



"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



1963

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y DESARROLLO CELULAR EN
CULTIVOS DE *Thalassiosira weissflogii* A CUATRO
SALINIDADES EN MEDIOS LIMITANTES DE NITRÓGENO**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA
Opción en Acuicultura

PRESENTA:
DIANA MEDINA FÉLIX

HERMOSILLO, SONORA.

OCTUBRE DE 2010

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

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Diana Medina Félix**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Biólogo con opción en Acuicultura**.

Dr. José Antonio López Elías
Director de Tesis

M.C. Nolberta Huerta Aldaz
Vocal secretario

Biól. Norberto Miguel Angel Pastén Miranda
Vocal

Dr. José Eduardo Valdez Holguín
Suplente

RESUMEN

En los laboratorios de producción de postlarvas, una de las actividades principales, es la producción de microalgas, ya que son utilizadas como alimento para organismos filtradores, así como para peces y crustáceos en sus primeras etapas de desarrollo. El uso de microalgas en los laboratorios está limitada a un cierto número de organismos, siendo *Chaetoceros muelleri* la más demandada, sin embargo, se tienen otras especies que pueden funcionar como complemento, por lo que en esta investigación se avaluó el crecimiento y desarrollo de la microalga *Thalassiosira weissflogii* en diferentes salinidades y con deficiencias de nitrógeno. El experimento fue llevado a cabo en matraces de 250 mL por cuadruplicado durante 7 días a temperatura y luz constante bajo condiciones de laboratorio. El medio control fue el F/2 y el medio F/4 se preparó modificando la fuente de N con 37.5 g/L de NaNO₃ y el medio F/8 con 18.75 g/L de NaNO₃; El alga crecida en cada uno de estos medios fue llevada a cabo a cuatro salinidades: 25, 35, 45 y 55. El inóculo inicial fue de 50,000 cél/mL (excepto para las salinidades de 55 en el medio F/4 y F/8 que fue de 9,000 y 3,500 respectivamente). Los conteos celulares se realizaron diariamente, así mismo se registró el pH. Al final del experimento se determinó la cantidad de peso seco, ceniza y materia orgánica y de pico-gramos por célula en peso seco, ceniza y materia orgánica.

Los crecimientos mayores se dieron en las salinidades de 25 y 35 en el medio control y en el medio F/4 a salinidad de 35, con valores promedio de 542,621 cél/mL; mientras que a la salinidad de 55 en los medios limitantes de nitrógeno no crecieron los cultivos. Así mismo las tasas de crecimiento máxima y promedio se dieron en los tratamientos anteriormente mencionados con valores promedio de divisiones diarias de 0.49. Las cantidades mayores de peso seco y de materia orgánica se encontraron en las salinidades de 25 y 35 en los medios F/2 y F/4 con un promedio de 0.234 y 0.128 gr/L respectivamente. En general se encontró que a salinidades debajo de 45 se tienen las concentraciones celulares mayores y la mayor cantidad de biomasa seca.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
II.1. Importancia de las microalgas	5
II.2. Cultivo de microalgas	6
II.3. Nutrientes	7
II.4. Medios de cultivo	11
II.5. Tipos de cultivo	14
II.6. Salinidad	14
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	20
IV.1. Objetivo general	20
IV.2. Objetivos particulares	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	21
V.1. Especie de microalga	21
V.2. Medios de cultivo y aclimatación	22

V.3. Diseño experimental	22
V.4. Medición de la concentración celular	24
V.5. Variables fisicoquímicas	25
V.6. Determinación del peso seco, ceniza y materia orgánica	25
V.7. Determinación de Pcg/cél en peso seco, ceniza y materia orgánica	25
V.8. Tratamiento estadístico	25
VI. RESULTADOS	27
VI.1. Valores de pH a cuatro salinidades en tres medios de cultivo	27
VI.2. Curvas de crecimiento	27
VI.3. Comparación del crecimiento máximo, tasa de crecimiento acumulada y promedio	28
VI.4. Producción de biomasa	31
VI.5. Comparación de Pcg/cél peso seco, ceniza y materia orgánica	33
VII. DISCUSIÓN	38
VII.1 Valores de pH a cuatro salinidades en tres medios de cultivo	38
VII.2 Curvas de crecimiento	39

VII.3. Comparación del crecimiento máximo, crecimiento acumulado y crecimiento promedio	40
VII.4. Producción de biomasa	41
VII.5. Comparación de Pcg/cél peso seco, ceniza y materia orgánica	43
VIII. CONCLUSIONES	44
IX. RECOMENDACIONES	46
X. LITERATURA CITADA	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Ventajas y desventajas de la fertilización orgánica e inorgánica	13
II. Medio de cultivo patrón para preparar el medio F/2	23
III. Valores promedio y desviación estándar (entre paréntesis) del crecimiento máximo, tasa de crecimiento (μ) acumulado y promedio en las cuatro salinidades (25, 35, 45 y 55) en los tres medios de cultivo (F2, F/4 y F/8)	32
IV. Valores promedio y desviación estándar (entre paréntesis) de peso seco, ceniza y materia orgánica en los cultivos de <i>Thalassiosira weissflogii</i> para salinidades (25, 35, 45 y 55) y los medios de cultivo (F/2, F/4 y F/8).	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cultivo estático a nivel de tubo de ensayo, matraz y garrafón (Torrentera-Blanco y Tacon, 1989)	16
2. Cultivo continuo a nivel de bolsa de 100 L de capacidad. A) Reserva de medio de cultivo (20 L.); B) Sifón para el medio de cultivo; C) Escape de aire; D) Recipiente de cultivo (bolsa de plástico); E) Dosificador de aire; F) Filtro de aire; G) Sifón de cosecha; H) Recipiente de cosecha	16
3. Cultivo masivo de microalgas en invernadero	17
4. Cultivo masivo al exterior de <i>Chaetoceros</i> sp. en laboratorio comercial de Bahía Kino, Sonora	17
5. <i>Thalassiosira weissflogii</i> , diatomea cilíndrica con un tamaño aproximado de 15-20 μm .	21
6. Diseño experimental en los cuatro tratamientos de salinidad (25, 35, 45 y 55) en cada uno de los medios f (F/2, F/4 y F/8)	24
7. Valores diarios del pH a las cuatro salinidades (25, 35, 45 y 55) de los cultivos de <i>Thalassiosira weissflogii</i> en los medios de cultivo F/2 (a), F/4 (b) y F/8 (c)	29
8. Valores diarios de la concentración de cél/mL, en las cuatro	30

salinidades (25, 35, 45 y 55) de los cultivos de *Thalassiosira weissflogii*. en los medios de cultivo F/2 (a), F/4 (b) y F/8 (c)

9. Contenido de peso seco, ceniza y materia orgánica, en las salinidades de 25, 35, 45 y 55 en el medio control (F/2). 34
10. Contenido de peso seco, ceniza y materia orgánica, en las salinidades de 25, 35, 45 y 55 en el medio (F/4). 35
11. Contenido de peso seco, ceniza y materia orgánica, en las salinidades de 25, 35, 45 y 55 en el medio (F/8). 36

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la captura de recursos marinos no es suficiente para cubrir las necesidades de productos pesqueros a nivel mundial y estos recursos se han visto afectados por la sobreexplotación de la pesca (Riquelme-Salamanca, 2003). La acuicultura ha sido de gran ayuda para cubrir gran parte de esta demanda, y así se contribuye también a la sustentabilidad de muchas especies.

La rápida expansión de la camaronicultura en el noroeste de México ha sido acompañada por un importante incremento del número y de la capacidad instalada de los laboratorios de producción de postlarvas (López-Elías *et al.*, 2004). En los laboratorios de producción de postlarvas una de las técnicas más importantes es el cultivo de microalgas, ya que son la fuente principal y natural de alimento para organismos filtradores como los moluscos bivalvos, zooplancton, larvas de diferentes especies de peces marinos y crustáceos (Muller-Feuga, 2000).

Las microalgas corresponden al primer eslabón en la cadena trófica de los océanos por ser organismos fotoautótrofos. Algunos grupos de microalgas son ampliamente utilizadas en acuicultura por sus excelentes características (tamaño adecuado, contenido proteico y lipídico, lo que nos lleva a un buen perfil de ácidos grasos, contenido de vitaminas y pigmentos), que son bien utilizadas por los organismos que las consumen (García-Lagunas, 2009). Dentro de las Diatomeas, el género *Thalassiosira* es de probada eficacia no sólo como alimento, sino que también juega un papel esencial en el tratamiento del agua donde se desarrollan crustáceos, peces y moluscos (Guerra-Azna, 2009).

Uno de los aspectos fundamentales que se debe de tomar en cuenta para una acuicultura sustentable, es el manejo adecuado del alimento. La alimentación

suplementaria, es el costo más importante de la actividad camaronícola, y puede llegar a representar más de 50% de los costos operativos totales. Hasta hoy, la mayoría de las dietas se formulan a partir de los requerimientos nutricios de los organismos probados en experimentos de laboratorio, en donde la productividad natural no interviene, por este motivo muchas de estas dietas presentan deficiencias en diversos nutrientes (Martínez-Córdova, 2009).

Las microalgas tienen un amplio mercado dentro de la acuicultura, gracias a su riqueza en diversos nutrientes y su capacidad de reducir compuestos nitrogenados y elevar la concentración de oxígeno. La importancia del cultivo de microalgas radica en su papel como productores primarios, son las primeras formadoras de materia orgánica y por su tamaño reducido y variado (5–50 μ en promedio) son de fácil captura y digestión por multitud de organismos que se alimentan en forma directa o indirecta del fitoplancton (Renuard *et al.*, 2002). Por otro lado, la producción de microalgas encuentra enormes dificultades para su expansión, ya que los sistemas de producción requieren grandes inversiones y ofrecen una gran inestabilidad. Estos factores son los que han limitado al cultivo de microalgas como una actividad productiva.

Las técnicas de cultivo de fitoplancton comprenden cultivos estáticos, semicontínuos y contínuos. La más utilizada en los laboratorios comerciales es la de cultivos estáticos escalonados, que consiste en iniciar con pequeños volúmenes, como tubos de ensayo o matraces, pasando a garrafones, columnas, hasta tinas y pilas. Los recipientes y volúmenes empleados son variables, y generalmente se utiliza el medio de cultivo F/2 de Guillard y Ryther (1962). El desarrollo y la multiplicación de las microalgas se da en relación a

diferentes factores fisicoquímicos como la calidad del inóculo, concentración de nutrientes, intensidad de luz, temperatura, pH, salinidad, entre otros (García-Lagunas, 2009).

Los nutrientes juegan un papel esencial en el cultivo de microalgas, en especial el nitrógeno, debido a que la microalga lo utiliza para llevar a cabo la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y enzimas. Diversos autores han encontrado que microalgas marinas pertenecientes a distintas clases taxonómicas pueden utilizar nitrato, nitrito, amonio o urea como únicas fuentes de nitrógeno y con tasas de crecimiento similares. No obstante Tadros y Johansen (1988) observaron también diferencias interespecíficas en la capacidad de utilizar diferentes fuentes de nitrógeno en diatomeas.

Una deficiencia de nitrógeno afecta a muchos de los factores fisiológicos, de las microalgas, la tasa de crecimiento disminuye al igual que la cantidad de proteína y cloroplastos, lo que nos indica una capacidad limitada para mantener las funciones fotosintéticas (Merzlyak y Chivkunova, 2007). Por otro lado, la modificación del medio de cultivo ha sido un método ampliamente utilizado para incrementar la producción de biomasa o variar su composición; la mayor parte de los estudios han utilizado la estrategia de la modificación cuantitativa en los nutrientes suministrados, o la relación entre ellos, como la razón N:P, en donde se han obtenido variaciones importantes en la productividad y composición bioquímica; con esto se encontró que el contenido y composición de ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos libres que componen a la microalga, también varían con las condiciones de nutrientes del medio (Fidalgo-Paredes, 1995).

Por otro lado, la salinidad es considerada como un factor ambiental de gran importancia; las sales inorgánicas disueltas en los ambientes acuáticos pueden afectar potencialmente el crecimiento y composición química del fitoplancton (García-Lagunas, 2009).

Las microalgas tienen un amplio rango de tolerancia a la salinidad, habitan en ambientes con cantidades milimolares hasta en ambientes saturados. Fuera del rango de tolerancia el desempeño biológico disminuye, ya que gastan gran cantidad de energía tratando de mantener el equilibrio osmótico (Martínez-Córdova, 2009).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo serán clave para obtener concentraciones específicas de salinidad y nutrientes en cultivos de *Thalassiosira weissflogii* además de tener una mayor diversidad de microalgas como alimento de organismos de interés comercial.

II. ANTECEDENTES

II.1. Importancia de las microalgas

La producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la II Guerra Mundial, para la producción de lípidos. Desde entonces el cultivo de microalgas se ha desarrollado, existiendo ya unas 40 especies de microalgas utilizadas comúnmente como alimento en acuicultura. Los cultivos comerciales de microalgas a gran escala, se empezaron a utilizar a principios de la década de los sesenta en Japón con cultivos de *Chlorella* sp.

Para su cultivo, las especies de microalgas se suelen seleccionar atendiendo fundamentalmente a su valor alimentario y su facilidad de cultivo, aunque también es importante el tamaño de la célula, el tipo o naturaleza de la pared celular y la propia composición química de la microalga, ya que debe de aportar los nutrientes necesarios para el correcto desarrollo del organismo al que se le este alimentando.

Con el rápido crecimiento de la acuicultura, el cultivo de microalgas alcanzó un mayor desarrollo, debido a que son el principal alimento de algunas especies comerciales como postlarvas de camarón, bivalvos y larvas de peces.

Actualmente, las microalgas se utilizan para diferentes fines, uno de ellos es en el tratamiento de efluentes, en donde trabajan en conjunto con las bacterias quienes realizan la degradación de la materia orgánica mientras que las microalgas utilizan los compuestos inorgánicos (Salazar-González, 2005). Las microalgas también son utilizadas como aditivos para nutrientes básicos, en colorantes tales como: la astaxantina y cantaxantina, los cuales son pigmentos que pueden fijarse en el músculo, mejorando así la calidad del producto y su precio en el mercado (Muller-Feuga, 2000).

II.2. Cultivo de microalgas

Son llamadas microalgas a una gran cantidad de especies que constituyen el fitoplancton. Su posición taxonómica ha sido de gran polémica entre botánicos y zoólogos, como ejemplo podemos mencionar el grupo de los dinoflagelados, conocidos por unos como microalgas y por otros como protozoarios (Torretera-Blanco y Tacon, 1989).

Las microalgas podrían ser la solución a algunos de los mayores problemas que atraviesa la civilización actual como la contaminación ambiental, obtención de biocombustibles, carencias alimenticias, entre otras. En temas ambientales las microalgas pueden utilizarse en la biorremediación de ecosistemas, como el tratamiento de aguas residuales urbanas y derrames de contaminantes (Ferrera-Cerrato y Rojas-Avelizapa, 2006). Además, estos organismos contribuyen a la fijación del CO₂, por lo que se podrían reducir las emisiones de dicho gas, que es responsable del efecto invernadero.

El uso comercial más importante de las microalgas hasta el momento, ha sido su empleo en los laboratorios de producción de postlarvas, como alimento de organismos filtradores y larvas de organismos de interés comercial. En la producción de larvas de camarón, la primera alimentación es a base de microalgas, ya que en el estadio de larva juvenil (zoea) se alimenta principalmente de planctón y en la etapa de larva adulta empieza a consumir zooplancton, como: rotífero, copépodos y *Artemia*, que son de origen animal, sin embargo en esta etapa se sigue alimentado de fitoplancton.

La producción de microalgas para la alimentación de las larvas de camarón en los laboratorios comerciales del noroeste de México está basada en un número reducido de especies (López-Elías *et al.*, 2004). Algunas de los géneros más utilizadas en la acuicultura son: *Phaeodactylum*, *Skeletonema*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Monochrysis* e *Isochrysis*.

II.3. Nutrientes

Los elementos que son esencialmente constituyentes de las microalgas son generalmente divididos en micro-nutrientes y macro-nutrientes de acuerdo a las cantidades requeridas para obtener el crecimiento óptimo. Los macro-nutrientes son necesarios para todas las clases de algas, y dentro de estos tenemos al carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y fósforo, también encontramos calcio, magnesio, sulfuro y potasio. Los micro-nutrientes son los requeridos por las microalgas en cantidades de mililitros por litro, en donde son utilizados como componentes esenciales de moléculas (Richmond, 1986).

II.3.1. Oxígeno: Se requiere para el metabolismo y la estructura de la microalga. Este elemento es constituyente de todos los compuestos orgánicos que conforman a estas células y es usualmente el elemento final de la oxidación biológica. El oxígeno es obtenido por las microalgas directamente de la atmósfera o disuelto en el agua. En las cianobacterias, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno dependen de las concentraciones del oxígeno (Richmond, 1986).

II.3.2. Hidrógeno: Fuente de electrones para la fotorreducción de CO_2 , el uso del hidrógeno molecular requiere de hidrogenasa, que cataliza las reacciones. En algunas clases de microalgas se ha encontrado que causa una fotorreducción y utilizan el hidrógeno para reducir sustratos como oxígeno y algunas coenzimas (Richmond, 1986).

II.3.3. Carbono: Es el principal constituyente de los organismos vivos, importante para el proceso de la fotosíntesis, se puede encontrar en diversas formas, ya sea libre (como carbono mineral), gases orgánicos, hidrocarburos, CO_2 atmosférico, ácido carbónico y carbono orgánico (Richmond, 1986). El crecimiento y las reacciones químicas y físicas de

las algas dependen del carbono, esto lo logran por diferentes reacciones, en donde disuelven al CO_2 en una de sus formas hidratadas para la síntesis de compuestos orgánicos. En el agua el CO_2 puede aparecer como: H_2CO_3 , HCO_3^- o HCO_3^{2-} esto depende del pH del medio. Generalmente el pH del océano que está en equilibrio con el CO_2 va de 8.0 a 8.5 en donde HCO_3^- es la mayor fuente de carbono (Richmond, 1986).

Los procesos de nutrición con carbono orgánico varían mucho en las microalgas, ya que los factores ambientales afectan estos procesos, el más importante es la iluminación ya que afecta directamente al proceso de la fotosíntesis. Se ha observado que *Chlorella* y *Scenedesmus* (especies de microalgas muy usadas para la producción de biomasa) están en el punto medio de ser autótrofos y heterótrofos, en el sentido que pueden cambiar rápida y sencillamente de crecer en la oscuridad y hacer uso de sustratos orgánicos a crecer con luz usando el CO_2 . Lo que trae consecuencias en el crecimiento al cambiar las fuentes de carbono y las intensidades de luz utilizadas en laboratorios de producción de microalgas.

Algunos compuestos orgánicos usados como fuentes de carbono son: sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, piruvato, succinato, fumarato, malato, etanol, acetato, alanina, aspartato y glutamina.

II.3.4. Nitrógeno: Después del carbono, este elemento es cualitativamente el más importante que constituye a la materia seca de las microalgas, va del 1 al 10%. El nitrógeno es uno de los principales constituyentes de proteínas, aminoácidos, amino azúcares y otros elementos orgánicos indispensables.

No todas las cianobacterias pueden fijar al N_2 , sin embargo, para que la fijación se pueda llevar a cabo, los niveles de oxígeno en el exterior deben de ser bajos. La habilidad de poder usar al nitrógeno gaseoso está confinada solamente para los procariotas, y la

habilidad de usar nitrato, nitrito o amonio parece ser solamente de las algas y algunas bacterias, sin embargo se han encontrado algunas cianobacterias que pueden hacer uso del N_2 gaseoso (Richmond, 1986).

El nitrito puede ser utilizado como una fuente de nitrógeno, solo en pequeñas cantidades, aproximadamente 1mM, en donde concentraciones más altas pueden inhibir el crecimiento. Las algas tienen una buena capacidad para captar el nitrógeno de varias fuentes, en general, las aminas, urea, glutamina y asparagina son buenas fuentes de nitrógeno, sin embargo también podemos encontrar muchos aminoácidos como glicina, serina, alanina, ácido glutámico y ácido aspártico.

La fijación del nitrógeno tiene lugar por la reducción del N_2 a NH_4^+ , por una reacción catalizada por la enzima nitrogenasa. Para la síntesis del nitrógeno existen diferentes procesos, el uso de estos depende de la fuente de nitrógeno que se esté utilizando y varía mucho entre cada una de ellas. Por otro lado, el peso seco celular varía tanto en función de la fuente de N como de la fase de crecimiento, aunque no se pueden establecer patrones comunes para las diferentes especies (Fidalgo-Paredes, 1995).

II.3.5. Fósforo: Este elemento juega un papel muy importante en la transferencia de energía y en la síntesis de los ácidos nucleicos; es uno de los elementos mayores, que componen a las microalgas, sin embargo, en la naturaleza es un elemento limitante. Las cantidades de fosfato orgánico son mayores en aguas oceánicas que el inorgánico, siendo éste el más requerido y mejor aprovechado por las microalgas, lo podemos encontrar en las formas de: $H_2PO_4 + HPO_4$.

Los requerimientos de fósforo para el crecimiento óptimo difieren de especie a especie. La captación de fósforo en el medio natural es generalmente estimada por la luz. El

fosfato en las células es canalizado a compuestos orgánicos e inorgánicos de fósforo, esto lo logran por medio de tres diferentes procesos que son: nivel de fosforilación del sustrato, fosforilación oxidativa y foto-fosforilación (Richmond, 1986).

II.3.6. Metales: se encuentran entre los micronutrientes requeridos por las microalgas, en el rango de micro a miligramos por 1000 mL de medio (Richmond, 1986). Sin embargo son importantes porque ayudan a que se complete el ciclo normal de vida y las consecuencias de una deficiencia pueden revertirse. Los más importantes son:

Magnesio: importante para la agregación de los ribosomas a las unidades funcionales, la función del Mg está en las reacciones de transferencia de alta energía de los grupos fosfatos y además, forma parte de la clorofila.

Hierro: está involucrado en la asimilación del nitrógeno, es importante también en la fotosíntesis, ya que afecta la síntesis de la clorofila, además forma parte de proteínas.

Boro: es un metaloide importante para el mantenimiento de la membrana celular, usado por las cianobacterias y diatomeas, pero no por las algas verdes.

Manganeso y Cobre: son componentes esenciales del sistema de transporte de electrones fotosintéticos y son requeridas por todas las algas para el crecimiento fotosintético.

Zinc: es formador de estructura, son necesarios en pequeñas cantidades, se debe de tener especial cuidado, ya que pueden ser tóxicos.

Molibdeno y Vanadio: estos elementos están relacionados con las funciones del nitrógeno.

Silicio: es el mayor componente de la pared celular de las diatomeas.

Selenio: antioxidante que protege a la célula de radicales libres. Una deficiencia de selenio causa un crecimiento pobre y en altas cantidades causa toxicidad.

II.3.7. Vitaminas: Los requerimientos nutricionales de las microalgas son muy similares a los de las plantas mayores, excepto que las algas las requieren para la mayor expresión de su crecimiento. En varios estudios realizados se encontró que no todas las algas requieren de vitaminas, sin embargo, las algas verdes y también las diatomeas no requieren vitaminas, si son crecidas en medios de cultivo con una fuente inorgánica (Richmond, 1986). Recientemente se ha descubierto que numerosas especies de algas son conocidas por ser auxotróficas lo que significa que solo crecerán en medios con una sustancia específica, sin embargo estos tipos son inusuales.

Las vitaminas B₁₂ (cobalamina) y B₁ (tiamina) son algunas veces requeridas solas o en combinación por las algas auxotróficas, sin embargo, la vitamina B₁₂ es más requerida que la tiamina. Por otro lado se ha encontrado que en las crisomonas y dinoflagelados la vitamina necesaria es la biotina o vitamina B.

II.4. Medios de cultivo

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas, estos van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales, que permitan resultados constantes comparado con los resultados tan variables que brinda el uso del agua de mar natural, ya que depende del lugar donde se colecta y el tiempo de almacenamiento de la misma (Torretera-Blanco, 1989).

Los medios artificiales para el cultivo de microalgas, han mostrado buenos resultados, las principales fórmulas utilizadas van desde el agua de Miguel, que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de End-Schereiber (1934), hasta fórmulas específicas para cada familia como la fórmula del Laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas (Matthiesen y Thoner, 1996; Guillard, 1973).

Las microalgas se desarrollan y multiplican en relación de las condiciones fisicoquímicas del medio, por lo tanto las condiciones de combinación de los requerimientos debe de ser contemplada para cada especie, los macronutrientes o factores limitantes del crecimiento son el carbono, nitrógeno, fósforo, silicio, magnesio, potasio y calcio, que se requieren en cantidades relativamente grandes, mientras que los llamados micronutrientes: fierro, manganeso, cobre, zinc, sodio, molibdeno, cloro y cobalto, se necesitan en menores cantidades.

Hay muchos otros medios de origen comercial que incluyen sustancias orgánicas como vitaminas y aminoácidos que son necesarias para ciertos tipos de microalgas conocidas como auxotróficas, es decir que no sintetizan por medio de la fotosíntesis este tipo de compuestos y como consecuencia se producen factores que pueden limitar su crecimiento; tal es el caso de *Platymonas*, *Chrysophytas* y algunas *Bacillariophyceas* (Torrentera-Blanco, 1989). El manejo de la productividad natural en los estanques, continuará siendo un asunto de fundamental importancia, aun cuando se fabriquen y formulen alimentos cada vez mejores (Martínez-Córdova, 2009).

Algunos nutrientes pueden ser escasos en el medio de cultivo, siendo entonces necesaria la fertilización, con el fin de estimular el desarrollo de las microalgas. La fertilización provee de nutrientes necesarios para el desarrollo a los productores primarios, entre los nutrientes tenemos al nitrógeno en sus diferentes formas, el fósforo (principalmente como ortofosfatos), el potasio y silicio (como metasilicato de sodio). El tipo de microalga que se desarrollará depende en gran medida de la relación C:N, si esta porción esta desbalanceada hacia el nitrógeno, por ejemplo, es probable que se desarrollen mayormente cianofitas. En la fertilización no existen recetas que funcionen universalmente

para todas las situaciones, por lo que su eficacia se verá reflejada en el ajuste a las condiciones del cultivo.

La fertilización para el medio puede llevarse a cabo mediante fertilizantes orgánicos o fertilizantes inorgánicos, y cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas (Tabla I).

Tabla I. Ventajas y desventajas de la fertilización orgánica e inorgánica (Martínez-Córdova, 2009).

Tipo de fertilizante	Ventajas	Desventajas
Orgánicos	Bajo costo Contiene macros y micro nutrientes	Disponibilidad variable Composición variable Posibles contaminantes Eutrofización
Inorgánicos	Disponibilidad constante Composición constante Facilidad para ajustar los niveles de cada nutriente Sin contaminantes	Alto costo Dificultad de distribución homogénea

Leal *et al.*, (2003) hicieron uso de zeolitas artificiales y naturales como un fertilizante, para evaluar el crecimiento de *Chaetoceros* y *Tetraselmis*, en donde encontraron que la producción celular aumenta hasta un 30% más, ésto por los aportes de sílice como un nutriente necesario para este tipo de microalgas. Así mismo se han probado una gran variedad de fertilizantes comerciales, como el Nutrilake, y orgánicos, como cualquier tipo de excreta.

II.5. Tipos de cultivo

Cultivo estático: Aquí se lleva el desarrollo hasta fase de crecimiento exponencial, generalmente se usa para bioensayos o transferencia a volúmenes mayores (Fig. 1).

Cultivo continuo: Cuando se requiere de grandes cantidades de células a intervalos frecuentes para alimentar especies en cultivo (peces, crustáceos, moluscos), los cultivos semicontínuos o continuos proveen un gran número con mayor consistencia en forma uniforme y constante. Para esto hay que determinar la concentración óptima de los nutrientes por unidad de tiempo en relación a la tasa de dilución o cosecha del cultivo (Fig. 2) (Torretera-Blanco y Tacon, 1989).

Cultivo masivo: Estos son los que se utilizan como alimento vivo de peces crustáceos y moluscos y cuya producción es a gran escala en tanques u otros recipientes de volumen no controlado. Se pueden utilizar tanques de plástico, madera, concreto, así como la utilización de fertilizantes minerales de tipo agrícola hasta una gran variedad de excretas de ganado como fuentes de nutrientes. Se puede utilizar la luz natural como la artificial y se debe de llevar un control de la temperatura (Figs. 3 y 4).

II.6. Salinidad

Las variaciones en los factores como la iluminación, temperatura, salinidad y diversos nutrientes están asociados con la composición de las microalgas (Redha y Hassan, 1990). Las plantas celulares son sistemas hidráulicos que conducen reacciones químicas en un medio acuático. Las células son separadas del ambiente por la membrana que es ligeramente permeable al agua e impermeable a solutos (Richmond, 1986).

La salinidad es la variable más importante relacionada con el equilibrio osmótico que debe de existir entre los fluidos del organismo y el medio (Martínez-Córdova, 2009);

como todos los organismos, las microalgas poseen un rango de tolerancia para cada uno de los factores y en general, se ha encontrado que las microalgas empleadas en la acuicultura tienen un buen crecimiento en salinidades iguales a las del mar. Al someterse a salinidades fuera de su rango de tolerancia las microalgas marinas responden por medio de la presión osmótica, en donde pueden llegar a producir compuestos orgánicos osmoprotectores de bajo peso molecular, como el glicerol, azúcares simples y aminoácidos libres; además pueden regular la cantidad de iones intracelulares como lo son el Na, K y Cl (Richmond, 1986). García-Lagunas (2009), encontró que especies como la diatomea *Thalassiosira weissflogii*, que se utiliza en los últimos estadios larvarios de camarones peneidos, tiene producciones inconsistentes y de calidad nutricional variable, esto es afectado por factores diversos como la temperatura, la iluminación, el pH y la salinidad.

Al verse afectados por la salinidad las microalgas modifican también el aprovechamiento de los nutrientes; se ha encontrado también que el consumo del nitrógeno se ve afectado. Una disminución en la salinidad causa inhibición de la fotosíntesis, respiración nocturna y un bajo crecimiento. Sin embargo, en un trabajo realizado por Renaud y Perry (1994) con las microalgas *Isochrysis* sp. *Nannochloropsis* sp. y *Nitzschia* sp., sometidas a diferentes salinidades en un rango de 10-30, se encontró una modificación en la composición de ácidos grasos, mientras que el crecimiento no se vio afectado. Por otro lado el contenido de cenizas aumentó con el aumento de la salinidad.

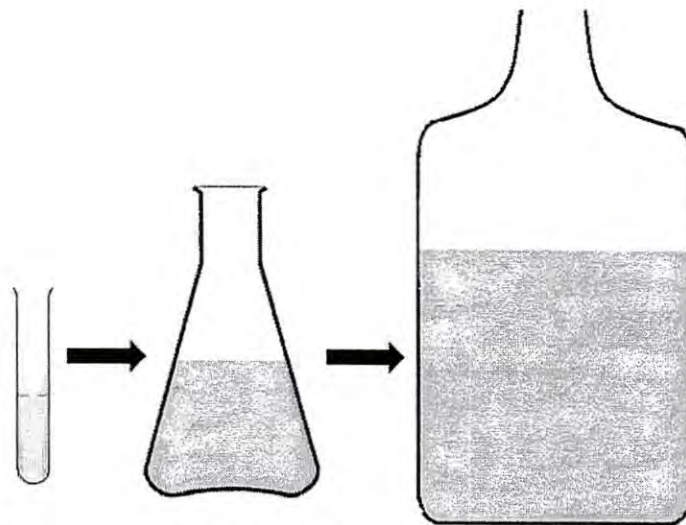


Figura 1. Cultivo estático a nivel de tubo de ensayo, matraz y garrafón (Torrentera-Blanco y Tacon, 1989).

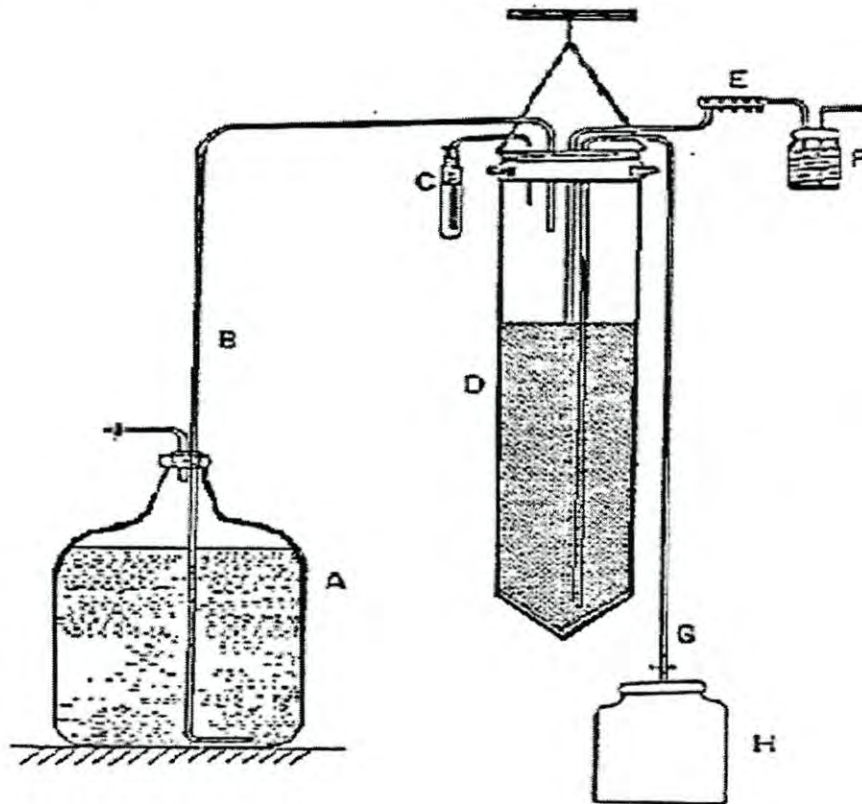


Figura 2. Cultivo continuo a nivel de bolsa de 100 L de capacidad. A) Reserva de medio de cultivo (20 L); B) Sifón para el medio de cultivo; C) Escape de aire; D) Recipiente de cultivo (bolsa de plástico); E) Dosificador de aire; F) Filtro de aire; G) Sifón de cosecha; H) Recipiente de cosecha (Torrentera-Blanco y Tacon, 1989).

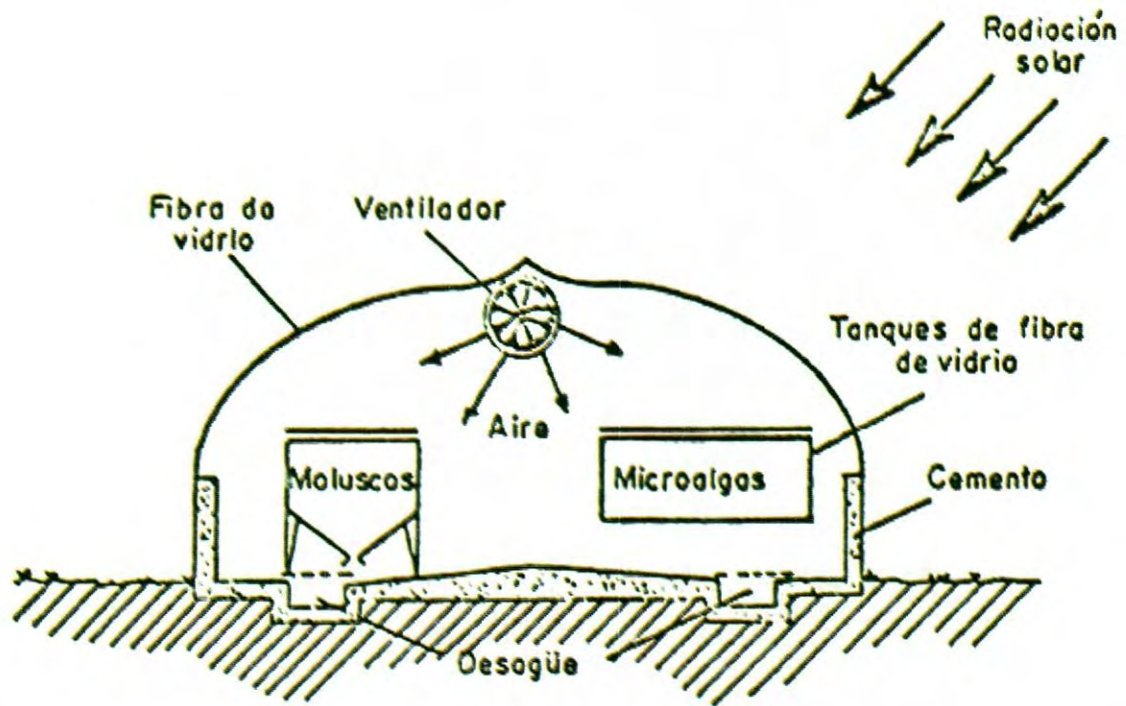


Figura 3. Cultivo masivo de microalgas en invernadero (Torrentera-Blanco y Tacon, 1989).



Figura 4. Cultivo masivo al exterior de *Chaetoceros* sp. en laboratorio comercial de Bahía Kino, Sonora.

Los cambios en las concentraciones de salinidad en el medio natural, pueden deberse a cambios en las corrientes de agua y a la evaporación. Con esto las microalgas responden con la osmorregulación, para poder eliminar a los solutos que se encuentran en el medio, la síntesis de los solutos se da en la membrana plasmática. La osmorregulación es utilizada a nivel comercial para obtener compuestos orgánicos específicos de importancia.

La sobrevivencia de una microalga en un medio de alta salinidad requiere más gasto de energía, para poder llevar a cabo una eficiente síntesis osmótica orgánica y un adecuado mantenimiento en el balance de los iones entre el medio y el citoplasma.

Las algas que soportan salinidades más altas tienen cloroplastos de mayor tamaño que les permite absorber cantidades mayores de luz, por lo que este tipo de microalgas crecen mejor al ser expuestas a intensidades luminosas más altas para llevar a cabo la fotosíntesis más eficientemente. Ésto también las hace necesitar de concentraciones mayores de bicarbonato para poder fijar al CO_2 (Richmond, 1986).

En el caso de *Dunaliella parva* y otras especies de *Dunaliella* el glicerol es el principal y más frecuente compuesto orgánico producto de la osmorregulación, entre más alta es la concentración de sal en el medio, más alta es la concentración de glicerol en la célula (Richmond, 1986).

Es por ello, que esta investigación evalúa una especie de diatomea marina (*Thalassiosira weissflogii*) que ha sido empleada en la acuicultura con resultados favorables en los cultivos larvarios de camarones peneidos, bajo concentraciones de cultivo estándar, en los que se emplean medios enriquecidos convencionales como el medio F/2, sin embargo esto representa mayores costos de inversión.

Actualmente se realizan cultivos masivos de microalgas en agua de mar, sin llevar a cabo un análisis de la salinidad relacionada al desarrollo de la microalga.

En el DICTUS se ha trabajado con diferentes concentraciones de salinidad respecto al crecimiento y calidad nutricia de algunas especies de microalgas, encontrando que generalmente a salinidades superiores o iguales a 35 se obtienen los crecimientos más altos al igual que cantidades más altas de proteína, carbohidratos y lípidos; mientras que a salinidades de 50 o superiores se tienen crecimientos pobres.

III. HIPÓTESIS

Los crecimientos celulares mayores se obtendrán en los cultivos a salinidades bajas en el medio control en comparación con los cultivos limitantes en nitrógeno y las biomásas mayores se encontraran en los cultivos crecidos a las salinidades mayores en el medio control.

IV. OBJETIVO

Evaluación del crecimiento y desarrollo de la microalga *Thalassiosira weissflogii* en diferentes salinidades y con deficiencias de nitrógeno.

IV.1. Objetivos particulares

1. Estimar el crecimiento celular de los cultivos estáticos de *T. weissflogii* crecida a las salinidades de 25, 35, 45 y 55 en el medio control (F/2) y los medios limitantes en nitrógeno (F/4 y F/8).
2. Evaluar las velocidades de crecimiento en cultivos estáticos de *T. weissflogii* crecidos a 4 salinidades y 3 medios de cultivo.
3. Cuantificar la biomasa seca producida en cultivos de *T. weissflogii* crecida a 4 salinidades y 3 medios de cultivo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Especie de microalga

Thalassiosira weissflogii (Fig. 5), se obtuvo de la colección de microalgas del cepario del DICTUS de la Universidad de Sonora.

La especie *Thalassiosira weissflogii* es de las más recomendadas por los acuicultores de muchos géneros de microalgas utilizadas en la acuicultura (Boeing, 2004), ésto es por su excelente composición de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), que muchas de las especies marinas no pueden sintetizar como los linoleicos.

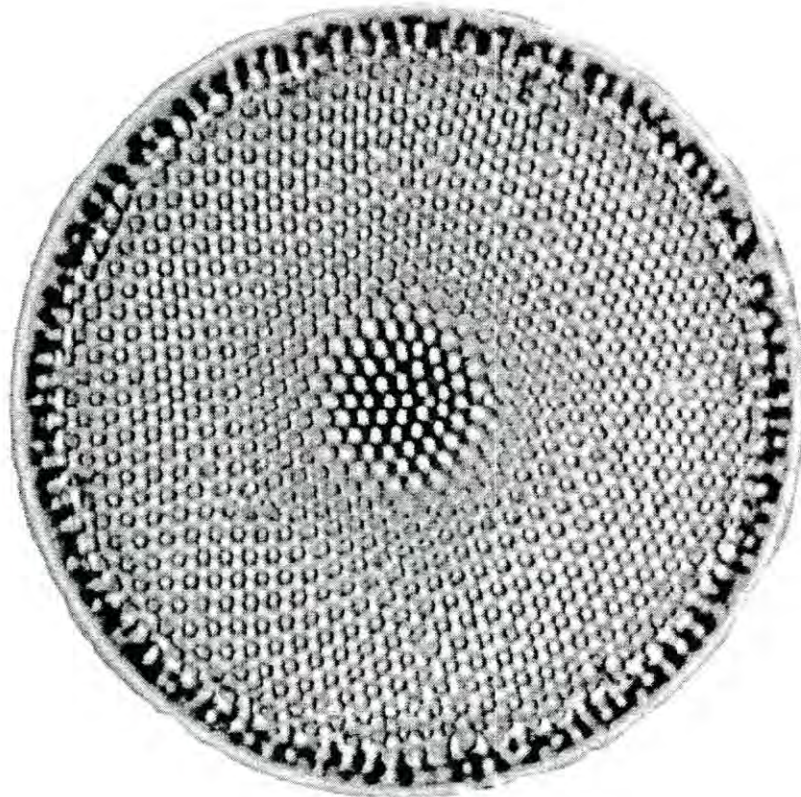


Figura 5. *Thalassiosira weissflogii*, diatomea cilíndrica con un tamaño aproximado de 15-20 μm .

V.2. Medios de cultivo y aclimatación

Las salinidades se prepararon diluyendo agua de mar con una salinidad inicial de 40 y agua destilada. Para obtener salinidades de 25 y 35 se diluyó con el agua destilada y para poder concentrar las salinidades de 45 y 55 se evaporó el agua de mar. Posteriormente se prepararon los medios de cultivo, utilizando el medio F/2 de Guillard y Ryther (1962) como medio control y como base para el medio F/4 y F/8 (Tabla II).

Las cepas se obtuvieron del cepario del DICTUS en la Universidad de Sonora (UNISON) de donde se tomaron 5 mL de cepa, y se colocaron en un tubo de ensaye de 15 mL con un volumen con 10 mL del medio de cultivo y la salinidad respectiva, ésto con el fin de aclimatar a la microalga, cuando se llegó a una concentración adecuada se llevó el cultivo a matraces de 250 mL (con el medio y salinidad respectiva para cada experimento) para obtener mayores concentraciones celulares y sembrar 50,000 cel/mL en cada experimento.

V.3. Diseño del experimento

El experimental fue un factorial de 4 x 3, que se llevó a cabo en cultivos estáticos con matraces erlernmeyer de 250 mL, con un volumen de 150 mL del medio, cada uno por cuatriplicado, en donde fueron evaluadas cuatro salinidades: 25, 35, 45 y 55 y tres medios de cultivo; los medios cultivo F/2, F/4 y F/8 fueron preparados con 1 mL, 0.5 mL y 0.25 mL de NaNO_3 como fuente de nitrógeno respectivamente, tomando como base al medio F/2 como control (Tabla II).

Cada tratamiento se mantuvo a temperatura y luz constante con monitoreos cada 12 horas durante 7 días (Fig. 6), en cada monitoreo se tomaba una muestra de 3 mL para contabilizar el número de células por mililitro y el pH.

Tabla II. Medio de cultivo patrón para preparar el medio F/2 (Voltolina, 1989). Nota.- El medio F/4 se preparó modificando la fuente de N con 37.5 g/L de NaNO₃ y el medio F/8 con 18.75 g/L de NaNO₃.

Soluciones madre para el medio F/2

Nutrientes mayores	g/L de agua destilada
Nitrato de sodio, granulado y refinado	75
Fosfato de sodio monobásico	5
Silicato de sodio metasoluble	30
Metales traza	g/100 mL de agua destilada
Sulfato cúprico, cristales refinados	0.98
Sulfato de zinc, cristales finos	2.2
Cloruro de cobalto, cristales finos	1.0
Cloruro de manganeso, cristales finos	18.0
Molibdato de sodio, cristales finos	0.63
Solución secundaria	g/100 mL de agua destilada
Cloruro férrico	3.15
EDTA disódico	4.36
Metales traza o alternativamente	1 mL de c/u de las soluciones
EDTA férrico	5.00
Metales traza	1 mL de c/u de las soluciones
Vitaminas	g/1000 mL de agua destilada
Biotina cristalizada	0.1
Cianocobalamina	1.0
Solución secundaria	100 mL de agua destilada
Biotina	1 mL de solución
Cianocobalamina (B ₁₂)	1 mL de solución
Tiamina clorhídrica (B ₁)	20 mg

El inóculo inicial fue de 50,000 células por mililitro, con la excepción de la salinidad de 55 para los medios F/4 y F/8 en donde el inóculo inicial fue de 9,000 cél/mL para el F/4 y 3,500 cél/mL para el F/8.

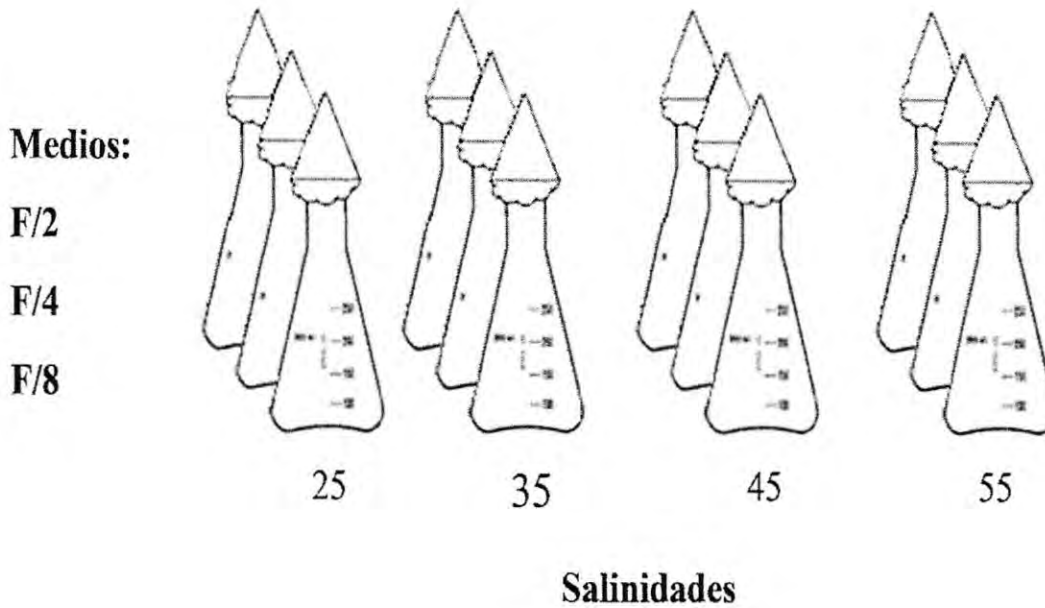


Fig. 6. Diseño experimental en los cuatro tratamientos de salinidad (25, 35, 45 y 55) en cada uno de los medios F (F/2, F/4 y F/8).

V.4. Medición de la concentración celular

Los conteos se realizaron tomando 3 mL de cada uno de los medios, se fijaron con lugol, para después ser observados y contados en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, con la ayuda de un microscopio óptico. La fórmula para obtener la concentración celular cél/mL es la siguiente:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Número de cuadros contados}} \times 10,000$$

V.5. Variables fisicoquímicas

Temperatura: Se mantuvo constante a 23 °C y fue medida con un termómetro de mercurio convencional de 0 a 60 °C

Potencial de hidrógeno (pH): El pH se midió con la ayuda de un potenciómetro portátil cada 24 horas, previa calibración con buffer de 7 y 10.

V.6. Determinación de peso seco, ceniza y materia orgánica

Se utilizaron filtros Whatman GF/C de 47 mm de diámetro, lavados con agua destilada, secados en la estufa por 24 horas y quemados en la mufla a 480°C por 2 horas, para estimar el peso de cada uno de los filtros. Se filtraron 50 mL de cada una de las muestras con la bomba de vacío, lavando con formiato de amonio. Para determinar el peso seco se secaron los filtros en la estufa a 80 °C por 8 horas y se pesaron, para obtener cenizas se incineró en la mufla a 480°C por 6 horas y la materia orgánica se obtuvo por diferencia de peso seco y ceniza (López-Elías y *et al.*, 2003).

V.7. Determinación de pico-gramos célula peso seco, ceniza y materia orgánica

El manejo de la información en base a Pcg/célula peso seco, ceniza y materia orgánica fue obtenido con respecto a los datos generados de la biomasa en relación al número de células registrados el mismo día del muestreo.

V.8. Tratamiento estadístico

Las curvas de crecimiento fueron conformadas con los datos promedio y desviación estándar de los conteos celulares registrados cada 12 horas.

La comparación entre salinidades y medios se realizó utilizando un análisis de varianza de dos vías y la prueba *a posteriori* de Tukey (Wayne, 2006).

VI. RESULTADOS

VI.1. Valores de pH a cuatro salinidades en tres medios de cultivo

Los valores iniciales de pH en el medio F/2 a las cuatro salinidades fueron entre 8.1 y 8.6, aumentando lentamente hasta el día 2. El día 3 se observaron los valores promedios más altos, que fluctuaron entre 8.5 y 9.0 (Fig. 7a). Este pH se mantuvo hasta el 5to. día y posteriormente disminuyó a valores entre 8.0 y 8.5.

En el medio F/4 se observaron valores similares para las salinidades de 25 y 35, éstas se mantuvieron en rangos de entre 8.8 en el primer día y 10.4 al tercer día (Fig. 7b). En la salinidad de 45 se mantuvo entre 8.4 y 9.5, y los valores menores de pH se registraron en la salinidad de 55 que fue de 7.0 el día 1 y de 8.4 el día 6.

En el medio F/8 las salinidades de 25, 35 y 45 mostraron valores de pH similares que se mantuvieron entre 8.5 y 10.0 (Fig. 7c), los niveles más altos se registraron en el día 3 en la salinidad de 25, mientras que los niveles más bajos de pH fueron en la salinidad de 55 en donde alcanzó valores de 6.9 a 8.5.

VI.2. Curvas de crecimiento

En el medio F/2 (Fig. 8a) se encontró el mayor crecimiento en la salinidad de 25 en la que se registró una concentración celular de 600,000 cél/mL, sin embargo, en la salinidad de 35 se mantuvieron concentraciones altas, hasta alcanzar las 500,000 cél/mL; mientras que las salinidades de 45 y 55 llegaron a concentraciones celulares muy bajas, de entre 200,000 y 300,000 cél/mL, respectivamente. En el medio F/4 (Fig. 8b) a las salinidades de 25 y 35 se tuvieron concentraciones celulares mayores, llegando a las 600.000 cél/mL. En la salinidad de 45 se tuvo un crecimiento final de 290,000 cél/mL, mientras que la salinidad

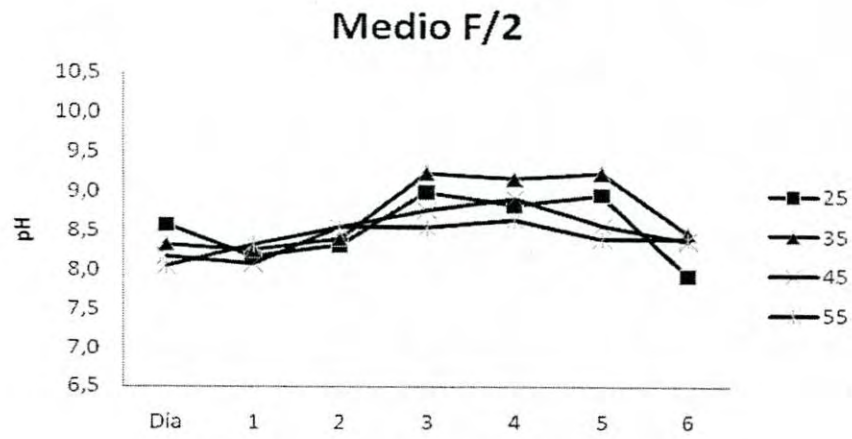
de 55 solo llegó a las 14,600 cél/mL. Las concentraciones celulares en el medio F/8 para las salinidades de 25 y 35 llegaron a 600,000 y 500,000 cél/mL respectivamente (Fig. 8c), mientras que en la salinidad de 45 se registró una concentración de 300,000 cél/mL. Por otro lado, la salinidad de 55 no creció satisfactoriamente, ya que no se presentó crecimiento celular e inclusive al final, la concentración celular disminuyó hasta 1,875 cél/mL.

VI.3. Comparación del crecimiento máximo, tasa de crecimiento acumulada y crecimiento promedio

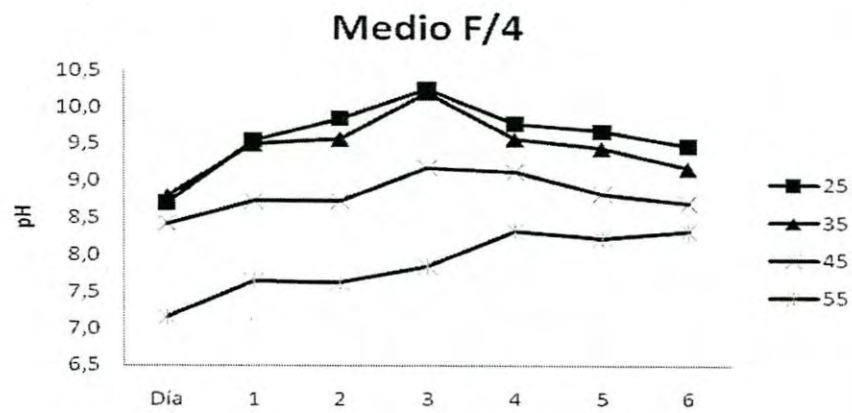
En cuanto a la tasa de crecimiento máximo se presentaron diferencias significativas por salinidad y en los medios de cultivo ($F_{\text{medios cultivo}} = 10.19, p < 0.001$; $F_{\text{salinidad}} = 391.52, p < 0.0001$). Los crecimientos máximos fueron mayores a las dos salinidades más bajas (25 y 35) en comparación con las dos salinidades mayores, con valores entre 460,000 y 571,000 cél/mL (Tabla III).

Los mayores valores se registraron en el medio F/4 con la salinidad de 35, seguida por la salinidad de 25 de este mismo medio. La salinidad de 55 en los medios F/4 y F/8 presentaron los valores de crecimiento menores (Tabla III). En lo referente a las tasas de crecimiento acumulada y promedio se presentaron diferencias estadísticas tanto por medio de cultivo ($F_{\mu \text{ acumulada}} = 623.66, p < 0.001$; $F_{\mu \text{ promedio}} = 623.66, p < 0.001$) como salinidad ($F_{\mu \text{ acumulada}} = 2262.46, p < 0.001$; $F_{\mu \text{ promedio}} = 2262.46, p < 0.001$), en donde la salinidad de 55 en los medios F/4 y F/8 mostraron las diferencias más significativas.

a)



b)



c)

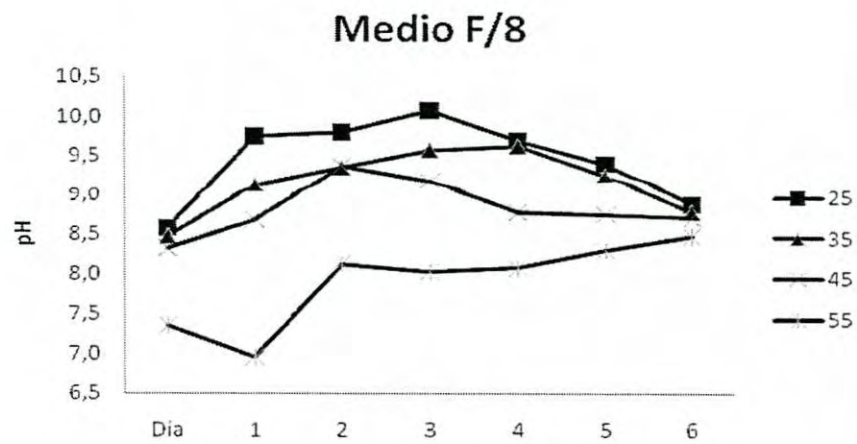
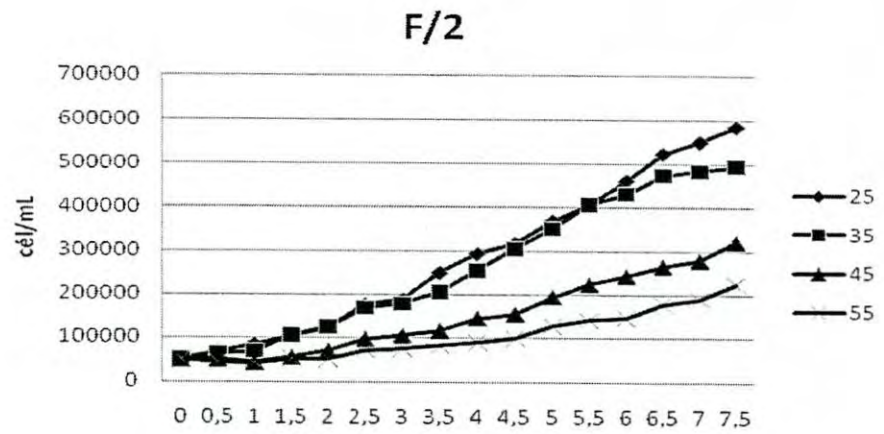
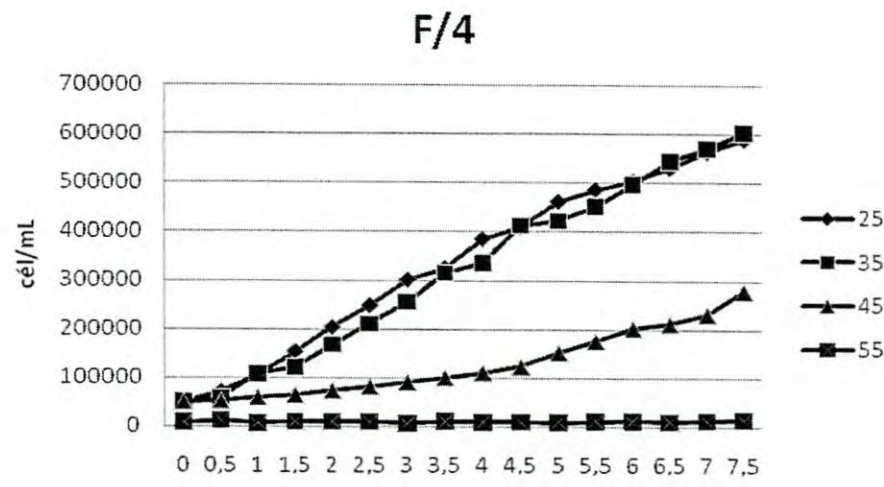


Figura 7. Valores diarios del pH a las cuatro salinidades (25, 35, 45 y 55) de los cultivos de *Thalassiosira weissflogii* en los medios de cultivo F/2 (a), F/4 (b) y F/8 (c).

a)



b)



c)

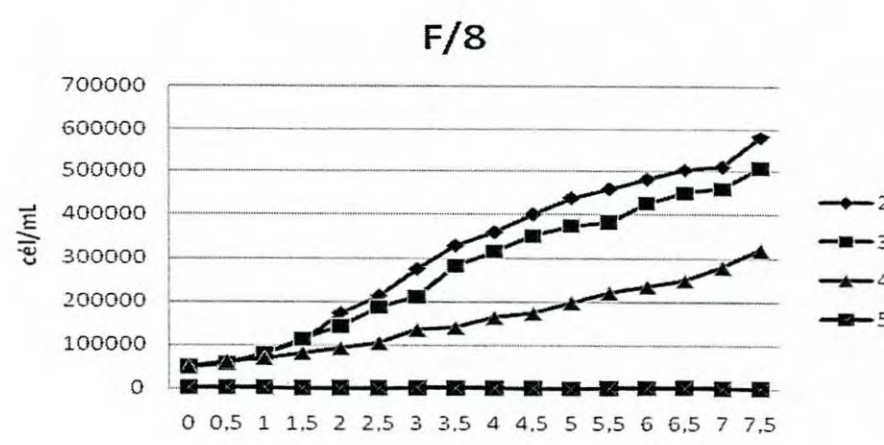


Figura 8. Valores diarios de la concentración de cél/mL, en las cuatro salinidades (25, 35, 45 y 55) de los cultivos de *Thalassiosira weissflogii* en los medios de cultivo F/2 (a), F/4 (b) y F/8 (c).

VI.4. Producción de biomasa

VI.4.1. Peso seco

En el medio control el valor más alto fue en la salinidad de 25 que fue de 0.232 g/L (Fig. 9) La mayor cantidad de biomasa en base a peso seco obtenida, fue de 0.268 g/L en la salinidad de 35 en el medio F/4 (Fig. 10) y en el medio F/8 los valores de peso seco fueron muy similares en todas las salinidades, éstos se mantuvieron entre 0.230 y 0.250 g/L (Fig. 11).

VI.4.2. Materia orgánica

Los contenidos de materia orgánica fueron relativamente mayores en las salinidades bajas (25 y 35) que en las salinidades altas (45 y 55). El valor más alto fue de 0.140 g/L en la salinidad de 35 en el medio F/4, y el valor más bajo se encontró en el medio F/4 (0.040 g/L) seguido por el F/8, ambos en la salinidad de 55 (Fig. 10).

VI.4.3. Ceniza

Las cantidades mayores de ceniza se encontraron en el medio F/8, siendo la cantidad de 0.164 g/L en la salinidad de 55 el más alto (Fig. 11), mientras que en el medio control (F/2), se presentó las cantidades más bajas y similares entre las salinidades, en donde se mantuvieron entre 0.095 y 0.110 g/L.

Tabla III. Valores promedio y desviación estándar (entre paréntesis) del crecimiento máximo (No. cél /mL), tasa de crecimiento acumulada (Divisiones) y promedio (Divisiones/día) en las cuatro salinidades (25, 35, 45 y 55) en los tres medios de cultivo (F/2, F/4 y F/8). Nota: Los subíndices indican diferencias estadísticas ($\alpha=0.05$), en donde cada letra es un grupo sin diferencias estadísticas y dos letras diferentes nos indican similitudes de los dos grupos.

Medio	Salinidad	Crecimiento máximo (No. cél /mL)	μ acumulada (Divisiones)	μ promedio (Divisiones/día)
F/2	25	551,250 ^{cd} (18.0)	3.46 ^c (0.05)	0.49 ^e (0.01)
F/2	35	484.668 ^{cd} (63.8)	3.27 ^c (0.19)	0.47 ^e (0.03)
F/2	45	278.750 ^b (47.90)	2.46 ^c (0.23)	0.35 ^d (0.03)
F/2	55	189.375 ^b (40.70)	1.90 ^c (0.29)	0.27 ^c (0.04)
F/4	25	563.438 ^d (56.33)	3.49 ^c (0.15)	0.50 ^e (0.02)
F/4	35	571.250 ^d (25.06)	3.51 ^c (0.06)	0.50 ^e (0.01)
F/4	45	321.563 ^b (28.62)	2.20 ^c (0.19)	0.31 ^d (0.03)
F/4	55	12.813 ^a (2.77)	-16.27 ^b (1.45)	-2.32 ^b (0.21)
F/8	25	510.938 ^{cd} (19.48)	3.35 ^c (0.06)	0.48 ^e (0.01)
F/8	35	460.625 ^c (25.66)	3.20 ^c (0.08)	0.46 ^e (0.01)
F/8	45	280.625 ^b (56.88)	2.47 ^c (0.29)	0.35 ^d (0.04)
F/8	55	2.188 ^a (1.19)	-32.38 ^a (1.70)	-4.63 ^a (0.24)

VI.5 Comparación de Pcg/cél peso seco, Pcg/cél ceniza y Pcg/cél materia orgánica

Los valores de Pcg/cél peso seco ($F_{\text{medios cultivo}} = 112.76$, $p < 0.001$; $F_{\text{salinidad}} = 9.58$ $p < 0.0001$) muestran un aumento conforme la salinidad sube, en donde se encontraron valores de 400 Pcg/cél en la salinidades de 25 hasta llegar a los 800 Pcg/cél en la salinidad de 55 en el medio F/2, mientras que esta misma salinidad en los medios F/4 y F/8 llegó a valores muy altos, de hasta 130,000 Pcg/cél (Tabla IV).

Las cantidades de Pcg/cél de cenizas ($F_{\text{medios cultivo}} = 11.20$, $p < 0.001$; $F_{\text{salinidad}} = 8.33$, $p < 0.0001$) y materia orgánica ($F_{\text{medios cultivo}} = 14.15$, $p < 0.001$; $F_{\text{salinidad}} = 10.88$, $p < 0.0001$) se mantuvieron muy similares, siendo los valores más bajos de ambos de 200 Pcg/cél en las salinidad de 25 en los tres medios de cultivo hasta llegar a los 400 Pcg/cél a la salinidad de 55 en el medio control, mientras que a esta misma salinidad en los medios con deficiencias de nitrógeno, mostraron valores por arriba de los 9,000 Pcg/cél de ceniza y 3,000 Pcg/cél de materia orgánica.

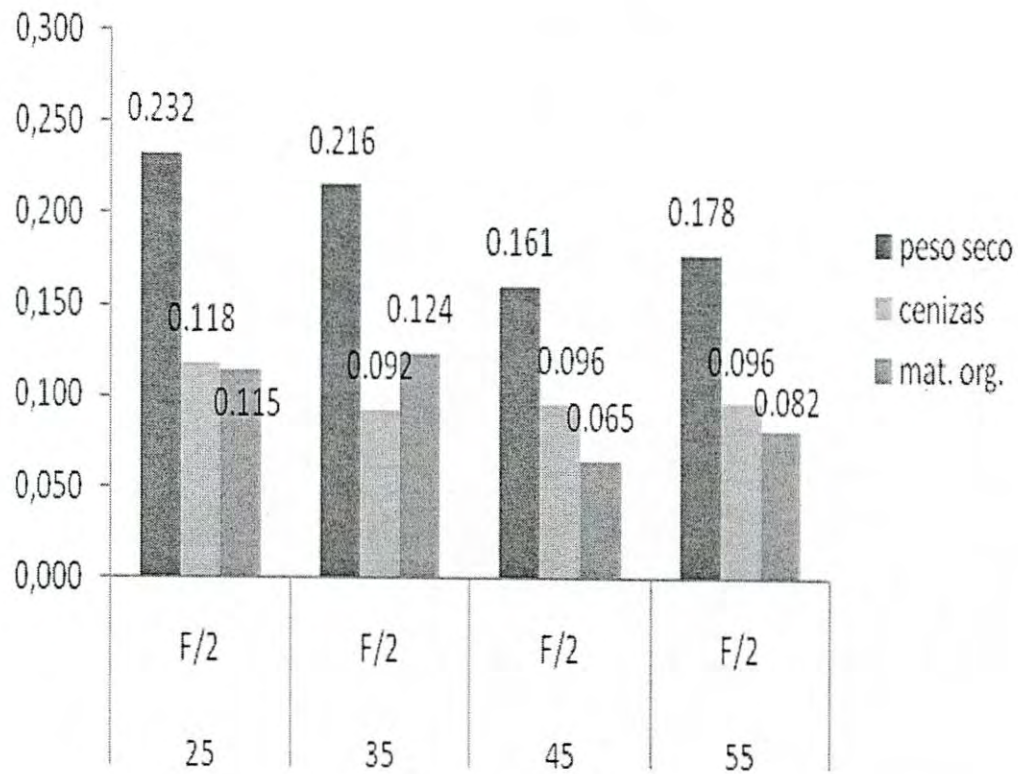


Figura 9. Contenido de peso seco, ceniza y materia orgánica, en las salinidades de 25, 35, 45 y 55 en el medio control (F/2).

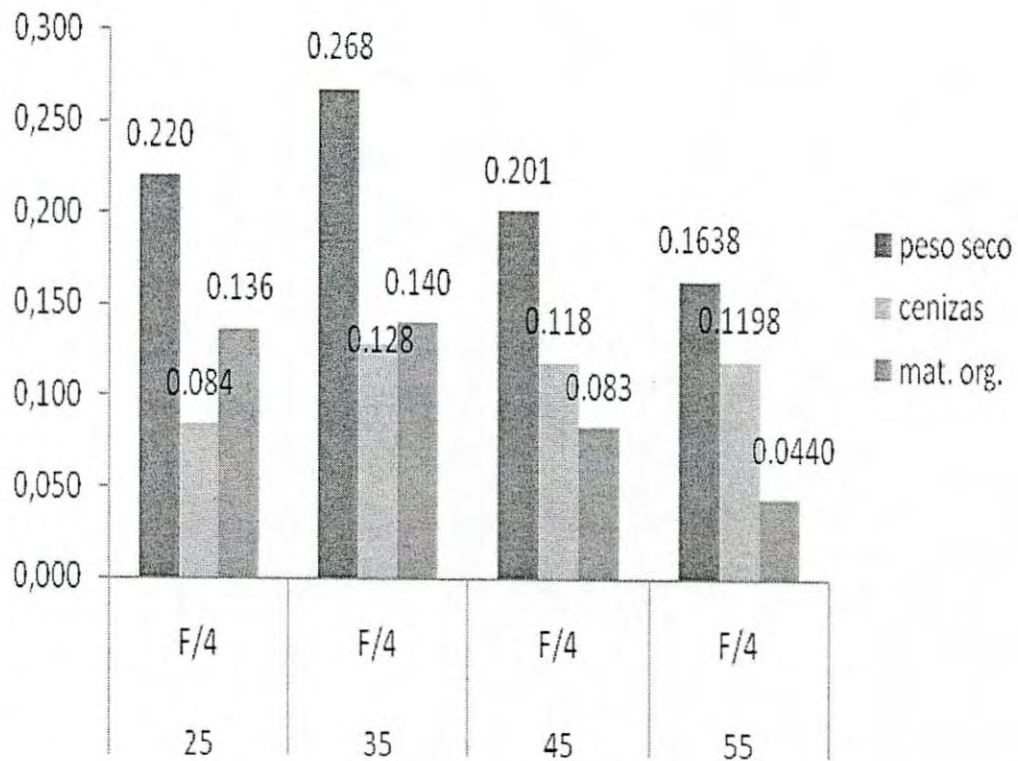


Figura 10. Contenido de peso seco, ceniza y materia orgánica, en las salinidades de 25, 35, 45 y 55 en el medio F/4.

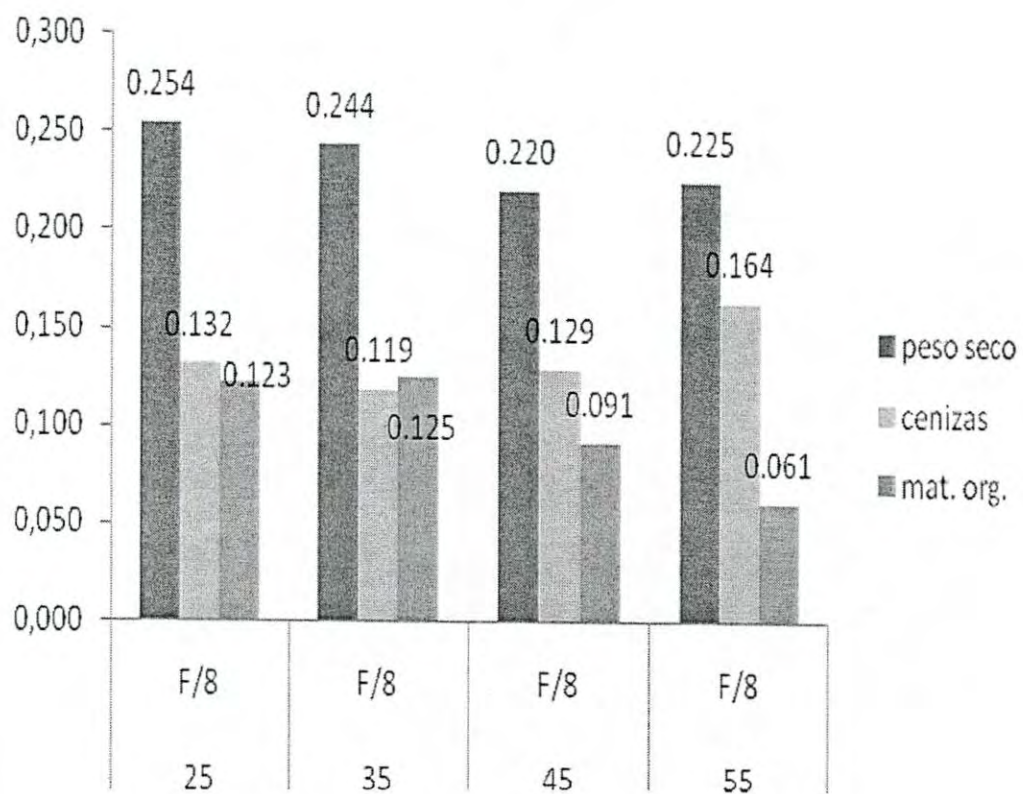


Figura 11. Contenido de peso seco, ceniza y materia orgánica, en las salinidades de 25, 35, 45 y 55 en el medio F/8.

Tabla IV. Valores promedio en Pcg/céL y desviación estándar (entre paréntesis) de peso seco, ceniza y materia orgánica en los cultivos de *Thalassiosira weissflogii* para salinidades (25, 35, 45 y 55) y los medios de cultivo (F/2, F/4 y F/8). Nota: Los subíndices indican diferencias estadísticas ($\alpha=0.05$), en donde cada letra es un grupo sin diferencias estadísticas y dos letras nos indican similitudes de los dos grupos.

Medio	Salinidad	Pcg/céL Peso seco	Pcg/céL ceniza	Pcg/céL Materia orgánica
F/2	25	393.09 ^a (38.43)	196.07 ^a (53.49)	197.02 ^a (15.68)
F/2	35	409.44 ^a (54.87)	188.13 ^a (26.45)	221.31 ^a (29.91)
F/2	45	546.58 ^a (721.64)	325.08 ^a (45.47)	221.50 ^a (38.97)
F/2	55	819.78 ^a (0196.04)	442.93 ^a (109.07)	376.85 ^a (101.56)
F/4	25	379.30 ^a (68.56)	144.00 ^a (39.80)	295.30 ^a (53.11)
F/4	35	386.35 ^a (15.22)	173.03 ^a (20.15)	213.31 ^a (14.78)
F/4	45	721.64 ^a (46.28)	424.89 ^a (60.14)	296.75 ^a (38.97)
F/4	55	12175.80 ^a (3309.96)	8922.47 ^a (2473.86)	3253.33 ^a (1041.03)
F/8	25	433.61 ^a (39.59)	224.43 ^a (9.56)	209.18 ^a (29.67)
F/8	35	525.69 ^a (105.74)	321.90 ^a (69.98)	203.79 ^a (40.35)
F/8	45	722.16 ^a (147.30)	423.88 ^a (95.12)	298.28 ^a (52.22)
F/8	55	128651.85 ^b (76437.07)	91140.74 ^b (58042.83)	37511.11 ^b (20938.57)

VII. DISCUSIÓN

VII.1. Valores de pH a cuatro salinidades en tres medios de cultivo

El pH tendió a aumentar conforme avanzaba la edad del cultivo, hasta llegar a mantenerse o bien presentar una disminución muy pequeña en los días finales de los cultivos.

Los niveles de pH presentaron comportamientos similares para todas las salinidades en el medio control, mientras que en los medios con deficiencias de nitrógeno, F/4 y F/8 registraron diferencias entre las salinidades bajas y altas. En general el pH llegó a sus niveles más altos en el tercer día, debido a que cuando el alga se encuentra en su etapa más alta de crecimiento, lleva a cabo el proceso de fotosíntesis más eficientemente, por lo que aumenta el consumo de CO_2 , en donde reacciona con el agua para formar carbonato y bicarbonato, y por lo tanto se tienen pHs mayores a 8. En donde arriba de 9.0 empieza a aumentar la cantidad de carbonatos y alcaliniza el medio de cultivo (Grobbelaar, 2004).

El aumento gradual en los niveles de pH para el medio F/4 en todas sus salinidades, refleja una disminución en los niveles de CO_2 y HCO_3 a través del proceso de la fotosíntesis, lo que indica que el alga está en pleno crecimiento (Richmond, 1986). Por otro lado, en la salinidad de 55 en donde los niveles de pH más bajos, esto indica que la deficiencia de nitrógeno afecta en mayor medida el consumo de los nutrientes y por lo tanto el crecimiento de la microalga.

Los niveles de pH encontrados en el medio F/4 coinciden con los obtenidos por Miller *et al.*, (1980) con la especie *Coccochloris peniocyctis*, que fue crecida a salinidades de 20 y 30, con suministro de CO_2 , en donde el rango de pH se mantuvo entre 7.5 y 10.0.

El pH para las salinidades de 25, 35 y 45 en el medio F/8 son muy similares a los obtenidos con cultivos de *Spirulina* sp., en los cuales se encontró que los niveles óptimos de pH para tener una mayor concentración celular, fueron entre 8.5 y 10.5 (Richmond, 1986). Los niveles bajos de pH en la salinidad de 55, que se encontraron en los medios F/4 y F/8, se deben a la deficiencia de nutrientes, que ocasiona un bajo crecimiento celular, asociada con una salinidad fuera del rango de tolerancia de esta microalga.

García-Lagunas (2009), encontró en salinidades por arriba de 45 valores de pH por arriba de 9.0, sin embargo, el crecimiento fue mucho menor que en las salinidades por debajo de 45. El pH también puede tener un efecto sobre la formación de las sales, y como consecuencia el medio es limitante en algunos de los compuestos inorgánicos, que provoca que se inhiba el crecimiento celular (Richmond, 1986).

VII.2. Curvas de crecimiento

Thalassiosira weissflogii creció en los tres medios analizados (Fig. 7), sin embargo, el crecimiento fue diferente en relación a la salinidad empleada, siendo a la salinidad de 55 en la que se obtuvieron las concentraciones celulares más bajas; como en estudios realizados anteriormente. García-Lagunas (2009) evaluó el crecimiento de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* crecida en el medio F/2 a cuatro salinidades (25, 35, 45 y 50), encontrando un mejor crecimiento y densidad celular en las salinidades bajas (25 y 35) y disminuyó considerablemente al incrementar la salinidad hasta 50.

En general las salinidades bajas (25 y 35) en todos los medios estudiados, mostraron un crecimiento similar que llegó hasta 600,000 cél/ml. Se ha visto que en altas salinidades un cierto número de moléculas de NaCl son acumuladas dentro de la célula; en estas condiciones, el gasto energético para mantener el equilibrio osmótico puede ser la razón por

la cual el crecimiento de la microalga disminuye (García-Lagunas, 2009). Así mismo se encontró que en altas salinidades la captación del sílice se ve afectada, esto en diferentes especies de *Thalassiosira* sp. (Vrieling, 2006).

VII.3. Comparación del crecimiento máximo, tasa de crecimiento acumulado y promedio

Las tasas de crecimiento más altas se encontraron en las salinidades de 25 y 35, siendo la salinidad de 35 en el medio F/4 la mejor (571,250 cél/mL). Esto coincide con lo encontrado por Guerra-Aznay (2009), en *Thalassiosira fluviatilis*, que concluye que 35 es la salinidad más indicada por sus altas concentraciones y valores favorables de parámetros poblacionales. Por otro lado, las salinidades altas en (especial la salinidad de 55) en los medios con deficiencia de nitrógeno, presentaron una tasa de crecimiento mucho menor que la obtenida en el medio control, al igual que *Thalassiosira* se encontró que *Chaetoceros mulleri* cultivada bajo condiciones de laboratorio, se encontró una densidad mayor en salinidades bajas (28 y 30), y disminuyó en salinidades por arriba de 40 (Arroyo-Pacheco y Martínez-Baldenebro, 1994).

Las divisiones por día (tasa de crecimiento promedio) fueron mayores en las salinidades bajas de 25 y 35 siendo ligeramente mayor en el medio F/4 en donde llegaron a 0.5 divisiones por día, sin embargo, en las salinidades de 25 y 45 las divisiones fluctuaron entre 0.27 hasta 0.5. Mientras que en las salinidades de 55 para el medio F/4 y F/8 las divisiones dieron números negativos, debido a que esta diatomea no crece favorablemente en condiciones con deficiencias de nitrógeno. Los rangos de salinidad previamente reportados para el crecimiento de *T. weissflogii* varían de 0 a más de 34 con una tasa de

crecimiento máxima de 2.2 divisiones/día (Guillard y Ryther, 1962). El crecimiento óptimo y tolerancia a las variaciones salinas depende de la adaptación de las especies de microalgas; en donde, la mayoría de las especies crecen mejor a salinidades inferiores a las de su hábitat natural (Fulks y Main, 1991). La tasa de crecimiento acumulada fue más baja en las salinidades de 55, sin embargo al igual que en las divisiones diarias mostró cifras negativas en los medios con deficiencias de nitrógeno.

VII.4. Producción de biomasa

VII.4.1. Peso seco

El valor mayor obtenido en base a peso seco fue en la salinidad de 35 en el medio F/4, por lo tanto la deficiencia de Nitrógeno afecta el desarrollo de *Thalassiosira weissflogii* solo en salinidades altas (por fuera del rango normal de tolerancia), ya que en trabajos realizados anteriormente se encontró que esta misma especie tuvo la mayor cantidad de peso seco en la misma salinidad en el medio control (García-Lagunas, 2009). En general se observaron mayores cantidades de peso seco en los medios con deficiencia de nitrógeno, en donde el medio F/8 mostró cantidades de peso seco muy similares sin importar la salinidad, esto debido a que el peso seco celular varía tanto en función de la fuente de N como de la fase de crecimiento, aunque no se puede establecer patrones comunes para las diferentes especies (Fidalgo-Paredes, 1995). En el caso de *Chaetoceros calcitrans*, *Dunaliella* y *Phaeodactylum*, las células cultivadas con amonio presentan pesos secos más altos que el de aquellas cultivadas con otras fuentes durante el crecimiento logarítmico.

VII.4.2. Materia orgánica

Los valores mayores de materia orgánica se obtuvieron en las salinidades de 25 y 35, ya que estas mismas salinidades son en donde se encontraron mejores producciones de biomasa y desarrollo celular.

Por otro lado se encontró que *Isochrysis* sp. expuesta a salinidades altas sintetiza moléculas orgánicas, mientras que *Thalassiosira weissflogii* tiene una mayor producción de compuestos orgánicos en salinidades por debajo de la salinidad del agua de mar (García-Lagunas, 2009). Entre las moléculas orgánicas que son sintetizadas y acumuladas se tiene al glicerol, manitol, sorbitol y aminoácidos como la prolina (Mansour y Salama, 2004).

VII.4.3. Ceniza

El medio F/8, en todas sus salinidades presentó las cantidades mayores de ceniza, seguido por el medio F/4 y el control (F/2) con los niveles más bajos. Lo que coincide con lo encontrado por García-Lagunas (2009), con *T. weissflogii* en donde los valores más bajos de cenizas se registraron en las salinidades bajas (25,30 y 35) y los valores más altos en las salinidades por arriba de 40.

Estos resultados muestran que la deficiencia de nitrógeno es el factor que limita el desarrollo de *T. weissflogii* sin embargo, en la salinidad de 55 (la más alta) se llegó a cantidades muy elevadas, pasando los 0.200 g/L, mucho mayor que las demás salinidades, resaltando que la inoculación fue de 3,500 cél/mL en comparación con las demás salinidades y medios en donde fue de 50,000 cél/mL. Este impacto que tiene la salinidad en las células debido a que aumentan su presión turgor, lo que ocasiona una reducción en el correcto funcionamiento de la bomba de iones de potasio (Krist, 1989).

VII.5. Comparación de Pcg/cél peso seco, Pcg/cél ceniza y Pcg/cél materia orgánica

En general, se observó que las cantidades de Pcg/cél de peso seco, ceniza y materia orgánica van aumentando junto con la salinidad, sin hacer mucha referencia en el medio de cultivo, de igual forma se observó que la deficiencia de nitrógeno altera el crecimiento solamente en las salinidades altas de 45 y 55. El medio F/8 en la salinidad de 55 tiene los valores de Pcg/cél peso seco, ceniza y materia orgánica mayores y muy fuera del rango de valores obtenidos para los demás medios y sus respectivas salinidades. Estos valores tan elevados, son debido a la gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos almacenados en el interior de la célula, lo que la lleva a modificar su estructura morfológica, haciéndola más grande y pesada.

VIII. CONCLUSIONES

- El crecimiento y la cantidad de biomasa más altas obtenidas se presentaron en las salinidades de 25 y 35 independientemente de la deficiencia de nitrógeno del medio de cultivo empleado (F/2, F/4 y F/8).
- Los niveles más bajos de pH se registraron en los medios de cultivo con deficiencias de nitrógeno y a las salinidades más altas.
- Los crecimientos mayores fueron encontrados a las salinidades menores (25 y 35), mientras que a la salinidad de 55 se tienen los crecimientos más bajos.
- En los medios limitantes en nitrógeno (F/4 y F/8) a las salinidades más altas (45 y 55) no se presentó crecimiento celular.
- Las tasas de crecimiento máximo y promedio se dieron en las salinidades de 25 y 35.
- Las cantidades mayores de peso seco se encontraron en las salinidades bajas (25 y 35) en los medios F/2 y F/4, mientras que en el medio F/8 no se presentó una tendencia definida.
- Los valores más altos de materia orgánica se obtuvieron en las salinidades de 25 y 35, independientemente de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo.
- En el medio F/8 en todas las salinidades se presentaron cantidades de ceniza elevadas, por encima del medio control y F/4. Lo que indica que la exposición a salinidades elevadas impide el desarrollo óptimo de *Thalassiosira weissflogii*.

- Las cantidades de Pcg/cél en peso seco, cenizas y materia orgánica se incrementa directamente con la salinidad y la deficiencia de nitrógeno.

IX. RECOMENDACIONES

- Evaluar el crecimiento de *Thalassiosira wessflogii* a salinidades por debajo de 25, ya que se ha observado un mejor desarrollo a salinidades bajas, esto con el fin de evaluar su desarrollo y obtener más información del cultivo de esta microalga.
- Evaluar la composición química de *T. wessflogii* a salinidades de 25, 35, 45 y 55 y deficiencias de nitrógeno, con el fin de identificar los nutrientes en las células que serán utilizadas como alimento de organismos de importancia comercial.
- Evaluar diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico (NO_3 , NO_2 y NH_4) y orgánico como la urea, de esta manera evaluaremos nutrientes de importancia comercial, empleándolos para el desarrollo celular.
- Modificar las concentraciones de N:P para el desarrollo de *T. wessflogii* debido a que es una variable importante para el buen desarrollo celular.
- Utilizar otras fuentes y otras concentraciones de nutrientes comerciales, como Nutrilake o fertilizantes agrícolas ya que son más baratos y pueden ser iguales de eficientes.

X. LITERATURA CITADA

- Armbrust, G. y Berges, J. 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution and Metabolism. University of California. U.S.A. 79–86 pp.
- Arroyo-Pacheco, L. E. y Martínez-Baldenebro, F. 1994. Producción de biomasa y composición química de dos especies de microalgas marinas a diferentes salinidades. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, México. 78pp.
- Clavero, E. y Hernández-Mariné, M. 2000. Salinity tolerance of diatoms from thalassic hypersaline environments. *J. Phycol.* 36:1021-1034.
- Ferrera-Cerrato, R. Rojas-Avelizapa, N. G. 2006. Procesos de biorremediación de suelos ya contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48 (2): 179-187.
- Fidalgo-Paredes, P. J. 1995. Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. Tesis de Licenciatura, Universidad de Coruña España. 20 pp.
- Fulks, W. y Main K.L. 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 Laboratory. 364 pp.
- García-Lagunas, N. 2009. Efecto de la salinidad en el crecimiento, composición bioquímica y consumo de nitratos de *Thalassiosira weissflogii*, en tres fases del desarrollo en cultivos estáticos. DICTUS. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora, México. 55 pp.
- Grobbelaar, U.J. 2004. Algal nutrition. En: Richmond A. 2004. *Handbook of Microalgal culture.* Blackwell Publishing. U.S.A. 352-363 pp.

- Guerra-Aznay, M. 2009. Evaluación del crecimiento de *Thalassiosira fluviatilis* en tres salinidades diferentes. Revista Electrónica Veterinaria. Vol. 10 (4).
- Guillard, R. L. 1973. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Woods Hole, Oceanography Institution, Massachussets. 60 pp.
- Guillard, R.L.L y Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* and *Denotula confervacea*. Canadian Journal Microbial 8:229-239.
- Kirst, G.O. 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology 40:21-53.
- Leal, S., Delgado, G., Rodríguez, G y López-Ruiz, J. 2003. Crecimiento de microalgas marinas con diferentes productos zeolíticos. Universidad de la Habana. Rev. Invest. Mar 24(1):57-62.
- López-Elías, J.A., Voltolina, D., Cordero-Esquivel, B. y Nieves-Soto, M. 2003. Producción comercial de larvas de camarón y microalgas en cuatro estados de la República Mexicana. Biotecnia 5 (1):42-51.
- López-Elías, J. A., Voltolina, D., Nieves-Soto, M. y Figueroa-Ortiz, L. 2004. Producción y composición de Microalgas en laboratorios comerciales del noroeste de México. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 636-648 pp.
- Mansour, M. F. y Salama, K.H.A. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. Environ. Exp. Bot. 52:113-22.
- Martínez- Córdova, L. R. 2009. Camaronicultura sustentable, manejo y evaluación. 1ª. Edición. Trillas, México. 168 pp.
- Matthiessen, G. C. y Toner, R. C. 1966. Possible methods of improving the shellfish Industry of Martha's Vineyard, Duke's Country, Massachusetts. 138 pp.

- Merzlyak, M. y Chivkunova, O. A. 2007. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incise*. University of Ottawa. Applied Microbiology and Biotechnology vol. 81 (4): 629-636.
- Miller, A. y Colman, B. 1980. Evidence for HCO_3^- Transport by the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*. New York University. Plant Physiology 6:397-402
- Muller-Feuga, A. 2000. Microalgae for Aquaculture: The Current Global Situation and Future Trends. En Richmond, A. 2004. Handbook of Microalgal culture. Blackwell Publishing. U.S.A. 352-363 pp.
- Redha, H. y Al-Hassan, A. 1990. Effects of salinity on the lipid and fatty acid composition of the halophyte *Navicula* sp: potencial in mariculture. Journal of Applied Phycology 2:215.22.
- Renaud, S. Luong-van, T., Lambrinidis, G., Parry, D. 1995. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. Australian Journal of Zoology 5:557-667.
- Renaud, S. y Parry, D. L. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. Journal of Applied Phycology 6:347-356.
- Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. Ben-Gurion, Blackwell Publishing. U.S.A. 85-363 pp.
- Riquelme-Salamanca, C. E. 2003. Desarrollo de tecnologías para la producción de biomasa de microalgas del desierto de Atacama, ricas en ácidos grasos poliinsaturados, como

suplemento alimenticio para la industria acuícola. CONICYT (Ciencia, Tecnología e Innovación), código: D03I1132.

Salazar-González, M. 2005. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Depto. de Biotecnología* 59: 64-70.

Tadros, M. G., y J. R. Johansen, 1988. Physiological characterization of six lipid-producing diatoms from the southeastern United States. *J. Phycol* 24: 445-452.

Torrentera-Blanco, L., y Tacon, A. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. *Brasil. Project Reports*, 12:90.

Vrieling, E. 2006. Salinity-dependent diatom biosilicification implies an important role of external ionic strength. *University of Manitoba. The National Academy of Sciences of the U.S.A.* 104(25):10441-10446.

Wayne, W, D. 2006. *Bioestadística, Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud.* 4ta. Edición. Limusa Wiley. 755 pp.

J-160027