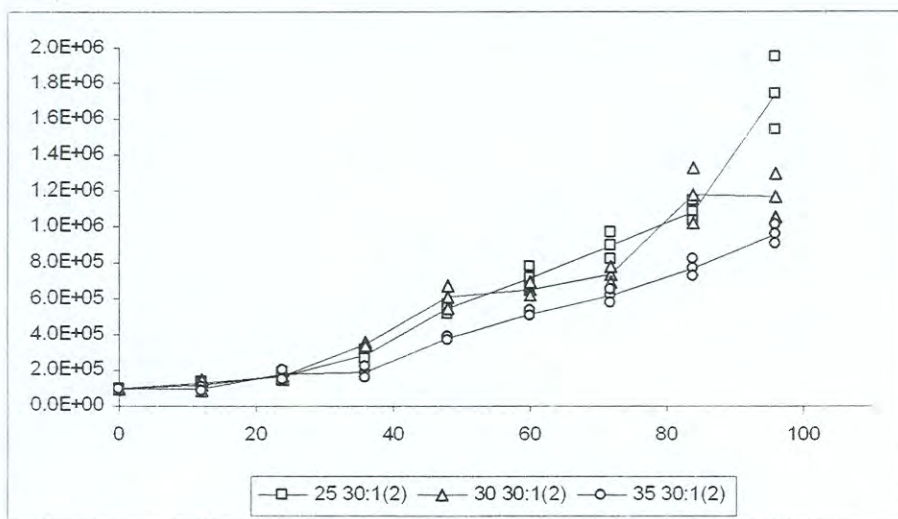


Figura 17. Curvas de crecimiento de *T. chuii* a 25, 30 y 35°C en Medio 30:1(2).

El ANDEVA de dos vías mostró que a las 48 horas los crecimientos más bajos se presentaron a la temperatura de 35°C en todas las razones. Los crecimientos en las temperaturas de 25 y 30 °C fueron muy parecidos y en ambas en las razones 15:1(1) y 15:1(2) los crecimientos fueron inferiores que en las razones 30:1(1) y 30:1(2), siendo en la razón 30:1(2) a los 30°C donde se observó el máximo crecimiento (Figura 18, Tabla VII).

A las 72 horas, los crecimientos a 35°C continuaron siendo inferiores que a las otras dos temperaturas. Los crecimientos en las razones de 15:1(1) y 15:1(2) a 25 y 30°C continuaron siendo menores que los de las razones 30:1(1) y 30:1(2), pero aquí ya se pudo observar una influencia más marcada de la temperatura, pues los mejores crecimientos se presentaron a la temperatura de 25°C (Figura 19, Tabla VIII).

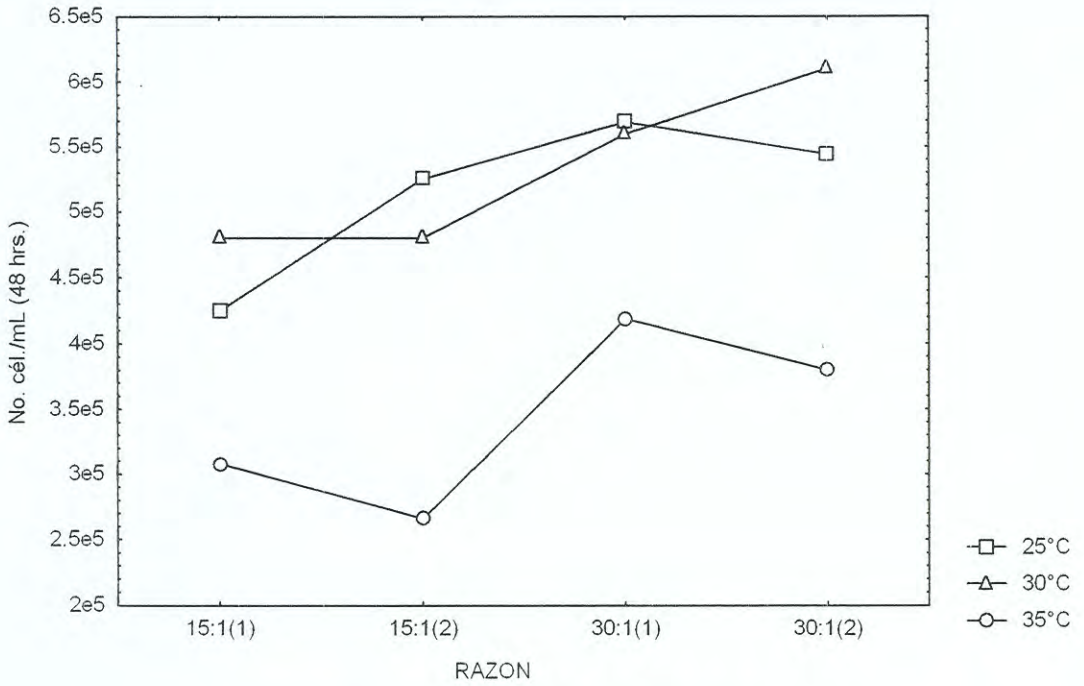


Figura 18. Interacción de dos vías a las 48 horas.

Tabla VII. Relación Temperatura-Razones N:P a las 48 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$.

Temperatura-Razones N:P	No. células promedio
25°C 15:1(1)	425000±27003.086 ^{cd}
25°C 15:1(2)	525000±59511.902 ^{d^{ef}}
25°C 30:1(1)	568750±29755.951 ^{ef}
25°C 30:1(2)	543750±29315.098 ^{ef}
30°C 15:1(1)	480000±71676.359 ^{ode}
30°C 15:1(2)	480000±27156.951 ^{ode}
30°C 30:1(1)	559375±27262.23 ^{ef}
30°C 30:1(2)	610000±65574.383 ^f
35°C 15:1(1)	307812.5±32777.262 ^{ab}
35°C 15:1(2)	265937.5±36676.727 ^a
35°C 30:1(1)	418750±51538.82 ^c
35°C 30:1(2)	379687.5±9375 ^{bc}

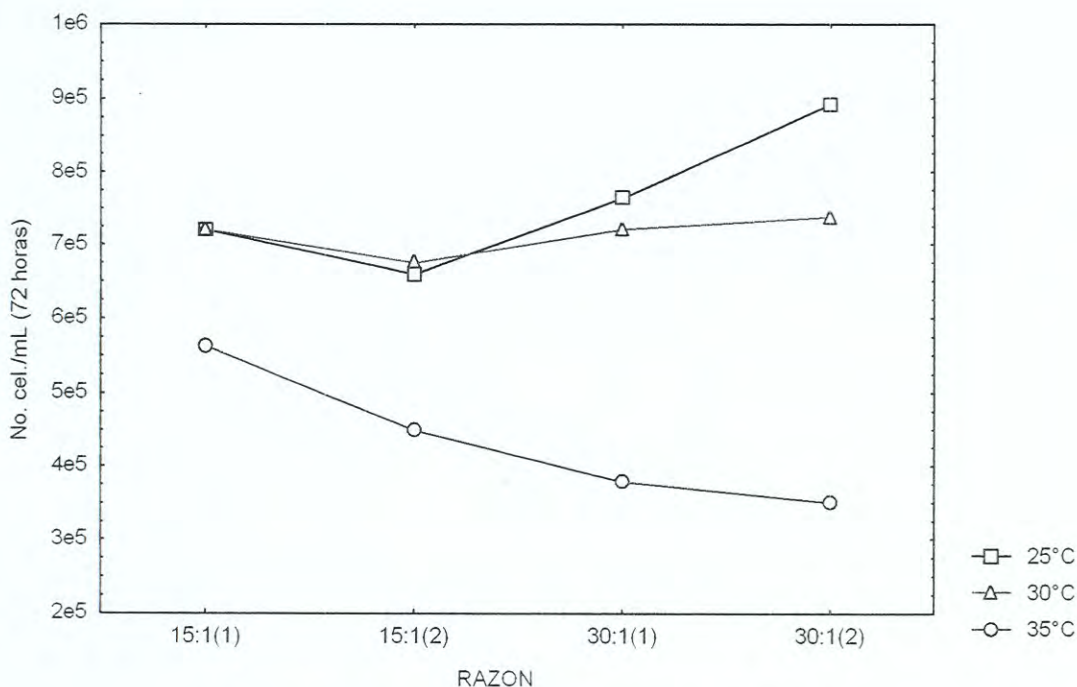


Figura 19. Interacción de dos vías a las 72 horas.

Tabla VIII. Relación Temperatura-Razones N:P a las 72 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$.

Temperatura-Razones	No. células promedio
25°C 15:1(1)	720000±48605.555 ^{cd}
25°C 15:1(2)	659062.5±28910.332 ^{bc}
25°C 30:1(1)	763750±21065.375 ^d
25°C 30:1(2)	892500±72908.336 ^e
30°C 15:1(1)	720000±61508.809 ^{cd}
30°C 15:1(2)	674375±23307.277 ^{cd}
30°C 30:1(1)	720625±25688.438 ^{cd}
30°C 30:1(2)	737500±42914.645 ^{cd}
35°C 15:1(1)	562500±51031.035 ^b
35°C 15:1(2)	448750±7288.6899 ^a
35°C 30:1(1)	378125±10825.317 ^a
35°C 30:1(2)	350000±35721.727 ^a

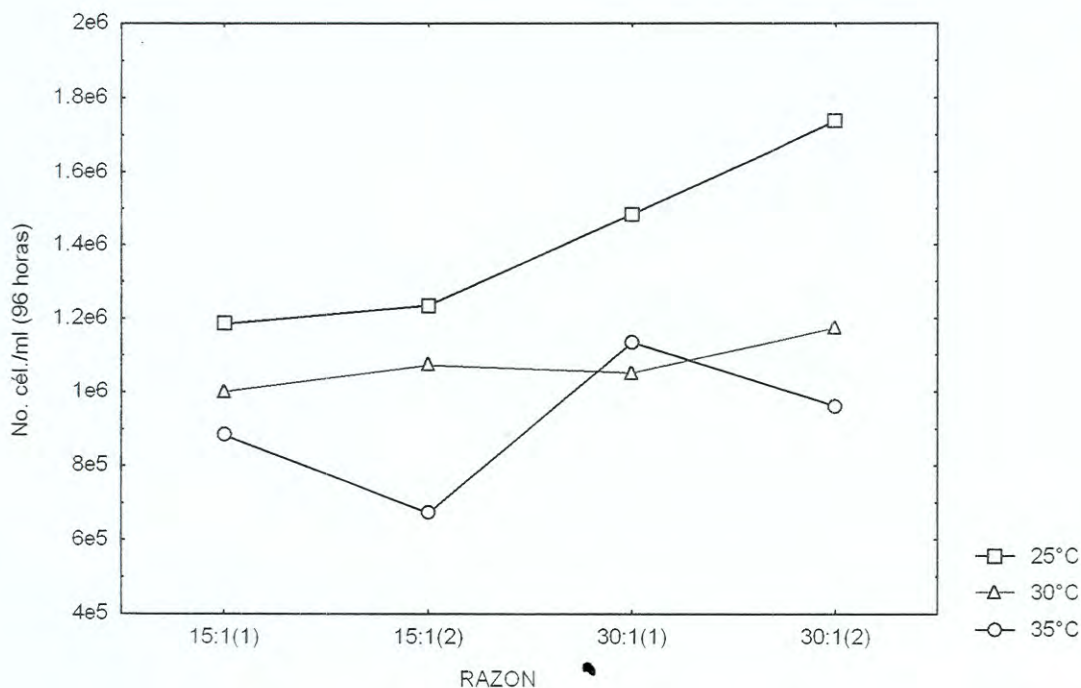


Figura 20. Interacción de dos vías a las 96 horas.

Tabla IX. Relación Temperatura-Razones N:P a las 96 horas. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$.

Temperatura-Razones	No. de células promedio
25°C 15:1(1)	1,184,375±25,769 ^{bcd}
25°C 15:1(2)	1,234,375±166,263 ^{cd}
25°C 30:1(1)	1,484,375±68,750 ^{de}
25°C 30:1(2)	1,737,500±205,649 ^c
30°C 15:1(1)	1,000,000±18,400 ^{bc}
30°C 15:1(2)	1,071,875±25,769 ^{bc}
30°C 30:1(1)	1,051,563±12,885 ^{bc}
30°C 30:1(2)	1,173,438±122,514 ^{bc}
35°C 15:1(1)	882,813±36,219 ^{ab}
35°C 15:1(2)	671,875±34,422 ^a
35°C 30:1(1)	1,134,375±36,976 ^{bc}
35°C 30:1(2)	960,938±52,135 ^{abc}

Finalmente a las 96 horas, los mejores crecimientos se presentaron a la temperatura de 25°C en todos los medios, seguidos de la temperatura de 30°C, excepto en el medio 30:1(1) que alcanzo densidades ligeramente mas elevadas a 35°C que a 30°C, pero en el resto de las razones, el crecimiento a 35°C resultó ser el más bajo (Figura 20, Tabla IX). En general se pudo observar la tendencia de que los mejores crecimientos se presentaron a la temperatura de 25°C y en las razones de 30:1(1) y 30:1(2).

IV.3.- Tasas de Crecimiento en Medios F's

A la temperatura de 25°C las tasas de crecimiento (μ) promedios para los medios F/2 y 4F estuvieron alrededor de 0.84 divisiones diarias y para los medios F y 2F alrededor de 0.95, el análisis estadístico mostró diferencias entre estos dos grupos. Tocante a las tasas de crecimiento máximas estas estuvieron entre 1.24 y 1.38 divisiones/día sin haber diferencias significativas entre los medios F's ($\alpha= 0.05$).

A los 30°C en el medio 4F fue donde se presentaron las menores tasas de crecimiento ($\mu= 0.77$) mientras que las máximas se presentaron en el medio 2F ($\mu= 0.87$). El análisis estadístico mostró diferencias significativas. Respecto a las tasas de crecimiento máximas, estas variaron de 0.99 divisiones/día para el medio F/2 y 1.48 divisiones/día para el medio 2F encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

En lo que respecta a la temperatura de 35°C las tasas de crecimiento promedio variaron de 0.75 divisiones/día para el medio F/2 a 0.93 divisiones/día para el medio 2F, el análisis estadístico mostró que hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Las tasas de crecimiento máximas variaron entre 1.03 y 1.55 divisiones/día para los medios 4F y 2F respectivamente. El análisis estadístico encontró diferencias significativas entre los medios.

En todos los medios F's se observaron las tasas de crecimiento promedio mas altas a 25°C, sin embargo las tasas de crecimiento máximas tuvieron valores mas elevados a la temperatura de 35°C en todos los medios excepto en el medio 4F. También se observó que a las 48 horas se obtenían las tasas de crecimiento mayores (Figura 21 y 22).

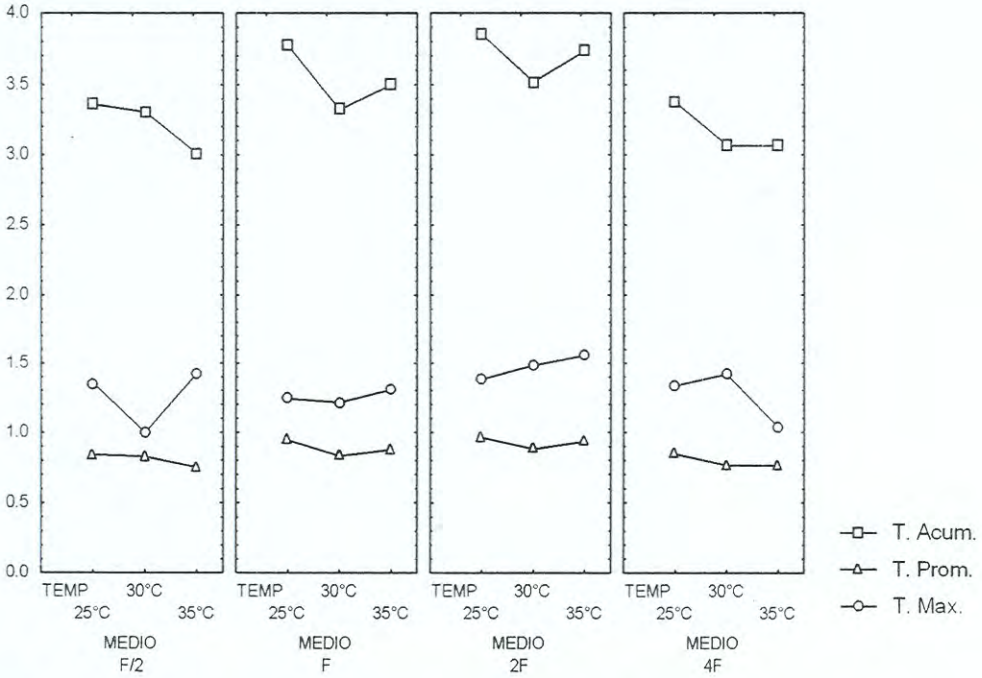


Figura 21. Tasas de crecimiento acumulada, promedio y máxima de los medios F/2, F, 2F y 4F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C

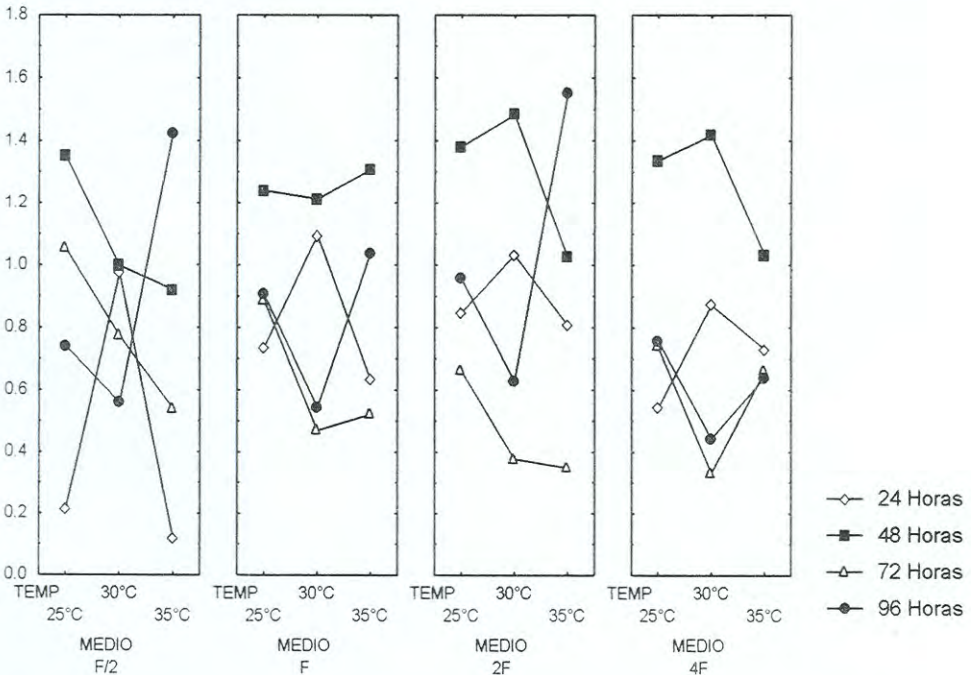


Figura 22. Tasas de crecimiento a las 24, 48, 72 y 96 horas de los medios F/2, F, 2F y 4F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C

IV.4.-Tasas de Crecimiento en Razones N:P 15 y 30

Las tasas de crecimiento promedio para las razones N:P a 25°C estuvieron entre 0.89 y 1.03 divisiones diarias, siendo las razones 30:1(1) y 30:1(2) donde se presentaron las tasas más altas, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos: Las tasas máximas de crecimiento estuvieron entre 1.74 y 1.93 divisiones/día sin que se presentaran diferencias significativas entre ellos ($\alpha=0.05$).

Para la temperatura de 30°C la μ varió de 0.83 divisiones/día para la razón N:P 15:1(1) a 0.89 divisiones/día para la razón 30:1(2), el análisis estadístico mostró diferencias entre los tratamientos. Las μ máximas se mantuvieron alrededor de 1.7 sin diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha=0.05$).

A la temperatura de 35°C se obtuvieron las menores tasas de crecimiento promedio en la razón 15:1(2) alcanzando solo 0.69 divisiones/diarias, mientras que en la razón 30:1(1) llegó hasta 0.88 divisiones diarias; el análisis estadístico mostró diferencias entre los tratamientos. Al analizar las μ máximas éstas variaron de 0.87 a 1.46 divisiones/día entre las razones 15:1(1) y 30:1(2) habiendo diferencias entre los tratamientos ($\alpha=0.05$).

En las razones N:P se presentó la tendencia de que a la temperatura de 25°C se obtuvieron las tasas de crecimiento promedio y acumulada más elevadas. Esto se puede apreciar mejor en las razones 15:1(1) y 15:1(2), mientras que las tasas de crecimiento que se presentaron a la temperatura de 35°C fueron notablemente menores.

En cuanto a las tasas de crecimiento máxima se pudo apreciar que a la temperatura de 35°C éstas fueron ligeramente mayores que en las otras dos temperaturas, excepto en la razón de 30:1(2) que fue mayor a 30°C (Figura 23). También se observó que en general a las 48 horas se alcanzaron las mayores tasas de crecimiento (Figura 24).

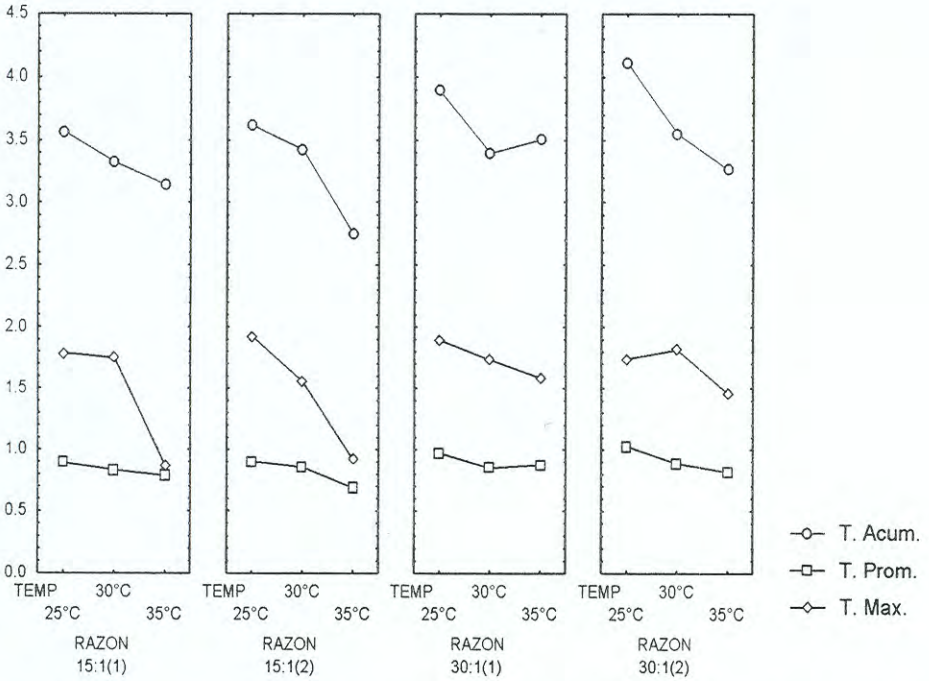


Figura 23. Tasas de crecimiento acumulada, promedio y máxima de las razones 15:1(1), 15:1(2), 30:1(1) y 30:1(2) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

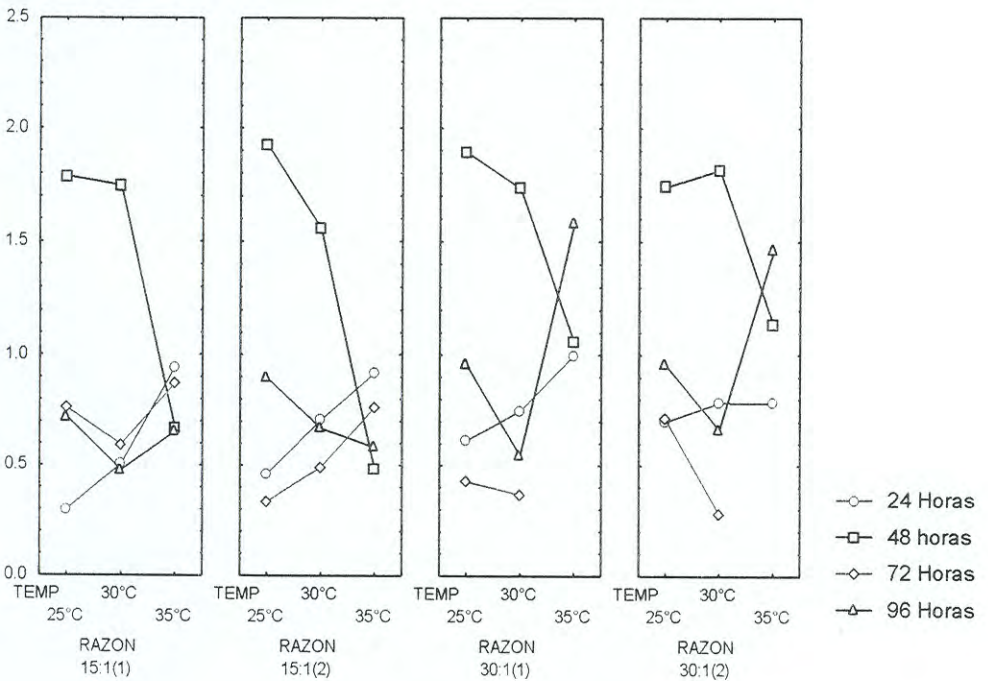


Figura 24. Tasas de crecimiento a las 24, 48, 72 y 96 horas de las razones 15:1(1), 15:1(2), 30:1(1) y 30:1(2) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

IV.5.- Consumo de Nitratos

IV.5.1.- Medios F's

La concentración inicial de nitratos para el medio F/2 fue de 8.5 mg/mL. A las temperaturas de 25 y 35°C en las primeras 12 horas del cultivo se dio un consumo del 68.59% quedando una concentración de 2.67 mg/mL. A los 30°C el consumo fue significativo hasta las 24 horas con un 39.06%, para quedar alrededor de los 5 mg/mL. A partir de las 36 horas, a las tres temperaturas las concentraciones quedaron en 3 mg/mL, las cuales permanecieron hasta el final del cultivo, excepto a la temperatura de 30°C, en donde quedó en 0.83 mg/mL. El análisis de pendientes mostró diferencias en la velocidad de consumo entre la temperatura de 30 y 35°C ($b = -0.0717$ y -0.0073 respectivamente) (Fig. 25).

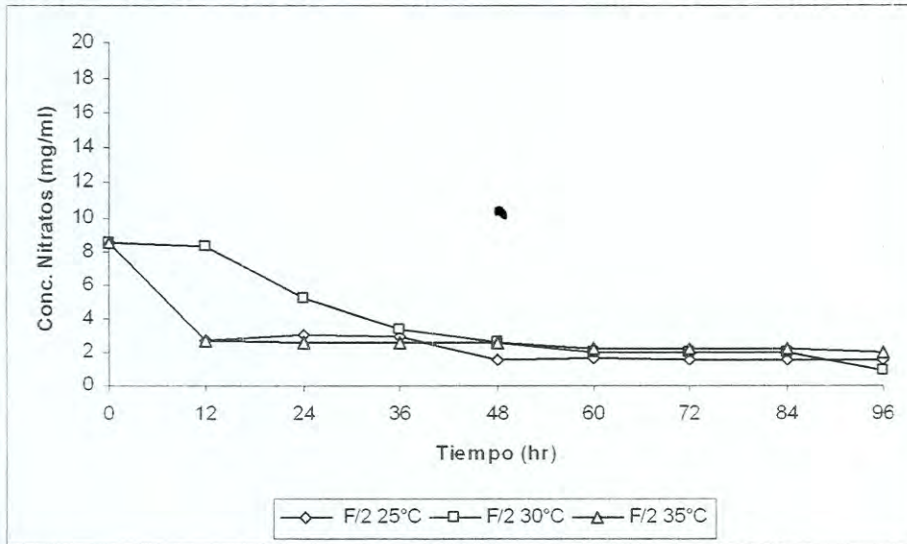


Figura 25. Concentración de Nitratos del medio F/2 a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

La concentración inicial de nitratos registrada en el medio F fue de 18.17 mg/mL y se presentó la misma tendencia que en el medio F/2; a las temperaturas de 25 y 35°C se dio un consumo del 43.59% en las primeras 12 horas manteniéndose alrededor de los 10 mg/mL; mientras que a los 30°C, el consumo fue significativo hasta las 24 horas, con un 24.77%. A las 36 horas, el nivel de nitratos a las tres temperaturas quedó en aproximadamente a los 9 mg/mL, no observándose un consumo significativo hasta el final del cultivo, excepto a los 30°C que al final se tuvo un consumo del 71.55% mientras que

en las otras dos temperaturas solo se consumió de alrededor del 56.88% de nitratos. En análisis de pendientes mostró que a los 30°C la velocidad de consumo fue mayor ($b = -0.1189$) que a las temperaturas de 25 y 35°C ($b = -0.0398$ y -0.0193) (Fig. 26).

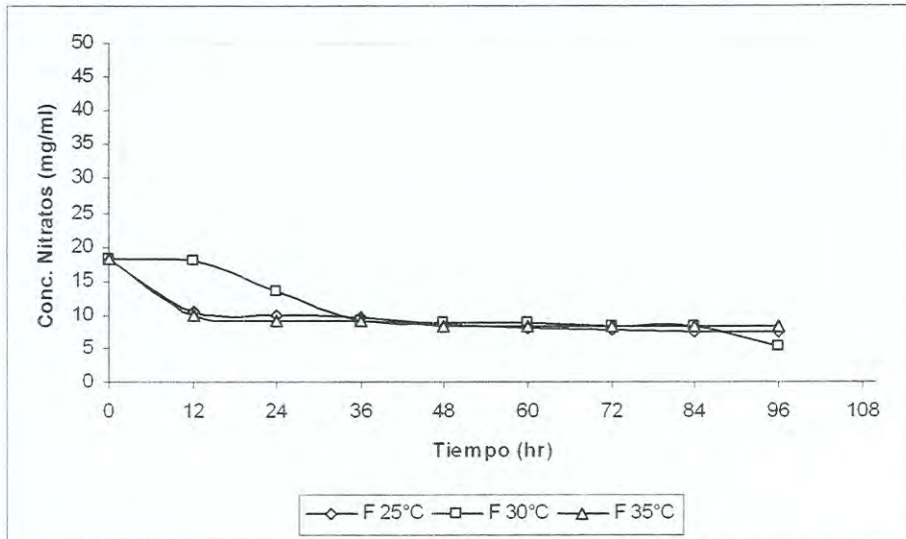


Figura 26. Determinación de Nitratos del medio F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

La cantidad inicial de nitratos registrada en el medio 2F fue de 43.33 mg/mL. A las temperaturas de 25 y 35°C se tuvo a un consumo del 42.68% en las primeras 12 horas, mientras que el consumo a los 30°C fue significativo hasta las 36 horas con un 35.77%, siendo hasta las 48 horas donde la cantidad de nitratos en el medio coincide a las 3 temperaturas quedando alrededor de 20 mg/mL, continuando cercano a este valor hasta el final del cultivo, excepto a la temperatura de 30°C donde alcanzó los 11.50 mg/mL, lo que representa un consumo del 73.46%, mientras que en las otras dos temperaturas solo alcanzó un consumo alrededor del 63%. El análisis de pendientes mostró que hubo diferencias significativas entre las velocidades de consumo a 30°C ($b = -0.2906$) con respecto a 25 y 35°C ($b = -0.1100$ y -0.0909 respectivamente) (Fig. 27).

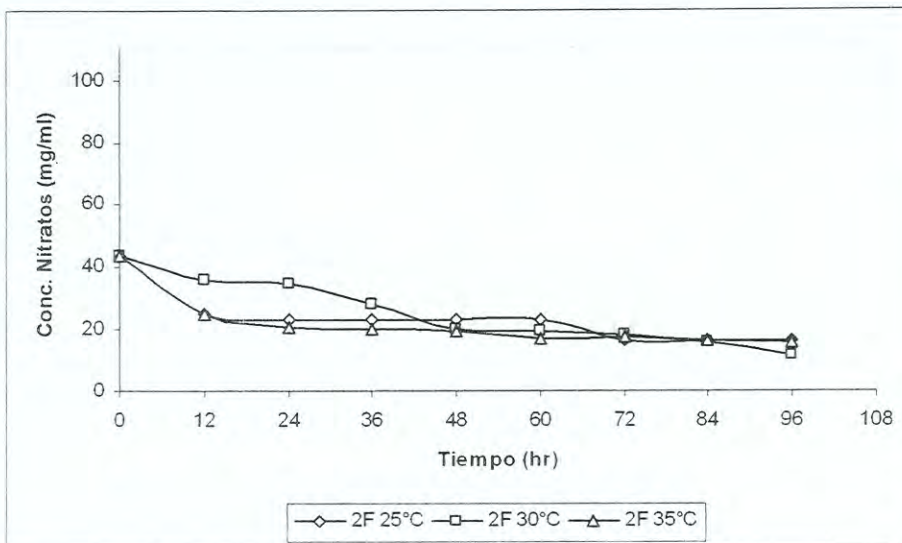


Figura 27. Concentración de Nitratos durante el estudio, en el medio 2F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C

En cuanto al medio 4F, se inició el cultivo con una concentración de 96.17 mg/mL y se presentaron las mismas tendencias que en el resto de los medios F's. A las 12 horas se consumió el 42.81% de nitratos a las temperaturas de 25 y 35°C, mientras que para ese tiempo a la temperatura de 30°C, solo se había consumido el 3.82%; a esta temperatura el consumo fue significativo hasta las 48 horas cuando llegó un 35.87%. A partir de las 60 horas y hasta el final del cultivo, no se presentó un consumo significativo, consumiéndose hasta el 58% de los nitratos a las temperaturas de 25 y 35°C mientras que a los 30°C solo alcanzó un consumo de 47%. El análisis de pendientes mostró que la velocidad de consumo a 30°C ($b = -0.5528$) fue superior a las temperaturas de 25 y 35°C ($b = -0.2017$ y -0.1656) (Fig. 28).

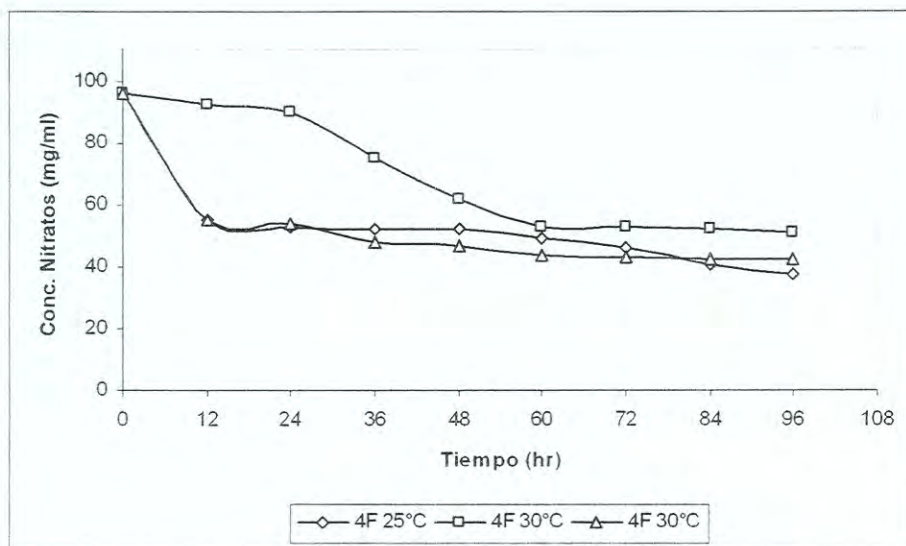


Figura 28. Determinación de Nitratos del medio 4F a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

IV.5.2.- Razones N:P 15 y 30

La concentración inicial de nitratos en la razón de 15:1(1) fue de 20.67 mg/mL. A 25°C, en las primeras 12 horas de cultivo la microalga consumió el 41.94% de los nitratos, quedando en 12 mg/mL, manteniéndose relativamente estable hasta el final del cultivo donde se registró un consumo del 45.96%. A los 30°C el consumo fue gradual hasta las 48 horas, llegando hasta los 9.75 mg/mL, lo que representó un consumo del 47.17%. De ahí en adelante el consumo continuó sin variaciones significativas hasta las 96 horas donde llegó al 63.33%. Para la temperatura de 35°C, en las primeras 12 horas se presentó el mayor consumo (25%), llegando a 15.50 mg/mL. De ahí en adelante hubo un consumo mínimo pero gradual hasta las 96 horas alcanzando el 40.35%. El análisis de pendientes mostró que hubo diferencias significativas entre la velocidad de consumo a los 30°C ($b = -0.1152$) con respecto a las temperaturas de 25 y 35°C ($b = -0.0303$ y -0.0332 respectivamente) (Fig. 29).

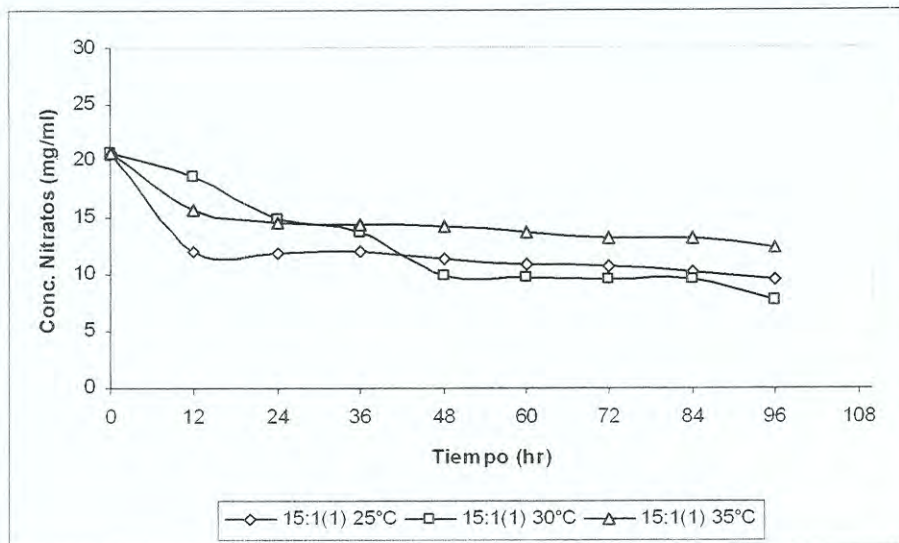


Figura 29. Concentración de Nitratos de la razón 15:1(1) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

Respecto a la razón 15:1(2), se iniciaron los experimentos con una concentración inicial de 25.33 mg/mL de nitratos. A las tres temperaturas en las primeras 12 horas se presentó un consumo de alrededor del 33%. De ahí en adelante en la temperatura de 25°C se tuvo un consumo gradual hasta las 48 horas llegando a los 11.17 mg/mL (55.90%) y continuando prácticamente sin variaciones hasta el final del cultivo. A los 30°C fue donde se obtuvieron los mayores consumos llegando a 82.23% (4.50 mg/mL) a las 48 horas, siguiendo así hasta las 84 horas, pero aumentando el consumo a las 96 horas, quedando finalmente en 1.5 mg/mL, lo que representó un consumo del 94%. A los 35°C se presentaron los menores consumos, quedando en 14.00 mg/mL 96 horas, lo que representó un consumo del 44.42% hasta el final del cultivo. Al realizar el análisis de pendientes se encontró que hubo diferencias significativas entre la velocidad de consumo a los 30°C ($b = -0.1778$) con respecto a las velocidades de consumo a 25 y 35°C ($b = -0.0642$ y -0.0417 respectivamente) (Fig. 30).

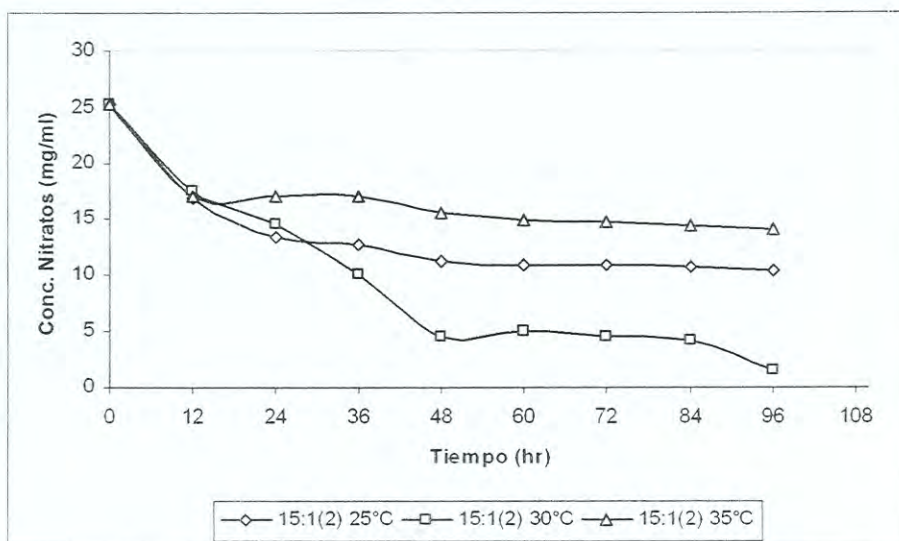


Figura 30. Concentración de Nitratos de la razón 15:1(2) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

Los cultivos con la razón de 30:1(1) iniciaron con una concentración de nitratos de 20.83 mg/mL. En las primeras 12 horas del cultivo a las temperaturas de 25 y 35°C se presentaron consumos de alrededor del 30.80% (14.41 mg/mL), mientras que a la temperatura de 30°C se obtuvo un consumo del 38.40% (12.83 mg/mL). A los 25°C, se observó un consumo lento pero gradual hasta llegar al 63.18% (7.67 mg/mL) al final del experimento. A los 30°C a las 48 horas se obtuvo el 73.60% (5.50 mg/mL) del consumo manteniéndose en este rango hasta el final del cultivo. A la temperatura de 35°C se presentaron los menores consumos llegando hasta el 52% (10 mg/mL) al final del cultivo. El análisis de pendientes reveló que no hubo diferencias significativas en la velocidad de consumo entre las temperaturas de 25, 30 y 35°C ($b = -0.0646$, -0.01159 y -0.0556 , respectivamente). Sin embargo el consumo de nitratos fue notablemente mayor a la temperatura de 30°C a partir de las 36 horas (Fig. 31).

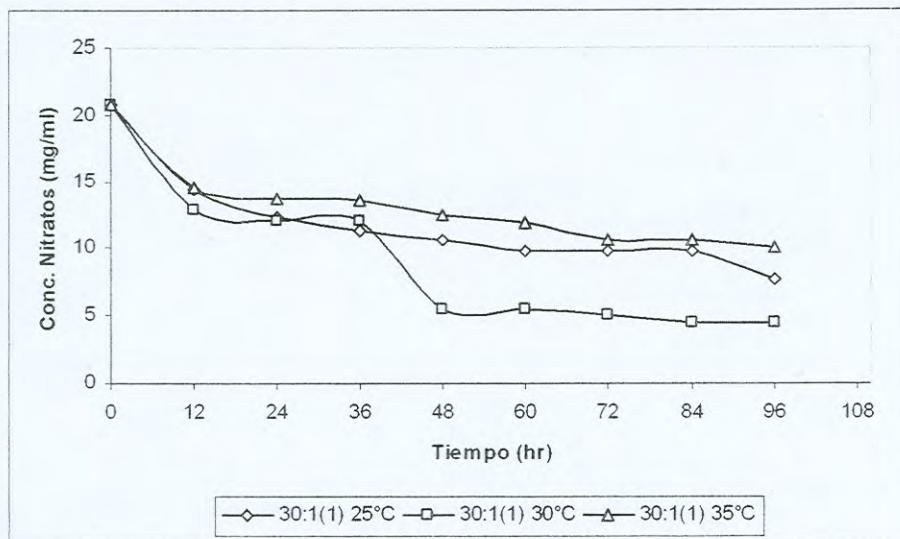


Figura 31. Concentración de Nitratos de la razón 30:1(1) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

Respecto a la razón 30:1(2) esta inició con una concentración de nitratos de 23.50 mg/mL. Las primeras 12 horas a los 25 y 35°C se registró un 27.66% de consumo a los 25°C, este consumo continuó sin variaciones notables hasta las 84 horas; pero a las 96 horas se registró un consumo del 48.21% (12.17 mg/mL). En cuanto al tratamiento a 35°C, a partir de las 12 horas no se presentó un aumento significativo en el consumo hasta las 36 horas, pero a las 48 horas la concentración de nitratos disminuyó hasta 13.17 mg/mL (43.96% de consumo), siguiendo así hasta las 84 horas; presentándose al final del cultivo una disminución en la concentración, llegando hasta 11.83 mg/mL, lo que representó un 49.65% del consumo. A los 30°C fue donde se observó el mayor consumo de nitratos, llegando a las 36 horas hasta niveles de 12.33 mg/mL, (47.53% del consumo), siguiendo sin mucha variación hasta las 84 horas, y presentando al final del cultivo un consumo del 58.17% (9.83 mg/mL). El análisis de pendientes muestra que hay diferencias significativas entre las velocidades de consumo de 25 ($b = -0.0287$) y 30°C ($b = -0.1282$), pero que no hay diferencias entre la temperatura de 35°C ($b = -0.0755$) con respecto a las otras dos. (Fig. 32)

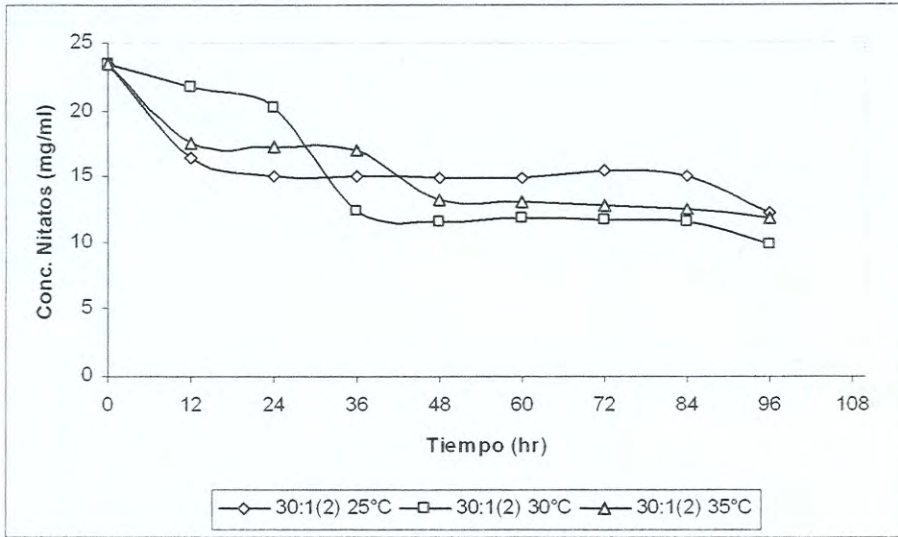


Figura 32. Concentración de Nitratos de la razón 30:1(2) a las temperaturas de 25, 30 y 35°C.

V.- DISCUSIONES

V.1. pH

El valor de pH alcanzado al final del cultivo es debido a que la microalga consume la fuente de carbono primordial que se encuentra en el agua de mar que es el bicarbonato, lo cual trae como consecuencia que queden los carbonatos, que ocasionan que el pH aumente y se alcalinice el medio de cultivo (Richmond, 1986). La reacción que se presenta en el agua de mar es:



V.2.- Crecimiento celular y tasas de crecimiento de los medios F's y razones N:P

En el presente estudio *Tetraselmis chuii* presentó un crecimiento específico y diferente acorde al medio de cultivo analizado y a las temperaturas probadas, ya que los crecimientos de los cultivos microalgales son básicamente controlados por la composición del medio de cultivo y variables medioambientales como la temperatura, intensidad luminosa y pH (Molina y col., 1991). Cada especie de microalga responde ante la disponibilidad y proporción de los diferentes nutrientes, principalmente de nitrógeno y fósforo, y en el caso específico de las diatomeas a la disponibilidad de sílice. En los medios y las razones probadas, la cantidad de nitrógeno fue diferente obteniéndose por lo general los mejores resultados entre los 18 y 43 mg/mL. Los medios F's en los que se obtuvieron mayores concentraciones celulares y mayores tasas de crecimiento fueron el F y el 2F. Sin embargo un factor aún más importante que la concentración de nitratos presentes en el medio, fue la razón N:P a la que se encontraban. Estudios anteriores reportan que las razones N:P críticas están entre 20 y 90 moles de N por cada mol de P y el rango óptimo depende principalmente de las especies (Terry y col. 1985; Liu y col., 2001). En el presente estudio, se encontró que en las razones N:P 30:1(1) y 30:1(2) se presentaron las mayores densidades celulares y las tasas de crecimiento más elevadas, lo cual concuerda con resultados obtenidos en estudios realizados por Rhee (1978) que encontró que la razón de 30:1 es la óptima para *Scenedesmus* sp., otra cloroficea como *Tetraselmis*. En investigaciones hechas en la Universidad de Sonora se han obtenido resultados similares, como lo documenta el trabajo realizado por González-Bello (2004), en donde bajo condiciones de laboratorio se variaron las salinidades y las razones N:P para el cultivo de *Tetraselmis chuii* y se encontró que en el medio de cultivo con la razón 30:1 se obtuvieron

las densidades celulares mayores. En otra investigación relacionada con la misma especie (López-Eliás y col. 2007) trabajando con cultivos al exterior, se encontró que el crecimiento fue mayor cuando se utilizó la razón N:P 30:1.

En términos generales la densidad celular de *Tetraselmis chuii*, tanto en los medios F's como en las diferentes razones de N:P fue mayor a 25°C que en las temperaturas de 30 y 35°C. Esta diferencia se hizo aun mas marcada al final del cultivo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Fábregas y col. (2001) que señalan que la temperatura optima de *Tetraselmis suecica* es entre 22 y 26°C.

Es interesante notar que en el medio 4F, que es el que tiene la mas alta concentración de nitratos, a las tres temperaturas analizadas se reportaron las menores densidades celulares y las tasas de crecimiento mas bajas. Esto demuestra que para que la microalga alcance las densidades celulares deseadas, un exceso de nutrientes puede causar un efecto contrario.

Las tasas de crecimiento también se vieron afectadas por la temperatura, siendo a 25°C donde se obtuvieron las tasas de crecimiento mayores en casi todos los medios probados. Esto apoya investigaciones anteriores sobre la influencia de la temperatura y la razón inicial de N:P en *Tetraselmis* sp. (Molina y col., 1991), donde a 25°C y con N:P entre 2.5 y 80 se presentaron las tasas de crecimiento mas elevadas (1.2 - 1.8 divisiones/día), y al aumentar la temperatura a 28°C estas disminuyeron (1.2 - 1.5 divisiones/día). La misma tendencia se observó en la presente investigación, ya que a las temperaturas de 30°C y en especial a la de 35°C, las tasas de crecimiento fueron menores, efecto que se vio acentuado en especial en los medios F/2 y 4F y en las razones N:P de 15:1.

La mayoría de los estudios sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento de las microalgas se han hecho en intervalos de temperatura entre 5 y 25°C (Pedersen y col., 2004; Molina y col., 1991) y muy pocos a temperaturas mayores, como las de 30°C y 35°C probadas en el presente estudio, ó mayores (Maddux y col., 1964). Las investigaciones realizadas en relación al efecto de la temperatura en las microalgas pueden tener amplias implicaciones. En uno de estos estudios, realizado por Jiménez y Nelly (1990) con la especie *Dunaliella viridis*, se evaluaron un amplio rango de temperaturas (15 a 42°C), con diferentes concentraciones de nitrógeno (0.05, 0.5, 1.5, 5, 10 mM) y se encontró que existe un efecto sinérgico entre la temperatura y la disponibilidad de

nitrógeno para la fotosíntesis También se reportó que hubo un incremento en los pigmentos fotosintéticos cuando había mayor concentración de nitrógeno en el medio.

V.3.- Absorción de Nitratos en los medios F's y razones N:P

El consumo de nitratos, tanto en los medios F's como en las razones N:P 15:1 y 30:1 tuvo un comportamiento similar entre las temperaturas probadas, presentándose dos etapas claramente definidas, una con un consumo acelerado en las primeras 24 horas y la otra con un consumo mínimo a partir de las 48 horas hasta el final del cultivo. Estos resultados son similares a los obtenidos en otras investigaciones realizadas sobre este tema, como las de Terry (1982) en donde las etapas de rápido y lento consumo también se hicieron presentes. Además en otras investigaciones realizados en la Universidad de Sonora con la microalga *Tetraselmis*, en donde se evaluó su crecimiento a 25°C con diferentes medios de cultivo iniciando con una cantidad de inóculo a 2×10^6 cél./mL también se presentaron etapas marcadas con un consumo rápido al inicio del cultivo y un consumo lento al final de este (Robles-Figueroa y col., 2007). En un estudio realizado con la rodoficea *Porfira* a temperatura entre 5 y 25°C y con concentraciones de nitratos de 3 y 30 μmol para un experimento y 7 y 15 μmol para otro, se presentó este mismo patrón, pero algo interesante es que no se presentaron efectos notables en la toma de nutrientes a causa de la temperatura como los que se presentaron debidos a la concentración de éstos (Pedersen y col., 2004). Contrariamente en el presente estudio se vio una notable influencia de la temperatura en el consumo de nitratos, en especial a la temperatura de 35°C, esto seguramente fue debido a que a esta temperatura la microalga tenía un grado considerable de estrés, debido a que estuvo sometida de manera continua a una temperatura 10°C por arriba de su óptimo, confirmándose de esta manera que la toma de nutrientes aumenta con las temperaturas más elevadas, dado que las reacciones metabólicas aumentan (Rhee y Gotham, 1981 y Raven y col., 1988).

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los que se observaron en estudios previos realizados por Molina y col. (1991) donde se encontró que la asimilación de nutrientes es dependiente de la temperatura.

Al comparar las densidades celulares a los 25 y 30°C no se presentaron grandes

diferencias, sin embargo en términos generales al analizar los resultados de consumo de nitratos entre estas dos temperaturas se observó que a 30°C el consumo fue mayor, lo que indica que a esta temperatura la microalga sufre un mayor grado de estrés que a 25°C y por lo tanto necesita mas nutrientes para poder alcanzar crecimientos óptimos.

En estudios anteriores se ha encontrado que el consumo de nitratos se ve fuertemente afectado por la temperatura y disminuye a temperaturas menores a la óptima. Además a temperaturas subóptimas aumentan los residuos de nitratos en el medio (Reay y col., 1999), lo cual podría tener tanto implicaciones económicas como ecológicas en cultivos a gran escala.

VI.- CONCLUSIONES

- La temperatura a la que en general se obtuvieron los mejores crecimientos de *Tetraselmis chuii* fue a los 25°C, mientras que a los 35°C se obtuvieron las menores densidades celulares.
- La mayor densidad celular alcanzada a las tres temperaturas fue en los medios F y 2F.
- Las razones de N:P de 30:1(1) y 30:1(2) fueron en donde se alcanzaron las máximas densidades celulares a las tres temperaturas.
- Las tasas de crecimiento mayores se presentaron en los cultivos realizados con la razón N:P de 30:1, aunque también se obtuvieron tasas de crecimiento elevadas en los medios F y 2F.
- En términos generales el consumo de nitratos fue acelerado en las primeras 12 horas del cultivo y de ahí en adelante disminuyó notablemente en la mayoría de los tratamientos.
- Altas concentraciones de nitratos no garantizan buenos crecimientos, como se comprobó con los resultados obtenidos del medio 4F, ya que lo que realmente favorece el crecimiento de la microalga es la razón N:P del medio de cultivo, que para esta microalga es de 30:1.
- La mejor combinación medio-temperatura para *Tetraselmis chuii* fue 25°C-30:1(1) y 30:1(2).

VII.- RECOMENDACIONES

- Evaluar la composición nutricional de *Tetraselmis chuii* a las temperaturas probadas y con los diferentes medios para saber si tiene el perfil nutricional adecuado para usarse con fines acuaculturales.
- Realizar bioensayos usando las microalgas cultivadas a las temperaturas probadas con los diferentes medios, como alimento a estadios larvarios de camarón.
- En experimentos posteriores medir la cantidad de nitratos a nivel celular para ver cuanto en realidad esta aprovechando la microalga.
- El fotoperíodo es un factor que afecta la división celular, por lo que se sugiere que se hagan investigaciones posteriores donde se vea la influencia de éste, con horas de luz y oscuridad semejante al fotoperíodo solar.
- Para mejorar la producción de microalgas con fines acuícolas se debe tener presente que no todas las especies tienen su óptimo crecimiento bajo las condiciones ambientales de las zonas donde se encuentran los procesos productivos, por lo tanto es una necesidad conocer las respuestas de crecimiento óptimo bajo las condiciones locales.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- Abalde, J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. 1995. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Universidad de Coruña. España. 210 pp.
- Aguirre-Rosas, J.C. 2001. Evaluación integral de un sistema de producción de microalgas en un invernadero, contrastado con el sistema tradicional durante un ciclo anual utilizando la especie *Tetraselmis* sp. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora, México. 54 p.
- Baird, M.E. y J.H. Middleton. 2004. On Relating Physical Limits to the Carbon: Nitrogen Ratio of Unicellular Algae and Benthic Plants. *Journal Of Marine Systems*, 49(1-4): 169-175.
- Bardach, J.E., J.H. Ryter y W.O. Maclarney. 1990. Acuicultura, Crianza y Cultivo de Organismos Marinos y de Agua Dulce. A.G.T. Editores, S.A. México. 750 p.
- Bardach, J.E., Ryther, J.H. y MacLarney, W.O. 1972. Aquaculture. The farming and husbandry of fresh water and marine organisms. Wiley-Interscience. Nueva York
- Batis, J. y Kaelin, A. 2000. World Aquaculture.
<http://www7.taosnet.com/platinum/data/index2.html>
- Becerra-Dórame, M.J. 2005. Estudio del crecimiento de una especie de microalga marina (*Dunaliella* sp.) bajo diferentes condiciones de cultivo en Bahía de Kino Sonora. Tesis de Químico Biólogo esp. Tecnología de Alimentos. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Benemann, J.R. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology*. 4(3): 233-245.

- Borowitzka, M.A. 2006. Biotechnological and Environmental Applications of Microalgae. An Australian Research Network. Murdoch University. Perth, Western Australia. <http://wwwscieng.murdoch.edu.au/centres/algae/BEAM-Net/BEAMHOME.html>
- Broca, D.T., T.M. Madigan. Microbiología. 1993. Ed. Prentice may Hispanoamericano S.A. Segunda Edición. Naucalpan de Juárez, México. 956 p.
- Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, 1994. Folleto de Algas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador. pp. 1-37.
- Chen, Q.X. y L.J. Long. 1991. Research and Production of Live Feeds in China. 187-201. En: Medios Alternativos y Evaluación de Costos para el Cultivo de la microalga *Nanochloris* sp. Como Alimento del Rotífero *Brhachionus plicatilis* (Muller, 1786).1998. Tesis de Maestría en Acuicultura. La Paz, Baja California Sur, México. 90 p.
- Cifuentes, J.L., P. Torres-García y M. Frias. 1990. El océano y sus recursos IX, Acuicultura. Ed. La Ciencia desde México. D.F. pp. 11-37.
- Coronado-Vázquez, S. 1999. Análisis de Producción, de Calidad y Biomasa de *Tetraselmis* sp. en Dos Sistemas de Producción en Primavera y Verano. Tesis de Químico Biólogo esp. Análisis Clínicos. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Sonora, México. 69 p.
- Coutteau, P., P. Sorgeloos. 1992. The use of Algal Substitutes and the Requirement of Live Algae in the Hatchery and Nursery Rearing of Bivalve mollusks: an International Survey. Journal of Shellfish Research, 11:(2) 467-476.
- De Pauw, N. y L. Leenheer. 1985. Microalgae for Aquaculture. In: Microalgal Biotechnology. Edited by M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka. Cambridge University Press. pp 197-221.

- Domínguez, R.L. y E.B. Guevara. 1994. Optimización de la Razón Nitrógeno: Fósforo Sobre el Crecimiento y Biomasa de Dos Especies de Microalgas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Sonora, México. 91p.
- Duerr, E.O., A. Molinar y V. Sato. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology*, 6:(2) 65-70.
- Fabregas, J., C. Herrero, B. Cabezas y J. Abalde. 1985. Mass Culture Biochemical Variability of the Marine *Tetraselmis suecica* Klym (Buch) with High Nutrient. *Aquaculture Engineering*, 6:141-150.
- Fabregas, J., A. Otero, A. Domínguez y M. Patino. 2001. Growth microalgae *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of Artemis species. *Marine Biology*, 3:(3).
- FAO, 2001. Boletín de Acuicultura de la FAO. No. 27.
- Figuroa-Ortiz, L. 1998. El Efecto de la Adición de un Fertilizante Agrícola Sobre el Crecimiento y la Asimilación de Nutrientes en Dos Especies de Microalgas Marinas *Chaetoceros muelleri* y *Tetraselmis* sp. en Dos Condiciones de Cultivo y dos Épocas del Año. Tesis de Químico Biólogo esp. Tecnología en Alimentos. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Sonora, México. 86 p.
- Fulks, W. y K.L. Main. 1991. The Design and Operation of Commercial Scales Live Feed Production System. En "Rotifer and microalgae Culture System Proceedings of U.S.A." Honolulu, Hawai. Argent Laboraory. pp. 364.
- García-Sánchez, M.J., J.A. Fernández y F.X. Niell. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plant.* 88: 631-637.

- González-Bello, G.E. 2004. Efecto de cinco salinidades y dos razones Nitrógeno-Fósforo sobre el crecimiento de la microalga *Tetraselmis chuii*. Tesis de Químico Biólogo esp. Tecnología en Alimentos. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Sonora, México. 67 p.
- Guillard, R.R.L. y R.H. Ryther. 1962. Studies of Marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana hustedt* and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Guillard, R.L.L. y R.H. Ryther (1962). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In Smith, W.L. and M.M., Chalg. (Eds) Culture of Marine Invertebrate Animals, Plenum Press. New York. 29-60 pp.
- HACH Company. 2000. Manual de Análisis de Agua. Segunda Edición. Loveland, Colorado, EE.UU. 220 p.
- Heinen, J.M. 1980. An introduction to Culture Methods for Larval and Postlarval Penaeid Shrimp. In: Avault, J. Editorial Proceedings of the Seventh Annual Workshop World Mariculture Society. pp. 333-344.
- Hirata, H. y M. Murakoshi, 1977. Effects of aeration volume on the growth of marine *Chlorella* in culture. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 26:15-21.
- Hirata, H., 1975. Preliminary report on the photoperiodic acclimation for growth of *Chlorella* cells in synchronized culture. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 24: 1-6.
- James, C.M. y A.M. Al-Khars. 1990. An intensive Continuous Culture System Using Tubular Photobioreactors for Producing Microalgae. *Aquaculture*, 87:381-393.

- Jiménez, C. y F.X. Niell. 1990. Influence of temperature and nitrogen concentration on photosynthesis of *Dunaliella viridis* Teodoresco. *Journal of Applied Phycology*, 2(4): 309-317.
- Jones, A.B. 1999. Environmental Management of Aquaculture Effluent: Development of Biological Indicators and Biological Filters. Tesis de Doctorado. The University of Queensland. Australia. 238 pp.
- Kubitscheck, H.E., 1970. Introduction to Research with Continuous Cultures. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. 195 p.
- Lee, R.E. 1989. Phycology. 2nd. Ed. Cambridge University Press. U.S.A. 645 p.
- Liu, H., E.A. Laws, T.A. Villareal y E.J. Buskey. 2001. Nutrient limited growth of *Aureombra lagunensis* (Pelagophyceae), with implications for its capability to outgrow other phytoplankton species in phosphate-limited environments. *J. Phycol.* 37: 500-508.
- López-Elías, J.A., K.D. Badilla-Flores, L.A. Estrada-Raygoza, D. Fimbres Olivarría, L.J. Ochoa-Castillo, L. Ramos-Brito, y N. Huerta-Aldaz, N. 2007. Manejo de medios de cultivo en el crecimiento de *Tetraselmis chuii* en cultivos al exterior. *Biotecnia*. (En prensa).
- López-Elías, J.A., Voltolina, D., Cordero-Esquivel, B. y M., Nieves-Soto. 2003. Producción comercial de larvas de camarón y microalgas en cuatro estados de la República Mexicana. *Biotécnia* 5 (1): 42-51.
- Lopez-Elias, J.A., M.C. Báez-Dueñas y N. Huerta-Aldaz. 1995. Manual de Técnicas Analíticas Aplicadas al Cultivo de Microalgas. Publicación No. 5, Serie Ciencias Marinas. Hermosillo, Sonora, México.

- Lourenco, S.O., U.M. Lanfer-Marquez, J. Manzini-Filho, E. Barbario y E. Aidar. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis galcilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture*, 148:153-168.
- Maddux, S. W. y F.J Jones. 1964. Some interactions of temperature, Light intensity and nutrient concentrations during the continuous culture of *Nitzschia closterium* and *Tetraselmis* sp. *Limnology and Oceanographic*, 9:(1) 79 – 86.
- Márquez, M.A., B. Mas, O. Palla y J.A. Tiana. 1982. Piscicultura marina. Fundación del Instituto nacional de la Industria. Madrid, España.
- Molina, E.; E. Martínez, S. Sánchez, F. García, y A. Contreras. 1991. The influence of temperature and the initial N:P ratio on the growth of microalgae *Tetraselmis* sp. *Process Biochemistry*, 26: 183-187.
- Pedersen, A.; G. Kraemer, y G. Yarish. 2004. The effects of temperature and nutrient concentrations on nitrate and phosphate uptake in different species of *Porphyra* from Long Island Sound (USA). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 314: 235 – 252.
- Pelczar, J.M., R.D. Reid y E.C.S. Chan. 1982. *Microbiología*. Ed. McGraw-Hill de México, S.A. de C.V. Segunda Edición. Naucalpan Juárez, México. 826 pp.
- Raven, J. A. y R.J. Geider. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110 (4): 441-461.
- Reay, D.S.; D.B. Nedwell, J. Priddle, y J.C. Ellis-Evans. 1999. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:(6) 2577-2584.

- Rhee, G.Y. y I.J. Gotham. 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 26(4): 635-648.
- Rhee, G.Y. (1978): Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. *Limnol. and Oceanogr.* 23: 10-25.
- Richmond, A. 1986. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Robles-Figueroa, K; J.A. López-Eliás, M. Nieves-Soto, N. Huerta-Aldaz, y P. Piña-Valdez. 2007. Evaluación del crecimiento de *Tetraselmis suecica* modificando nutrientes y su potencial impacto en el Mar de Cortés. Congreso de la IMAC.
- Rodríguez, G.M., C.J. Maldonado. 1996. La acuicultura en México, Bases Conceptuales y Principios. *Oceanología*, 1(11):7-26.
- Soeder, C.J. 1986. A Historical Outline of Applied Algology. pp. 25-41. En: Richmond, A. (Ed). *Handbook of Microalgal Mass Cultures*. CRC Press, Boca Raton.
- Spokes, L. 2003. *Environmental Sciences*. University of East Anglia, Norwich, U.K.
- Stein J.R., 1979. *Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge, Univ. Pres, pp. 446
- Stickney, R.R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. Ed. John Willey and Sons, inc. New York. 1063 p.
- Terry, K.L., E.A. Laws y D.J. Burns. 1985. Growth rate variation in the N:P requirement ratio of phytoplankton. *Journal of Phycology*, 21: 323-329.

ANEXO I

PREPARACIÓN DEL MEDIO F/2

nutrientes Mayores		Solución Primaria
NaNO ₃	7.5	% w/v
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.5	% w/v
NH ₄ Cl	2.65	% w/v
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	3	% w/v (calentar para disolver)

Usar un mililitro de estas soluciones por litro de agua de mar, para preparar el medio "F/2". Sugerencia: Preparar el NaNO₃ junto con NaH₂PO₄ · H₂O en 100 mililitros.

Metales Trazas	Solución Primaria
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.98 % w/v
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2 % w/v
ZnCl ₂	1.05 % w/v
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 % w/v
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18 % w/v
Na ₂ MnO ₄ ·2H ₂ O	0.63 % w/v

Es conveniente hacer las soluciones primarias en forma individual con una concentración menor de 10⁶ más concentrada que en el medio "F/2".

Solución Primaria de Metales Trazas

A. Con "Secuestrante Férrico" (Cloruro Férrico):

Disolver 5 gr del Secuestrante Férrico en 900 ml de agua destilada y añadir 1 ml de cada una de las soluciones primarias de metales traza preparados anteriormente; aforar a un litro y asegurar que el pH quede cerca de 4.5. Use 1 ml de esta solución por cada litro de agua de mar para hacer el medio de cultivo. Agua de mar filtrada (5μ, 10μ, etc.) y de ser posible irradiada con UV.

B. Con EDTA y Cloruro Férrico (FeCl₂·6H₂O)

Disuelva 3.15 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ó 4.36 de EDTA (Na_2) en 900 ml de agua destilada, agregue 1 ml de cada una de las soluciones stock primarias de metales traza y afora a 1 litro, asegure un pH de 2.0.

Use 1 ml de esta solución por litro de agua de mar para preparar el medio “f/2”.

Solución Primaria de Vitaminas

- Solución Primaria de Biotina: Se prepara a partir de cristales de B1, disolver 10 mg de biotina en 96 ml de agua destilada. Haga esta solución ligeramente ácida para ser autoclavada y manténgase en un congelador.
- Solución de Vitamina B_{12} : A partir de Cyanocobalamina U.S. de 1000 mg/ ml solución inyectable. Tomar 1 ml y aforarlo en 100 ml de agua destilada. La solución se acidifica para ser autoclavada y se congela.

Solución Primaria de Vitaminas

- Tomar 1 ml de la solución primaria de Biotina y 0.1 ml de la solución stock primaria de B_{12} , aforar a 100 ml con agua destilada y añadir 20 mg de Tiamina HCl.

Se pueden preparar ampollitas de 2, 5 ó 10 ml y almacenarlas estériles (acidificas) en el congelador.

Use $\frac{1}{2}$ ml de esta solución por cada litro de agua de mar para preparar el medio “f/2”.

Preparación del Buffer “Tris”

Tome 50 g de “Tris” y disuélvase en 200 ml de agua destilada y ajuste el pH a 7.2 en HCL. Use de 1 a 5 ml por litro de medio antes de la autoclave, ajustando el pH a 7.4 (recomendado usar 1 ml por litro cuando el pH del medio es 7.9–8.2) (Stain, 1979).

ANEXO II

CONTEOS CELULARES

Tabla X. Conteos por cuadruplicado de *Tetraselmis chuii* en los diferentes medios y razones a 25°C.

Horas	F/2	F	2F	4F	15:1(1)	15:1(2)	30:1(1)	30:1(2)
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
12	111250	131250	115000	122500	100000	87500	118750	125000
12	100000	122500	112500	100000	131250	118750	133750	140000
12	100000	137500	106250	103750	106250	120000	115000	123750
12	105000	140000	112500	110000	103750	113750	117500	132500
24	107500	148750	183750	162500	112500	138750	151250	196250
24	103750	176250	178750	136250	138750	125000	146250	150000
24	121250	180000	162500	176250	113750	136250	152500	151250
24	133750	162500	196250	115000	128750	151250	162500	156250
36	181250	237500	300000	237500	250000	226250	258750	325000
36	151250	235000	287500	246250	275000	220000	250000	275000
36	173750	238750	275000	212500	251250	250000	257500	262500
36	190000	250000	290000	200000	253750	260000	237500	287500
48	255000	425000	515000	402500	425000	587500	550000	581250
48	327500	375000	475000	325000	450000	487500	612500	550000
48	320000	400000	450000	360000	387500	462500	562500	531250
48	287500	375000	437500	387500	437500	562500	550000	512500
60	472500	665000	700000	612500	472500	665000	643750	758750
60	481250	638750	731250	437500	507500	665000	643750	625000
60	455000	612500	638750	437500	612500	612500	630000	743750
60	401250	638750	660000	437500	612500	562500	630000	743750
72	663750	742500	712500	562500	787500	663750	787500	990000
72	652500	710000	753750	661250	720000	687500	775000	877500
72	562500	787500	750000	675000	697500	666250	750000	813750
72	585000	675000	750000	562500	675000	618750	742500	888750
84	878750	990000	1068750	675000	787500	787500	1012500	1136250
84	985000	845000	1125000	743750	743750	813750	990000	1046250
84	900000	810000	1068750	787500	743750	900000	1046250	1023750
84	955000	990000	933750	766250	750000	675000	990000	1136250
96	950000	1387500	1475000	1025000	1212500	1250000	1500000	2000000
96	1012500	1350000	1462500	1025000	1187500	1387500	1500000	1750000
96	1087500	1412500	1437500	1075000	1187500	1300000	1550000	1500000
96	1062500	1312500	1387500	1025000	1150000	1000000	1387500	1700000

Tabla XI.- Conteos por cuadruplicado de *Tetraselmis chuii* en los diferentes medios y razones a 30°C.

Horas	F/2	F	2F	4F	15:1(1)	15:1(2)	30:1(1)	30:1(2)
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
12	185000	112500	122500	87500	100000	115000	100000	153750
12	152500	13750	116250	113750	62500	88750	117500	100000
12	147500	130000	121250	87500	110000	115000	100000	115000
12	161250	116250	140000	100000	100000	116250	98750	87500
24	182500	222500	242500	217500	143750	166250	195000	203750
24	230000	215000	193750	175000	125000	121250	163750	156250
24	216250	195000	212500	175000	171250	205000	150000	156250
24	165000	223750	175000	168750	131250	171250	166250	177500
36	301250	308750	372500	333750	351250	345000	271250	337500
36	278750	387500	250000	306250	258750	240000	405000	346250
36	366250	398750	425000	400000	250000	285000	297500	356250
36	250000	406250	338750	317500	281250	365000	272500	341250
48	396250	517500	625000	500000	555000	492500	520000	625000
48	377500	440000	550000	495000	382500	487500	580000	515000
48	400000	530000	552500	500000	495000	440000	575000	635000
48	397500	500000	562500	462500	487500	500000	562500	665000
60	562500	495000	643750	605000	545000	497500	612500	643750
60	540000	625000	637500	557500	560000	512500	580000	625000
60	525000	587500	670000	500000	502500	490000	605000	710000
60	532500	550000	650000	462500	515000	500000	590000	637500
72	673750	795000	760000	712500	725000	700000	750000	800000
72	685000	645000	700000	565000	680000	650000	725000	715000
72	650000	625000	787500	600000	805000	687500	720000	705000
72	675000	692500	725000	595000	670000	660000	687500	730000
84	910000	850000	1125000	678750	1088750	978750	1193750	1387500
84	812500	1050000	1062500	772500	832500	806250	1262500	1187500
84	812500	1000000	1040000	926250	875000	750000	1175000	1062500
84	762500	1115000	1087500	825000	750000	988750	1175000	1062500
96	1230000	1097500	1137500	825000	981250	1068750	1037500	1268750
96	943750	937500	1137500	862500	1025000	1068750	1062500	1000000
96	937500	1112500	1068750	768750	1000000	1106250	1043750	1175000
96	875000	875000	1250000	900000	993750	1043750	1062500	1250000

Tabla XII.- Conteos por cuadruplicado de *Tetraselmis chuii* en los diferentes medios y razones a 35°C.

Horas	F/2	F	2F	4F	15:1(1)	15:1(2)	30:1(1)	30:1(2)
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
0	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
12	71250	83750	110000	97500	112500	116250	115000	87500
12	75000	122500	122500	92500	110000	50000	100000	100000
12	88750	90000	85000	106250	103750	98750	95000	88750
12	85000	108750	50000	102500	113750	86250	101250	100000
24	107500	157500	186250	145000	187500	168750	201250	201250
24	105000	150000	200000	188750	186250	186250	192500	163750
24	103750	153750	153750	157500	188750	211250	206250	142500
24	118750	158750	163750	176250	208750	192500	200000	187500
36	157500	180000	253750	232500	262500	175000	227500	225000
36	93750	168750	187500	227500	337500	195000	212500	175000
36	127500	183750	212500	285000	250000	225000	150000	168750
36	162500	206250	263750	232500	288750	253750	175000	225000
48	235000	375000	343750	375000	258750	253750	450000	375000
48	150000	387500	375000	353750	326250	272500	475000	393750
48	200000	362500	351250	296250	321250	225000	375000	375000
48	253750	410000	355000	340000	325000	312500	375000	375000
60	335000	462500	625000	506250	437500	712500	356250	518750
60	375000	518750	537500	468750	425000	662500	312500	537500
60	347500	500000	525000	475000	375000	587500	362500	500000
60	317500	537500	562500	437500	400000	575000	343750	525000
72	343750	500000	406250	525000	562500	450000	393750	331250
72	337500	500000	337500	500000	500000	438750	375000	312500
72	275000	575000	600000	562500	625000	456250	375000	393750
72	250000	637500	512500	562500	562500	450000	368750	362500
84	750000	875000	950000	775000	625000	575000	1143750	831250
84	812500	950000	1062500	650000	762500	593750	1193750	750000
84	762500	900000	875000	837500	625000	612500	1162500	750000
84	750000	937500	1000000	750000	625000	618750	1187500	818750
96	862500	1150000	1331250	850000	875000	637500	1156250	987500
96	750000	1118750	1212500	781250	843750	712500	1162500	1006250
96	856250	1106250	1475000	868750	881250	687500	1137500	887500
96	750000	1150000	1318750	850000	931250	650000	1081250	962500

ANEXO III

DATOS DE DETERMANACIÓN DE NITRATOS

Tabla XIII.- Determinación de nitratos de *Tetraselmis chuii* en los diferentes medios y razones a 25°C.

Horas	F/2	F	2F	4F	15:1(1)	15:1(2)	30:1(1)	30:1(2)
0	8.5	18	43	95	41	25	20.5	24.5
0	8.5	18	43.5	97.5	41.5	26	21.5	23
0	8.5	18.5	43.5	96	41.5	25	20.5	23
12	5	11	21.5	56	25	18.5	14	16
12	1	10.5	33	52.5	23	15.5	15	18.5
12	2	10	19.5	56	24	16.5	14	15
24	2	7.5	22	52	24	13	10.5	14.5
24	3.5	12.5	23.5	51.5	24.5	14	14	14
24	3.5	10	23	54	22.5	13	12.5	16
36	3	9	22.5	50	26.5	13.5	13.5	15.5
36	2.5	10	23	54	23	11.5	11.5	12
36	3	10	17.5	51.5	22	13	9	14.5
48	3	8.5	20.5	53.5	24	11	9	8.5
48	1	9.5	21.5	51.5	20	11	8.5	8
48	0.5	8	26	51	23.5	11.5	7.5	10.5
60	0.5	7.5	23.5	48.5	21.5	11.5	10.5	17
60	1.5	7.5	23.5	49.5	20.5	12	9.5	16.5
60	3	9	21.5	48.5	22.5	9	9.5	11
72	1.5	9	17.5	46.5	22	10.5	11	14.5
72	1.5	7.5	17.5	45	20.5	11	8.5	17
72	1.5	6.5	13.5	46	21.5	11	8.5	15
84	2.5	6.5	20.5	37.5	16.5	10.5	9.5	13.5
84	1.5	9	26	41	26.5	10.5	10	15.5
84	1	7	22	42.5	23	11	12.5	16
96	1.5	8.5	26	42.5	21	10	9.5	12.5
96	1.5	8	32	41	23	12	6	11.5
96	1.5	7	23	37.5	19	9	7.5	12.5

Tabla XIV.- Determinación de nitratos de *Tetraselmis chuii* en los diferentes medios y razones a 30°C.

Horas	F/2	F	2F	4F	15:1(1)	15:1(2)	30:1(1)	30:1(2)
0	8.5	18	43	95	41	25	20.5	24.5
0	8.5	18	43.5	97.5	41.5	26	21.5	23
0	8.5	18.5	43.5	96	41.5	25	20.5	23
12	9	19.5	31.5	92.5	37	8.5	10.5	22.5
12	7.5	18	37	101.5	22.5	11.5	16	19.5
12	17	20	38.5	110	23	32.5	12	23.5
24	7.5	15.5	33.5	82.5	29.5	8.5	5.5	24
24	4	12	35	86.5	29	12	12	19.5
24	4	13.5	35	102	30.5	23	10.5	17
36	3	9.5	32	72	28	5	3	13
36	2.5	10	24	71.5	26	7	9	13
36	4.5	8	27.5	82	28	18	12	11
48	2.5	4	14.5	31.5	16.5	4.5	6	11.5
48	2.5	3.5	11.5	73	22	2	5.5	7
48	2.5	4.5	13.5	80.5	17	7	4.5	7.5
60	2	4	22.5	38.5	22	1.5	5.5	14.5
60	2	3.5	16	54.5	19	4	6	12.5
60	2	6.5	11	64	16.5	9.5	5	11
72	1.5	10	18	49	17	3	8	13.5
72	2	9	18	54.5	18.5	6	10	15
72	2	6	20.5	55	21.5	12	12	14
84	2.5	9	20	49	17.5	3	4.5	14
84	2.5	8.5	16.5	55.5	20	5.5	9	15.5
84	4	7	21	57.5	19	13	10	9
96	0.5	5.5	11.5	47	11.5	1.5	4.5	11.5
96	1	4	20	55	19	9	10	7.5
96	1	6	22	71.5	15	9.5	7.5	10.5

Tabla XV.- Determinación de nitratos de *Tetraselmis chuii* en los diferentes medios y razones a 35°C.

Horas	F/2	F	2F	4F	15:1(1)	15:1(2)	30:1(1)	30:1(2)
0	8.5	18	43	95	41	25	20.5	24.5
0	8.5	18	43.5	97.5	41.5	26	21.5	23
0	8.5	18.5	43.5	96	41.5	25	20.5	23
12	3	7	20	57	26	13.5	14.5	16.5
12	2.5	7	21.5	51.5	31	16	14.5	14.5
12	2.5	7.5	22	53.5	27	17	12	17.5
24	1.5	5	20	57	26	17	14	17.5
24	2	6.5	19.5	64.5	20	7	12.5	17
24	0.5	5.5	18	51	29	14.5	13.5	19.5
36	7	9	23	47.5	27	17.5	13.5	22
36	7	10	24	44	32.5	20	14	19
36	4.5	9	23.5	44	28.5	17	22	19.5
48	1	7.5	20	34	25	14.5	13.5	16
48	2.5	6	22	52.5	31.5	17.5	11	11.5
48	3	5.5	20.5	52.5	23	14.5	13	12
60	2	8.5	14	39	16	14.5	12.5	13
60	3.5	9.5	20.5	47.5	19	15	12	12
60	2.5	8.5	17	43.5	21	15	11	14
72	6	8.5	17.5	41	26	13.5	10	13.5
72	1	8	17	44	26	15.5	12.5	12
72	2.5	8	18	43.5	26.5	15	9.5	13
84	2	8	16	42	26	14.5	10	13
84	2.5	8	16.5	42.5	26.5	14.5	10.5	12
84	2	8.5	17	42.5	26	14	11.5	12.5
96	2	8	25	42	24	14.5	10	12
96	1.5	8	22.5	43	24.5	15	10	11.5
96	2.5	8.5	24	41.5	25.5	14	10	12