

00344

5
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**MODIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES
DE CULTIVO DE *Nannochloris sp* Y SU
EFECTO EN LA FRACCIÓN LIPÍDICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA DE SISTEMAS Y
RECURSOS ACUÁTICOS
P R E S E N T A
DORA ESTHER HERNÁNDEZ Y CEBALLOS**

**DIRECTORA DE TESIS: M. en C. MA. TERESA
GARCÍA CASTAÑEDA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres Roberto y Dora

A mi esposo Marco

A mis hijos Alejandro, Dora Cecilia y Julieta

A mis hermanos Chelo, Robespierre y Teresita

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mis padres que con su ejemplo y cariño, me han permitido transitar por la vida con seguridad y alegría.. A mi familia por su apoyo y cariño sin los cuales no hubiera podido realizar mis planes y a la maestra María Teresa García Castañeda por haberme enseñado el valor de la amistad, así como sus enseñanzas a lo largo de mi carrera profesional

Deseo mencionar especialmente a mis compañeros de trabajo Heidi Ruth Fuentes Solís agradeciendo su amistad y colaboración en las largas jornadas en el laboratorio, sin las cuales no hubiera podido iniciar este trabajo. Al M. en C. Rodolfo Ramírez Sevilla su ayuda en el análisis estadístico de este trabajo y al M. en C. José Luis Ortiz Galindo por su paciencia y su apreciable colaboración en la revisión de este trabajo.

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo recibido a través del programa COFFA-BANCO DE MEXICO. Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas IPN por las facilidades otorgadas que me permitieron realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad de llevar a cabo mis estudios, así como las facilidades otorgadas por la Facultad de Ciencias las cuales me permitieron cumplir mi programa de trabajo.

A la M. en C. Ma. Teresa García Castañeda, a la Dra. Graciela De Lara, al Dr. José Luis Arredondo Figueroa, al M. en C. Eberto Novelo Maldonado, a la Dra. R. Cecilia Vanegas Pérez y al M. en C. Enrique Cantoral Uriza que como mis asesores aportaron su experiencia y tiempo para mejorar este trabajo.

De manera muy especial quiero agradecer al M. en C. Marco Sánchez Hidalgo y Anda por su comprensión.

CONTENIDO

LISTA FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	iv
RESUMEN	vi
1.- INTRODUCCION	1
2.- ANTECEDENTES	6
3.- JUSTIFICACION	13
4.- OBJETIVOS	14
5.- MATERIALES Y METODOS	16
6.- RESULTADOS	21
7.- DISCUSION	44
8.- CONCLUSIONES	56
9.- BIBLIOGRAFIA	57
ANEXOS	

Lista de Figuras.

Figura 1. Fotografía al microscopio óptico de las células de *Nannochloris* sp Cepa 1, se observa la cápsula materna y el septo de división; las células siempre se dividen en dos.

Figura 2 . Fotografía al microscopio electrónico que muestra una vista general de la célula de *Nannochloris* sp. Cepa 1 en donde se observa el núcleo (N), mitocondria (M) y cloroplasto (C), la pared celular (PC).

Figura 3 . *Nannochloris* sp. Cepa 1, se observa el núcleo (N), la mitocondria (M), la pared celular (PC) y el cloroplasto (C).

Figura 4. Fotografía al microscopio electrónico de *Nannochloris* sp. Cepa 2 en donde se observa el núcleo, la mitocondria, la pared celular, la doble membrana, el plasto con lamelas tilacoidales alargadas.

Figura 5. Fotografía de la división celular en *Nannochloris* sp Cepa 2, se observan restos de la cápsula, la pared celular (PC), la membrana citoplásmica (MC) y el núcleo (N).

Figura 6. Comparación durante la 1a fase del experimento en el rendimiento del peso seco (mg/l) en las interacciones significativas: Cepa/Sistema, Cepa/días, y Sistema/días.

Figura 7. Desempeño en el rendimiento en peso seco (mg/l), de la Cepa 1 y 2 , para cada uno de los sistemas utilizados y a los 7, 14 y 21 días de cultivo.

Figura 8. Desempeño en peso seco (mg/l) de la Cepa 1 y 2 cultivadas en 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 .

Figura 9. Rendimiento en peso seco (mg/l) de las Cepas 1 y 2, a los 7, 10, 12 y 19 días de cultivo.

Figura 10. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en peso seco (mg/l) cultivadas en 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , a los 7, 10, 12 y 19 días de cultivo.

Figura 11. Rendimiento de las Cepas 1 y 2 en el peso seco a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , los días 7, 10, 12, 14 y 19.

Figura 12. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en número de células (1a fase del experimento) en: a. cepa/sistema; b. cepa/medios y c. sistema/medios.

Figura 13. Desempeño en número de células de las Cepa 1 y 2, en cada uno de los sistemas utilizados, con los medios de cultivo MI, BE y FA.

Figura 14. Desempeño en número de células de las Cepas 1 y 2 cultivadas en 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 durante 7, 10, 12, 14 y 19 días.

Figura 15. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en el rendimiento del número de células durante todo el tiempo de cultivo.

Figura 16. Comparación de las Cepas 1 y 2 en el número de células obtenido a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM en NaNO_3 .

Figura 17. Rendimiento de las Cepas 1 y 2 en el número de células obtenido a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 .

Figura 18. Rendimientos de los lípidos totales (mg/l) en la 1a fase del experimento, (solo las interacciones que resultaron significativas): a. cepa/sistema, b. cepa/medios, y c. cepa/días.

Figura 19. Rendimiento de lípidos totales de los sistemas de cultivo en relación al tiempo, en los medios MI, BE y FA y a los 7, 14 y 21 días de cultivo

Figura 20. Rendimiento en lípidos totales obtenidos en los medios de cultivo MI, BE y FA, a los 7, 14 y 21 días.

Figura 21. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en la 1a fase del experimento, en el rendimiento de los lípidos totales, en los dos sistemas utilizados, a los 7, 14 y 21 días de cultivo.

Figura 22. Desempeño de las Cepas 1 y 2, en la 1a fase del experimento en la obtención de lípidos totales, en cada uno de los sistemas utilizados para cada uno de los medios de cultivo.

Figura 23. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en el rendimiento de lípidos totales en cada uno de los medios de cultivo utilizados, a los 7, 14 y 21 días de cultivo.

Figura 24. Rendimiento de los lípidos totales obtenidos para las Cepas 1 y 2 en la 2a fase del experimento, a los días 7, 10, 12 y 19 días de cultivo.

Figura 25. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en la obtención de lípidos totales, a las concentraciones 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 : a. cepa/concentración y b. concentración/tiempo.

Figura 26. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en la producción de lípidos totales a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , a los días 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de cultivo.

Índice de Tablas.

Tabla 1. Método empleado para preparación de la muestra del cultivo y la determinación de lípidos totales, proteínas y carbohidratos.

Tabla 2. 1a fase del experimento: lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 1 cultivada en matraz..

Tabla 3. 1a fase del experimento; cantidad de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 1 cultivada en garrafón.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la 1a fase del experimento; lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 cultivada a nivel de matraz.

Tabla 5. Resultados obtenidos en la 1a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 cultivada a nivel de garrafón.

Tabla 6. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 1 (concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3)

Tabla 7. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 a concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , a los 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de incubación.

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza para la obtención de Peso seco del Ln (mg/l). Dos cepas de *Nannochloris* sp., dos sistemas (matraz y garrafón), y en los Medios (MI, BETA y FA) durante 7, 14 y 21 días de incubación. (1a fase del experimento).

Tabla 9. Resultados del análisis de varianza para Peso Seco con las Cepas 1 y 2 de *Nannochloris* sp. a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , durante 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de incubación (2da fase del experimento)

1 Tabla 10. Resultados del análisis de varianza para Peso Seco, en la Cepa

Cepa 2.

Tabla 12. Resultados del análisis de varianza, para el Número de células Ln (cel/ml), en la 1a fase del experimento.

Tabla 13. Resultados del análisis de varianza, para el número de células de las Cepa 1 y 2, en la 2da fase del experimento,

Tabla 14. Resultados del análisis bifactorial para el número de células de la Cepa 1, en la 2da fase del experimento.

Tabla 15. Resultados del análisis bifactorial para el número de células de la Cepa 2, en la 2da fase del experimento.

Tabla 16. Resultados del análisis de varianza para la obtención de lípidos totales del Ln (mg/l), en la primera parte del experimento.

Tabla 17. Resultados del análisis de varianza, en la obtención de lípidos totales en las Cepa 1 y 2, en la 2da fase del experimento.

Tabla 18. Resultados del análisis bifactorial para lípidos de la Cepa 1, en la 2da fase del experimento.

Tabla 19. Resultados del análisis bifactorial para lípidos de la Cepa 2, en la 2da fase del experimento.

RESUMEN

En este trabajo se caracterizaron sistemáticamente dos cepas microalgales; CICIMAR 1 y 2, como pertenecientes al género *Nannochloris* de la clase Chlorophyceae y del orden Chlorococcales .

Con el objetivo de optimizar sus condiciones de cultivo, se utilizaron cultivos estáticos a temperatura promedio de 28°C y con luz y aireación continua. El experimento se llevó a cabo en dos fases. En la primera se compararon por análisis tetrafactorial las cepas CICIMAR 1 y 2; los dos sistemas de cultivo utilizados (matraz y garrafón); la influencia de los medios nutritivos (MI, BETA, FA, FI) y el efecto del tiempo (tiempos de cosecha de 7, 14, 21 y 28 días). Las variables respuesta consideradas fueron el número de células, la concentración de lípidos y el peso seco. Los resultados de esta primera fase señalan el efecto significativo del tiempo ($p < 0.05$) y de los medios nutritivos en la producción del cultivo tanto de biomasa seca como de lípidos totales, no así en el número de células, donde el tiempo no fue significativo. pero si los medios nutritivos y los sistemas. Sin embargo, no obstante que en el medio nutritivo Fa se obtuvieron los rendimientos más altos, se utilizó el medio MI CICIMAR con rendimientos ligeramente menores a los obtenidos con el medio Fa, pero mas económico.

A partir de los resultados anteriores, en la segunda fase del experimento, se trabajó para determinar las condiciones de cultivo para que las cepas CICIMAR 1 y 2 sintetizaran la mayor cantidad de lípidos. En esta segunda fase, los cultivos se realizaron en matraces erlenmeyer de 2 l, en agua de mar enriquecida con el medio MI y a diferentes concentraciones de NaNO_3 . Los tiempos de cosecha para la Cepa 1 fueron 7, 10, 12, 19 días y para la Cepa 2 , 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días.

Los resultados del análisis de varianza para esta fase señalan que el máximo rendimiento de los cultivos, tanto en biomasa seca, como en el número de células, y lípidos varían en función del tiempo, de la cepa y de la concentración de nitratos. Siempre se observó que la Cepa 2 tiene un mejor desempeño que la Cepa 1.

1.0 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de biotecnologías que aseguren la máxima productividad de biomasa de un recurso con el mínimo de insumos y de tiempo es cada vez más importante.

Con esto en perspectiva, en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, (CICIMAR), del Instituto Politécnico Nacional, con sede en La Paz, Baja California Sur, se estableció el Laboratorio de Biología Experimental, donde se desarrolla un programa de investigación en acuicultura que tiene como propósito el cultivo de peces e invertebrados marinos y uno de los objetivos de este programa, es el de seleccionar especies de microalgas que satisfagan los requerimientos nutricionales de las cadenas tróficas.

En el transcurso del proyecto se han aislado diferentes cepas de microalgas, principalmente a partir de muestras obtenidas en esteros y pozas de mareas en las costa de B.C.S.; cepas que han sido cultivadas en el laboratorio con el propósito de optimizar su cultivo y probar su efecto nutricional en rotíferos y copépodos, consumidores primarios de las cadenas tróficas. Las investigaciones en el proyecto de Cultivo de Peces abarcan desde, estudios de las fases larvarias de especies de interés comercial en la zona de Baja California Sur, tanto para la producción de juveniles como para su crecimiento y engorda posterior, en jaulas en el exterior. Este proyecto incluye la recolecta de los reproductores y el desove de éstos bajo condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura.

Durante su crecimiento y desarrollo las larvas y juveniles de peces requieren de alimento en cantidad suficiente y en el momento adecuado para cada una de las etapas. En la primera etapa las microalgas constituyen elementos importantes de todas las dietas en uso y primer eslabón en cualquier

cadena trófica del tipo que nos ocupa. La producción de este alimento es otra de las actividades del laboratorio de Biología Experimental.

Para su mejor aprovechamiento las microalgas en acuicultura deben reunir ciertas características, tales como pared celular digerible, una adecuada relación entre proteínas, carbohidratos y lípidos, además de una cierta proporción de determinadas vitaminas. Se ha reconocido en la acuicultura la gran importancia que tienen los lípidos en la nutrición de organismos marinos, especialmente los ácidos grasos polinsaturados (n-3) como el ácido linoléico; de ahí que sea indispensable que éstos se encuentren en el contenido de las microalgas y por lo tanto en los rotíferos, los copépodos y la artemia, eslabones de la cadena trófica de los peces (Ostrowski y Divakaran, 1990). Los ácidos grasos también han cobrado importancia por su relación con la salud humana, ya que ácidos grasos esenciales como: el linoléico, el linolénico, el arachidónico y el eicosapentaenóico se requieren para el consumo humano, y el aporte mayor de éstos es a través de su inclusión en la dieta de peces (López *et al* 1992).

Recientemente otras evidencias han hecho que se enfoque la atención a los ácidos eicosapentaenóico y dodecahexaenóico, en relación con la arteriosclerosis, la trombosis, la artritis y el cáncer (Klausner, 1986; Yongmarnitchai y Ward, 1989 En: López *et al* 1992), estos ácidos al mismo tiempo son importantes por su conversión metabólica en el eicosanoide precursor de las prostaglandinas (Borowitzka, 1986).

En la última década, ha habido un gran interés en el desarrollo tecnológico del cultivo de las microalgas, por su gran potencial como productores de biomasa rica en proteínas, lípidos y amino ácidos entre otros. Sin embargo el problema mayor en la acuicultura marina es producirlas en cantidades suficientes que aseguren el alimento del segundo eslabón de la cadena trófica (De Pauw *et al*, 1983 En: Cid *et al* 1992, Benemann, 1992), o como fuente de proteínas

(Fábregas y Herrero, 1985), o bien como fuente de minerales en las dietas de peces (Fábregas y Herrero, 1986), alimentando rotíferos y/o artemia, en la crianza de peces marinos y moluscos bivalvos (Wikfors *et al*, 1984), así como para su utilización con otros fines como la producción de productos químicos finos o energéticos (Borowitzka, 1986).

Un factor que debe considerarse en la producción de microalgas es la cantidad y calidad de las fuentes de nutrientes. Pueden utilizar nitrato, amonio o urea como fuente de nitrógeno, los que, además de ofrecer mayor número de opciones de fuentes de N en relación a las plantas vasculares, pueden producir cambios importantes en el crecimiento y la composición bioquímica de las células (Fábregas *et al*, 1989; Ben-Amotz *et al*, 1987). El éxito de los cultivos masivos está determinado por dos factores, la optimización de sus rendimientos en biomasa por una parte y el mantenimiento de la composición específica por otra, los cuales se logran evaluando la respuesta fisiológica básica de las diferentes especies algales a las condiciones ambientales y nutricionales (Roessler, 1990).

Los cultivos continuos a cielo abierto, son una de las alternativas económicas para el sistema de producción de microalgas en forma masiva (De Pauw *et al*, 1984), por lo que representan sistemas simples que en biotecnología son necesarios para establecer e identificar las necesidades de investigación o de producción, utilizándolos con un propósito predictivo (Grobbelaar, 1990).

En virtud de que la composición química de las microalgas puede ser manipulada fisiológicamente, es necesario determinar su fase de crecimiento en un medio convencional, ya que la composición bioquímica algal puede presentar grandes cambios en una escala de tiempo que oscila entre horas a días, hasta que las células entran en la fase estacionaria debido a limitación nutricional. El crecimiento del cultivo puede ser interrumpido por falta de uno de los macronutrientes (C, N, P y Si), lo interesante es que la velocidad de crecimiento

está vinculada parcialmente a cantidades mínimas y máximas del nutriente por célula y a una secuencia de los nutrientes de acuerdo a su carga iónica que van de Si>C>N>P (Harrison et al, 1990). Si se añaden más nutrientes el cultivo continua creciendo, pero la tasa de crecimiento baja conforme el cultivo se va limitando por la obstrucción de la luz producida por las mismas células; de ahí que si se tienen suficientes nutrientes y el pH se mantiene entre los límites de tolerancia de la especie, el rendimiento máximo del cultivo va a estar determinado por la cantidad de luz recibida.

Este conocimiento permite establecer los requerimientos nutricionales en los cultivos masivos, así como el efecto del ambiente sobre su composición celular. Las microalgas presentan características eurihalinas y euri térmicas, además algunas especies pueden ser cultivadas en condiciones de nutrición limitada, produciendo entre 25 a 86 % de los lípidos habituales (Yu Suen, *et al*, 1987). Recientemente se han desarrollado colecciones de cepas microalgales con características genéticas específicas seleccionadas, mutadas y modificadas por ingeniería genética (Borowitska, comunicación oral; Barclay y Cheng, 1990) entre éstas, existen cepas de algas lipogénicas que al cultivarse en condiciones de nutrición limitada pueden llegar a producir hasta un 80% de lípidos en relación a su peso seco.

Es necesario identificar los factores que limitan el crecimiento y desarrollo celular de una especie, en particular si el objetivo final es utilizarla en el sostén de cadenas tróficas, ya que estos factores son determinantes para obtener buenos rendimientos en acuicultura (Morris, 1981).

Es típico de las algas en la naturaleza dar dos respuestas a los cambios de los factores limitantes: en el rendimiento final o en la tasa de crecimiento.

Según Richmond (1986), los requisitos para optimizar un cultivo, son conocer la concentración adecuada de nutrientes, buscar una correspondencia entre la tasa de crecimiento y la utilización de los nutrientes, buscar la producción sostenida y estandarizar la cosecha a intervalos periódicos con reemplazamiento del medio de cultivo en forma continua o semicontinua.

Para poder cultivar y establecer altas densidades de microalgas en cualquier sistema de cultivo es necesario aprovechar los factores físicos esenciales en sus niveles óptimos. Estos factores incluyen: Iluminación, temperatura, aire (para control de pH y provisión de CO₂) y características del recipiente de cultivo.

En un cultivo estático de microalgas marinas los parámetros fotosintéticos pueden variar ampliamente (Griffiths, 1973; Beardall y Morris, 1976 En: Geider y Osborne, 1992). Según Brand pueden sucederse de 5 a 20 generaciones antes de que el fitoplancton se encuentre totalmente aclimatado a las condiciones ambientales prevalecientes; sin embargo en un cultivo estático el crecimiento equilibrado nunca se alcanza debido a que el organismo modifica continuamente su ambiente, de ahí que pueda alterarse su patrón de crecimiento (Wanner y Egli, 1990 En: Geider y Osborne, 1992); sin embargo es posible mantener a las células en un crecimiento equilibrado a través de cultivos subsecuentes (resembrados) (Brand, 1981 En: Geider y Osborne, 1992).

2.0 ANTECEDENTES

Las algas, son consideradas como uno de los prototipos para el estudio de la biosíntesis de metabolitos secundarios, en virtud de que al igual que las plantas vasculares son capaces de producir biomasa en forma de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos esenciales y muchos otros compuestos a partir de bióxido de carbono, sales inorgánicas simples y de la energía solar, bajo la acción de factores internos que regulan su crecimiento y reproducción.

Las microalgas representan un recurso natural susceptible de explotación, del que de acuerdo con Burlew, 1953 existen mas de 30,000 especies, sin embargo la mayor limitante en su aprovechamiento es la total imposibilidad de su recolección en el ambiente natural, por lo cual el único medio de aprovecharlas conocido hasta ahora es a través de los cultivos. El aprovechamiento de las algas se remonta a tiempos inmemoriales y no se sabe con certeza a partir de cuando la humanidad introdujo en su dieta, a las algas marinas. Las macroalgas marinas han sido explotadas comercialmente por décadas por su contenido de ficocoloides, como los alginatos y los carragenanos.

En México el aprovechamiento de las microalgas se llevo a cabo desde el tiempo de los aztecas ya que entre los alimentos descritos por misioneros y cronistas sobresalió el Tecuitlale, extralido del lago de Texcoco y cuya identificación no se dio hasta 1964, en que según reporta Paniagua, 1994, Leonard descubrió en la región de Kanem en el lago Chad, que los nativos preparaban y comían un alimento similar al de los aztecas, el cual determino se componía de filamentos de *Spirulina platensis* (Paniagua, 1994).

Debido a que no se cuenta con información suficiente sobre el desarrollo histórico del cultivo de microalgas nos limitaremos a citar hechos sobresalientes señalados por Richmond en un trabajo publicado en 1990:

Beijerinck: en 1890 fue el primero que cultivó microalgas en tubo de ensaye y cajas de petri con medios sólidos, para caracterizar a *Chlorella vulgaris* y realizar las primeras investigaciones sobre la fisiología del crecimiento algal.

Otto Warburg, en 1919 emplea suspensiones densas de *Chlorella* para el estudio del proceso fotosintético y la respiración algal. En Alemania, Harder y von Witsch, 1942 desarrollaron la idea de cultivar en el laboratorio diatomeas crecidas en condiciones limitadas de nitrógeno, obteniendo producciones bajas por lo cual, Spoehr y Milner en 1947 se inclinaron a estudiar el potencial de *Chlorella* como productor de proteína, encontrando que al variar las condiciones de cultivo, se podía obtener hasta un 88% de proteína (Richmond, 1986).

A partir de 1949 se inició en E.U.A. el programa de producción masiva de microalgas por diversos grupos de investigadores entre los que destacan los encabezados por Oswald y Gummert; mismos que establecieron las bases para la utilización de *Chlorella* y *Scenedesmus obliquus* en la producción de alimento a gran escala.

Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas para la alimentación continuó y se extendió hacia otros países entre los que han destacado además de Alemania y E.U.A.; Japón, Israel, Australia y Rusia utilizando *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, y *Porphyridium*; sin embargo se encontró que los principales problemas para una aplicación industrial directa de estas investigaciones son los altos costos de producción, el mercado y el uso que tendría el producto final. A la vez se buscaron nuevas aplicaciones como son la utilización de microalgas en el

tratamiento de aguas residuales para la obtención de proteínas o el desarrollo de sistemas de producción masiva para la bioconversión de energía solar a metano.

En otro artículo Gudín en 1987, señala que las microalgas pueden producir lo que sea, sin embargo deben de competir con los productos de la química sintética, petroquímicos y agrícolas. Entre estos productos producidos por microalgas están: ficocianina, hidrocarburos, triglicéridos, glicerol, beta-caroteno, astaxantina, polisacáridos (alginatos, carragenanos y agarosa, polisacáridos sulfatados, ácido araquidónico y eicosapentaenoico y ficoeritrina).

En la actualidad se trabaja en investigaciones para determinar la escala de producción, los tipos de sistemas abiertos o cerrados (fotoreactores), en el medio nutritivo o bien inmovilizadas en donde el medio nutritivo esta circulando y extrayendo los metabolitos al mismo tiempo. Se pueden seguir tres tecnologías de cultivo la continua o discontinua y los sistemas estáticos.

En la acuicultura Allen y Nelson en 1910, iniciaron la producción de microalgas para la alimentación de invertebrados (Fulks y Main, 1991), esto ha permitido un gran avance en la investigación sobre la producción de biomasa microalgal marina, ya que la producción de esta biomasa se ha considerado como un cuello de botella en los cultivos (DePauw *et al*, 1983).

La mejor alternativa para la producción de microalgas por el alto valor comercial que tiene su producción, es en acuicultura, Becker (1986). El cultivo de microalgas en la acuicultura tiene ventajas sobre la producción de microalgas para alimento humano o de animales: ya que presenta una alta eficiencia de bioconversión, porque no requieren de esfuerzos en la cosecha, en el secado y en almacenaje, y los animales las pueden consumir en el momento de ser producidas (Benemann, 1992).

La acuicultura es una de las áreas de crecimiento más rápido en el campo de la producción de alimento y la importancia de las microalgas es que son uno de los componentes esenciales de la dieta de moluscos bivalvos, larvas de gasterópodos marinos (abulón), larvas de camarón, algunas especies de peces y zooplanctón (rotíferos y copépodos usados en cadenas tróficas complejas); donde esta demostrado específicamente que la fracción lipídica, tanto en cantidad, como en calidad (presencia de lípidos omega-3), es la fracción determinante del valor nutritivo de la especie algal. (Ben-Amotz y Tornabene, 1985; Ben-Amotz, Fishler y Schenelleer, 1987; Frolov, *et al* 1991; Hamdy y Martin, 1986; Navarro, *et al* 1992).

Los autores antes mencionados y otros más han llegado a la conclusión que la porción de lípidos insaturados, especialmente los lípidos conocidos como omega-3. tales como los ácidos eicopentaenóico, linoléico, linolénico y araquidónico son esenciales tanto en la nutrición de intermediarios de la cadena trófica, como en consumidores "tope", como los peces y el hombre (Crawford, *et al* 1989 y Vergroisen, 1989 En: Ahlgren *et al*, 1992).

Un alimento con buena calidad nutricional conlleva al éxito en el larvicultivo (Watanabe y Kiron, 1994). Por lo tanto se están haciendo esfuerzos en las investigaciones para aclarar los requerimientos nutricionales de las diferentes especies y en esta forma producir mas eficientemente a las especies deseadas; de ahí que es importante que la calidad nutricional de las microalgas utilizadas como alimento deba ser optima para los animales cultivados (Brown, 1989 En: Volkman *et al* 1989). Se han examinado un buen número de microalgas, sin embargo no todas las especies tienen el mismo éxito en el soporte de un animal en particular; porque la calidad de los cultivos depende del valor nutritivo del alga y la composición bioquímica de estas en general, se ve afectada por las condiciones de cultivo, edad/fase de crecimiento y los factores como temperatura, luz, y composición de los nutrientes en el medio, así como de un nutriente en

particular (Fábregas, *et al*, 1986, Richmond, 1986, Renaud y Parry, 1994, Volkman *et al* 1989).

Debido a que las algas se consideran como uno de los grupos de organismos más versátiles en términos de su tamaño, forma, función ecológica y composición bioquímica; permiten un gran número de opciones de cultivo, alterando el patrón de producción de metabolitos y de productos químicos de alto valor comercial, de ahí que el interés en el cultivo de las microalgas no queda solamente circunscrito a la producción de lípidos insaturados ya que además dentro de los productos naturales que tienen aplicaciones comerciales y que se obtienen a partir de microalgas están los pigmentos, de estos los más importantes son las ficobiliproteínas (ficocianina y ficoeritrina) y una gran variedad de carotenoides. Según Borowitzka (1988) se conocen más de 400 carotenoides, de los cuales muy pocos son utilizados comercialmente: beta caroteno, zeaxantina, astaxantina y luteína, que tienen muchos usos como colorantes y aditivos en alimentos.

El futuro de las investigaciones que permitan la expansión industrial del cultivo de microalgas, se encuentra en las especies que faltan de examinar en relación a la producción de algún metabolito secundario y se basan en el potencial de la ingeniería genética, la cual permite la manipulación genética para incrementar en el contenido natural de la célula el producto deseado (Richmond, 1990); para esto se requiere de un mayor conocimiento biológico e ingenieril que haga posible la domesticación de las especies silvestres (Chapman y Gellenbeck, 1989). La selección y mejoramiento genético de las especies microalgales se logra de manera rápida y fácil debido a que la mayoría de las especies de microalgas poseen ciclos de vida cortos, usualmente de horas (Paniagua-Michel, 1994).

particular (Fábregas, *et al*, 1986, Richmond, 1986, Renaud y Parry, 1994, Volkman *et al* 1989).

Debido a que las algas se consideran como uno de los grupos de organismos más versátiles en términos de su tamaño, forma, función ecológica y composición bioquímica; permiten un gran número de opciones de cultivo, alterando el patrón de producción de metabolitos y de productos químicos de alto valor comercial, de ahí que el interés en el cultivo de las microalgas no queda solamente circunscrito a la producción de lípidos insaturados ya que además dentro de los productos naturales que tienen aplicaciones comerciales y que se obtienen a partir de microalgas están los pigmentos, de estos los más importantes son las ficobiliproteínas (ficocianina y ficoeritrina) y una gran variedad de carotenoides. Según Borowitzka (1988) se conocen más de 400 carotenoides, de los cuales muy pocos son utilizados comercialmente: beta caroteno, zeaxantina, astaxantina y luteína, que tienen muchos usos como colorantes y aditivos en alimentos.

El futuro de las investigaciones que permitan la expansión industrial del cultivo de microalgas, se encuentra en las especies que faltan de examinar en relación a la producción de algún metabolito secundario y se basan en el potencial de la ingeniería genética, la cual permite la manipulación genética para incrementar en el contenido natural de la célula el producto deseado (Richmond, 1990); para esto se requiere de un mayor conocimiento biológico e ingenieril que haga posible la domesticación de las especies silvestres (Chapman y Gellenbeck, 1989). La selección y mejoramiento genético de las especies microalgales se logra de manera rápida y fácil debido a que la mayoría de las especies de microalgas poseen ciclos de vida cortos, usualmente de horas (Paniagua-Michel, 1994).

Bajo condiciones experimentales idénticas, es posible examinar la variabilidad en las tasas de crecimiento específico: ya sea en la tasa fotosintética o bien en la composición bioquímica; mismas que cabría atribuir a una variación genética, por lo tanto si se hacen tales comparaciones se puede explicar la mayoría de la variabilidad interespecífica para el tamaño del organismo (Banse, 1982 En: Geider and Osborne, 1992). El tamaño celular es una fracción significativa de la variabilidad interespecífica; ya que las tasas de los procesos metabólicos dependen del tamaño celular por lo que este es una fracción significativa de la variabilidad interespecífica, por lo tanto las tasas metabólicas específicas disminuyen cuando el tamaño aumenta. Patten en 1971 desarrolló dos modelos para el crecimiento de una población, estableciendo una diferenciación de las propiedades de la misma. Así se tienen las que determinan el crecimiento de la población como: número de células, biomasa, la cantidad de nutrientes accesibles y el promedio de la masa por célula (propiedades extensivas) y las que se refieren a las frecuencias de distribución de las edades, tamaño y componentes químicos dentro de la población (intensivas).

De ahí el interés del manejo ecofisiológico de los cultivos microalgales, ya que permite la optimización de las condiciones del cultivo de las microalgas nativas aisladas de la región, mejorando el rendimiento en la producción de la fracción lipídica o bien la producción de otro metabolito.

La biotecnología algal, es la ciencia de la manipulación genética del alga con técnicas de biología molecular, mapeo, clonación y caracterización de genes para producir una "mejor alga". Según Panlagua (1994) una definición de biotecnología microalgal es la ciencia que aplica los conocimientos de la biología molecular, bioquímica, genética e ingeniería a la maquinaria fotosintética y organelos microalgales para la producción de alimentos, productos químicos y energía.

Debido al gran avance que se ha tenido en los últimos años en las técnicas ecofisiológicas de los cultivos microalgales, nuestro país debe hacer un esfuerzo para mantenerse al día y desarrollar una experiencia propia, adecuada a sus condiciones naturales. De ahí el interés que se tiene en el CICIMAR de dominar las técnicas del manejo ecofisiológico de los cultivos microalgales que permitan la optimización de las condiciones de cultivo de microalgas nativas aisladas de la región y obtener un conocimiento fisiológico y reproductivo de estas especies como una primera etapa para la producción y mejor aprovechamiento de las cepas microalgales en la acuicultura de la región.

3.0 JUSTIFICACION

El Estado de Baja California Sur se constituye el 22% de la zona costera nacional, en la cual las que las microalgas pueden ofrecer una alternativa sobre la agricultura convencional, ya que en esta parte de la republica la agricultura esta limitada por la escasez de agua. Las microalgas aprovechan mejor la radiación solar y pueden utilizar fuentes de agua salobres o de mar, incrementándose en forma exponencial con la temperatura hasta una temperatura óptima, siendo ésta de 35 °C para muchas especies.

México es un país con más de 10, 000 km de costas litorales, La Paz, B.C.S. es uno de los sitios de la republica en donde se tienen 360 días año sin nubosidad. De donde la acuicultura representa una alternativa viable que permite al país planear la producción tanto de alimento como productos químicos de alto valor comercial.

El aumento en el consumo de alimentos derivados del mar y el descenso en los rendimientos de las cosechas naturales, nos dicen que para el siglo XXI una buena parte de los alimentos derivados del mar, tendrán su origen en la acuicultura (Raymond y Maxey, 1994)

4.0 OBJETIVOS GENERALES:

1.- Optimizar las condiciones de cultivo de *Nannochloris* sp. para la obtención máxima de biomasa a escala de laboratorio.

2.- Determinar las condiciones de cultivo bajo las cuales *Nannochloris* sp. contenga mayor cantidad de lípidos totales.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Caracterizar en forma sistemática las cepas de *Nannochloris* que se utilizarán en este trabajo.

2.- Seleccionar el medio de cultivo mas adecuado para un mayor rendimiento en biomasa de las cepas de *Nannochloris* sp.

3.- Determinar los lípidos totales en las cepas de *Nannochloris* sp. seleccionadas.

5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Aislamiento de las cepas.

Con el fin de tener un cepario de microalgas marinas nativas, en el laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR, se obtuvieron muestras de agua de diferentes esteros y pozas de mareas de lugares aledaños a la Paz, B.C.S. Para el aislamiento de las cepas se prepararon series de dilución 1:10 con medio de cultivo del laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR (MI, Anexo 1), inoculando 1 ml de la muestra de agua; los tubos se incubaron por 72 hrs, y cada 24 hrs se observó al microscopio si había crecimiento en los tubos detectando así a las unidades algales (Anexo 2).

El aislamiento de una unidad algal que mida alrededor de $10\mu\text{m}$ o menos de diámetro se lleva a cabo más fácilmente sembrando por estria cruzada en placa de agar y medio nutritivo, de esta manera además de aislar al organismo, se libera de los organismos contaminantes. De ahí que los productos obtenidos en las series de dilución se sembraron en placa de agar y las unidades algales aisladas, se transfirieron a un tubo con medio de cultivo líquido (Stein, 1973); de esta forma se obtuvieron las unidades clonales de cepas monoespecíficas de diferentes grupos de Chlorophyceae, Bacillariophyceae y Prasinophyceae.

5.2.- Caracterización de las Cepas.

De las cepas aisladas por el método anterior, por las características de tamaño, facilidad de cultivo y aceptación como alimento de rotíferos y copépodos, se seleccionaron para optimizar sus rendimientos en la producción de biomasa con una alta calidad nutricional, a las cepas CICIMAR 1 y CICIMAR 2.

Para identificarlas sistemáticamente se mantuvieron en cultivos con medio de cultivo MI, bajo condiciones de luz continua y fotoperíodo natural, a una temperatura de 27 ± 2 °C. Su morfología, fue determinada con apoyo en conceptos de citología comparada en un microscopio de contraste de fase (Zeiss) siguiendo las descripciones de Fritsch, 1965; Pickett-Heaps, 1975; Bold y Wynne, 1979; Irvine y John, 1984; Thronsen, 1985; South y Whittick, 1987. Así, se identificaron como Clorofitas y para corroborarlo se hizo la separación de

pigmentos de acuerdo con el método de Lewin, para algas unicelulares, (1989), basado en la separación rápida de clorofilas a y b, por medio de cromatografía en capa fina. (Anexo 3).

Además, se obtuvieron micrográficas de su ultraestructura celular en el microscopio electrónico de transmisión del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, la técnica utilizada en la microscopía electrónica se tomó modificada del Manual de Técnicas para Microscopía Electrónica de Ureña, 1986. Se realizaron algunas adecuaciones en la preparación de las muestras para las micrografías en el microscopio electrónico de transmisión (MET)(Anexo 4). El análisis de las micrografías (MET) se realizó con el apoyo de los trabajos de: Butcher (1952); Wilhelm, *et al*, (1982); Brown y Elfman (1982); Sarokin y Carpenter (1982) y Turner y Gowen (1984).

5.3.- Determinación y optimización de las condiciones de cultivo.

La selección de los medios de cultivo se hizo con el siguiente criterio, el MI CICIMAR es el medio utilizado en el laboratorio rutinariamente, por lo tanto se quería comparar su rendimiento con los medios utilizados por otros autores como Guillard el más comúnmente utilizado, el reportado por Fábregas y el de Nelleys que está basado en fertilizantes; esto permitía comparar entre sí a los medios que utilizan reactivos analíticos con otro medio más económico.

5.3.1.- Determinación de las condiciones de cultivo.

Esta parte del trabajo se dividió en dos fases: la primera se planteó con el propósito de obtener las mejores condiciones de cultivo para *Nannochloris*, para lo que se propuso un análisis tetrafactorial en donde se compara: las dos cepas, CICIMAR 1 y 2; la influencia de los medios de cultivo, elaborados con agua de mar enriquecida con sustancias nutritivas y denominados MI, BETA, FA y FI y los sistemas de cultivo. El medio MI CICIMAR fue diseñado en el laboratorio por medio de un análisis matemático a partir de la tabla de medios del Stein, (1973); el medio BETA fue tomado de Guillard, 1975; el medio FA de Fábregas, 1985; y el medio FI de Nelleys, 1988 (ANEXO 1).

Los sistemas de cultivo utilizados fueron matraz erlenmeyer (2 l con 1.5 l de medio de cultivo) y garrafón (18 l con 16 l de medio de cultivo). El tiempo total de incubación fue de 21 y 28 días y el inóculo fue de $4,500 \times 10^6$ cel/ml.

Las variables respuesta fueron: peso seco, el número de células y la concentración de lípidos totales. Las condiciones ambientales mantenidas a lo largo del período experimental fueron luz (5000 luxes) y aireación continua, y una temperatura promedio de 27 ± 2 °C

La obtención de muestras se hizo en los días 7, 14, 21 y 28 de cultivo; por medio de un análisis de varianza se observó el grado de significancia y se compararon a las interacciones entre: Días, medios, cepas y sistemas sobre los parámetros de respuesta en peso seco, número de células y lípidos.

Para cada una de las determinaciones, todos los muestreos se efectuaron por triplicado de acuerdo al procedimiento señalado en la Tabla 1 y por medio de un análisis tetrafactorial se compararon las dos cepas, los dos sistemas de cultivo, la influencia del medio nutritivo y el efecto del tiempo. Las variables respuesta fueron el peso seco, el número de células y la concentración de lípidos. En su análisis se tomaron en consideración los días 7, 14 y 21 ya que para el día 28 no hubo datos completos para todos los medios, por lo que se eliminó a una de las replicas. Los resultados obtenidos para el medio FI fueron eliminados del análisis final, ya que en el garrafón que contenía a la cepa CICIMAR 2 se presentaba un cambio drástico de pH (de 10) y los cultivos se perdieron (Tabla 2, 3, 4 y 5).

En esta parte del trabajo los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa Statgraphics, observándose la significancia de los factores y el de las interacciones entre ellos, en virtud de que los resultados no reflejaron el tetrafactorial, estos se analizaron con hoja de cálculo elaborada en el programa Quatro Pro (Sokal y Rohlf, 1981).

Al hacer el análisis de los resultados, en la comparación de los dos sistemas de cultivo se observa, que el sistema del matraz fue mejor que el del garrafón. La mayor eficiencia del matraz sobre el garrafón se explica por la cantidad y calidad de luz recibida en el primer cultivo, que fue mejor, posiblemente debido a la transparencia y calidad del vidrio, así como por la forma del recipiente.

De ahí que en la segunda parte del experimento el sistema utilizado haya sido el matraz.

Los resultados alcanzados en esta fase de la investigación permitieron definir el efecto de los diferentes medios de cultivo a partir de lo cual se decidió tomar al medio MI como básico a partir del cual se modifica el balance de la concentración de nitrato y trabajó a nivel matraz, continuando con el contraste de las cepas CICIMAR 1 y CICIMAR 2 a lo largo del tiempo y de esta forma establecer las condiciones para la máxima producción de biomasa.

5.3.2.- Optimización de las condiciones de cultivo.

A partir de los resultados anteriores en la segunda fase del experimento, se propuso cumplir el objetivo de determinar las condiciones de cultivo en las que las cepas CICIMAR 1 y 2 contuvieron la mayor cantidad de lípidos. En esta fase los cultivos se realizaron por triplicado en agua de mar enriquecida con el medio MI variando las diferentes concentraciones de NaNO_3 (0.5, 1.5, 5, 10 mM) en matraces erlenmeyer de 2 l y guardando la relación N:P 15:1; el inóculo fue de $4,500 \times 10^6$ cel/ml. Se mantuvieron constantes las condiciones de temperatura en 26 ± 3 °C, luz y aireación continua, y el tiempo de incubación de 21 días. Los tiempos de cosecha para la Cepa 1 fueron de 7, 10, 12, 19 días y para la Cepa 2 de 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días.

5.4.- Determinación de las variables respuesta.

Peso seco, número de células y concentración de lípidos (Tabla 6, y 7).

5.4.1.- Determinación del Peso seco.

El peso seco se obtuvo gravitacionalmente a partir de 20 ml de cultivo, concentrados por centrifugación, la pastilla se lavó 2 veces con agua destilada, se llevó a sequedad en una incubadora a 80 °C por 24 hrs.

5.4.2.- Determinación del número de células.

Se llevó a cabo por medio del método del Hematocitómetro, con la cámara de Neubauer, el cual fue diseñado para utilizarse con el microscopio de contraste de fases (Stein, 1973).

5.4.3.- Determinación de la fracción lipídica.

Para obtener la fracción lipídica se centrifugaron las células de cada cepa, en las dos fases del experimento y se recolectaron los extractos crudos por medio de extracciones con una mezcla metanol-cloroformo 2:1 (Bligh y Dyer, 1959 modificada por Kates (1964) En: Kates, 1972) y se obtuvieron los lípidos totales, que fueron secados en nitrógeno líquido y llevando a peso constante para su registro gravimétrico (Piorreck *et al*, 1984). Al analizar la cepa CICIMAR 2 se dispuso de un antioxidante (butilato de hidroxil tolueno al 0.05%) el cual se agregó a la fracción clorofórmica del extracto.

Los datos obtenidos de la determinación del peso seco, número de células y lípidos se examinaron por medio de un análisis de varianza considerando a las cepas; la concentración de NO_3 y el tiempo; se determinaron las interacciones entre concentración de nitratos, cepas y tiempo, sobre el peso seco, las cepas y los lípidos totales (Sokal y Rohlf, 1981). A pesar de haberse determinado el contenido de carbohidratos (Dreywood, 1946) y proteínas (Lowry, *et al*. 1951) éstos no fueron analizados estadísticamente.

6.0 RESULTADOS.

6.1.- Caracterización de las cepas CICIMAR 1 y CICIMAR 2.

Se observó al microscopio de contraste de fases la morfología celular de ambas cepas, determinando que se trataba de organismos unicelulares, con células esféricas, de 2 a 5 μm de tamaño y con un cloroplasto parietal sin pirenoide. Las células inmóviles en estado vegetativo, siempre se dividieron en dos. Se observaron la formación de autoesporas de 8 μm , con 3 y 6 células. La célula madura presentó gránulos rojizos. Como resultado de la separación de pigmentos por la técnica señalada en material y métodos, se estableció que por su contenido de clorofila *a*, *b* y carotenos, las cepas CICIMAR 1 y 2 pertenecen a la clase Chlorophyceae y al orden de las Chlorococcales en virtud de que la fase asexual carece de movimiento, se mantiene el crecimiento vegetativo y las células siempre se dividen en dos. (Fig. 1)

Con base en observaciones en el microscopio de luz y en el microscopio electrónico de transmitancia (MET), de la estructura de organelos y de membranas celulares, las cepas CICIMAR 1 y 2 se caracterizaron dentro del género *Nannochloris*, en virtud de que en todo momento se encontraron células pequeñas que se dividían siempre en dos (Fig. 2). En las micrografías se observó que el interior de la célula está en su mayor parte ocupada por el cloroplasto, en donde pueden observarse los tilacoides arreglados en lamelas alargadas (Fig. 3 y 4) y con lamelas en el estroma del cloroplasto que esta rodeado por una doble membrana, con núcleo prominente y una mitocondria que en las micrografías se ve claramente rodeada por una doble membrana.(Fig. 5)

Al microscopio óptico se observó siempre que la reproducción en ambas cepas es por autoesporulación y aunque la secuencia de la evolución de la

autoespora fue difícil de seguir, por un lado porque no siempre se pudo observar en el microscopio de luz y por el otro por la ausencia de secciones seriadas en las preparaciones al microscopio electrónico.

A pesar de que las dos microalgas estudiadas presentan la misma morfología y en consecuencia pertenecen al mismo género, al comparar los resultados obtenidos en la optimización del cultivo, se obtuvieron rendimientos diferentes siendo siempre mejor el de la cepa CICIMAR 2.

6.2.- Optimización de las condiciones de cultivo.

6.2.1.- Fase I del experimento.

En esta 1ª fase del experimento para lograr una mejor comprensión de las relaciones existentes entre los factores biológicos, físicos y químicos que influyeron en la producción algal, se realizó un análisis tetrafactorial de las condiciones de cultivo de las cepas de CICIMAR 1 y 2; comparándose los sistemas de cultivo, la influencia del medio nutritivo, y el efecto del tiempo. Los parámetros que se consideraron fueron el peso seco, número de células, y la concentración de lípidos. Los resultados del análisis de varianza indicaron que los factores: medios, días, sistema y cepas resultaron significativos con $p < 0.05$. Los resultados no explicaban el tetrafactorial, las interacciones y el efecto de las replicas. De ahí que por medio de una hoja de cálculo se hizo el análisis de estos resultados.

A partir de los resultados de la biomasa determinada a través del peso seco para la 1ª fase de los experimentos se obtuvo lo siguiente:



Figura 1. Fotografía al microscopio óptico de las células de *Namochloris* sp Ceba 2, se observa la cápsula materna y el septo de división; las células siempre se dividen en dos.

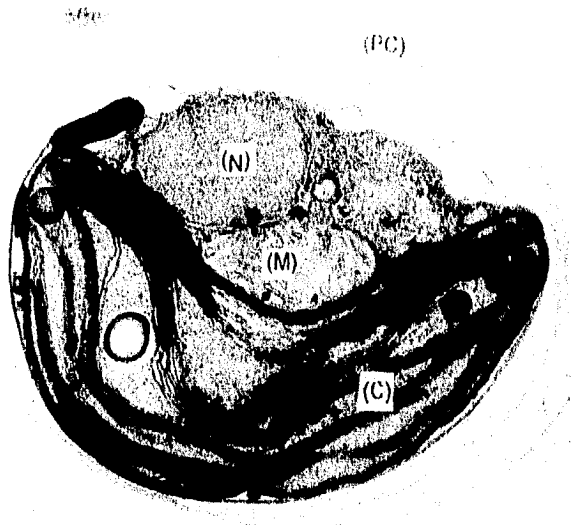


Figura 2. Fotografía al microscopio electrónico que muestra una vista general de la célula de *Nannochloris* sp. Cepa 1 en donde se observa el núcleo (N), mitocondria (M) y cloroplasto (C), la pared celular (PC).



Figura 3. *Nannochloris* sp. Ceba 1, se observa el núcleo (N), la mitocondria (M), la pared celular (PC) y el cloroplasto (C)



Figura 4. Fotografía al microscopio electrónico de *Nannochloris* sp. Ceba 2 en donde se observa el núcleo, la mitocondria, la pared celular, la doble membrana, el plasto con lamelas tilacoidales alargadas.

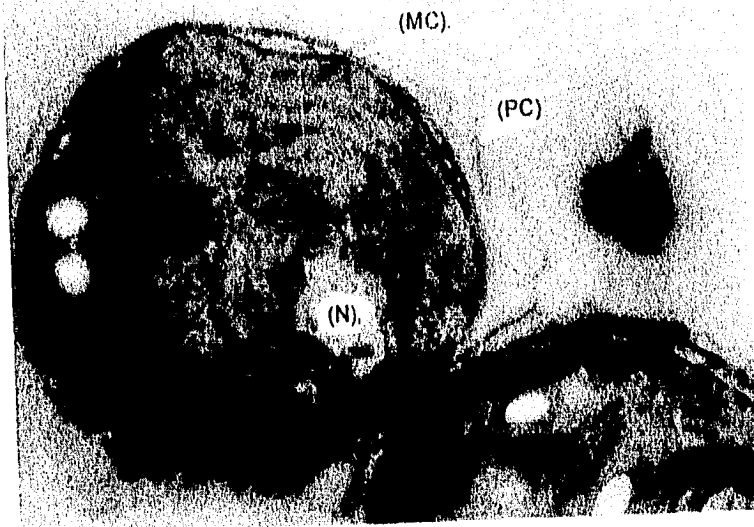
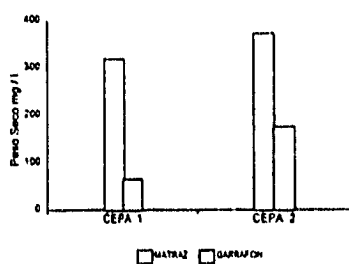


Figura 5. Fotografía de la división celular en *Nannochlans* sp Cepa 2. se observan restos de la capsula, la pared celular (PC), la membrana citoplásmica (MC) y el núcleo (N).

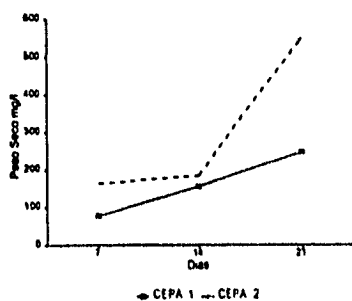
En el análisis de varianza de los pesos secos registrados, las interacciones que resultaron significativas fueron las de cepa-sistema ($p=0.05$) y la interacción triple entre cepa, sistema y días ($p=0.01$) (Tabla 8).

Al analizar los resultados obtenidos se observó que el sistema que resultó más eficiente para el cultivo de las dos cepas, fue el de matraz (fig. 6 a). La Cepa 2 dio valores más altos de biomasa a lo largo del tiempo de cultivo, así como en los dos sistemas utilizados (fig. 6 b y 7). Al comparar los sistemas con el número de días transcurridos hasta la cosecha, el rendimiento más alto se obtuvo en el día 21 para las dos cepas. (fig. 6c, 7 b).

a



b



c

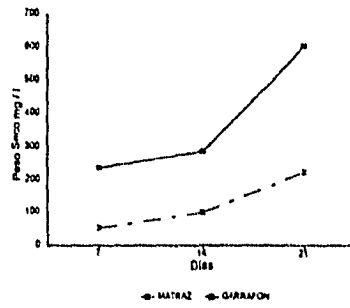
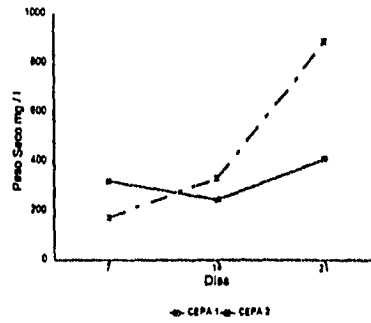


Figura 6. Comparación durante la 1a fase del experimento en el rendimiento del peso seco (mg/l) en las interacciones significativas: a. Cepa/Sistema, b. Cepa/días, y c. Sistema/días.

a



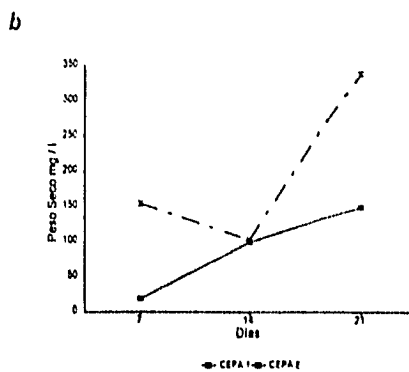


Figura 7. Desempeño en el rendimiento en peso seco (mg/l), de la Cepa 1 y 2 , para cada uno de los sistemas utilizados y a los 7, 14 y 21 días de cultivo: a. Matraz y b. Garrafón

6.2.2.- FASE II del experimento.

En ésta fase el análisis de la cantidad de biomasa calculada de peso seco, se hizo a través de un análisis trifactorial para las Cepas 1 y 2, el cual indicó que las interacciones significativas se dieron entre cepa-concentración ($p < 0.001$) y cepa-días ($p < 0.0005$), y no fueron significativas las interacciones concentración-días y cepa-concentración-días (Tabla 9).

En el análisis de la gráfica de la interacción cepa-concentración se observó que para la Cepa 2 el óptimo se obtuvo en la concentración de 0.5 mM de NaNO_3 y para la Cepa 1 el óptimo se dio en la concentración de 10 mM de NaNO_3 (fig. 8)

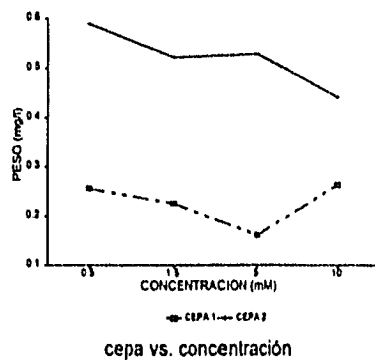


Figura 8. Desempeño en peso seco (mg/l) de las Cepas 1 y 2 cultivadas en 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 .

La gráficas de la interacciones cepa-días y concentración-tiempo indican que el máximo rendimiento lo tenemos el día 19 para la Cepa 2 y el día 12 para la Cepa 1, la diferencia entre ambas cepas es muy marcada siendo la Cepa 2 mucho mejor (fig. 9, 10 y 11)

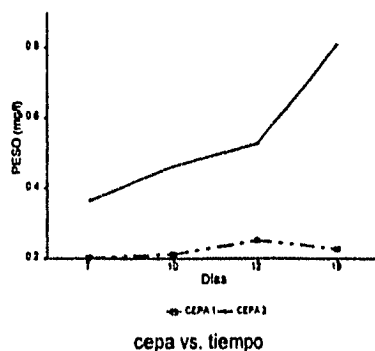


Figura 9. Rendimiento en la obtención del peso seco para las Cepas 1 y 2 a los 7, 10, 12 y 19 días de cultivo.

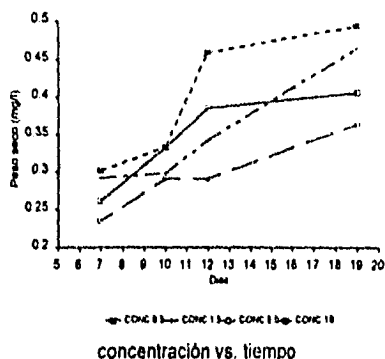
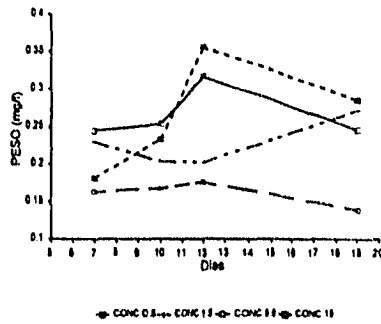


Figura 10. Desempeño en peso seco (mg/l) de las Cepas 1 y 2 en las concentraciones 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO₃ a los días 7, 10, 12 y 19 días de cultivo.

Como resultado del análisis bifactorial del crecimiento de la Cepa 1, la concentración de nitratos fue significativa ($p < 0.0025$), a diferencia del tiempo y la interacción concentración-días (Tabla 10). Analizando la gráfica (fig. 11 a.) se observa que el óptimo se alcanzó el día 12 en una concentración de 0.5 mM de NaNO₃, con una diferencia ligeramente menor en el rendimiento para éste día en la concentración de 10 mM de NaNO₃ y en la concentración 0.5 mM de NaNO₃ en el día 19.

En la Cepa 2 la interacción concentración-tiempo fue significativa ($p < 0.05$) (Tabla 11). La gráfica indica que en el día 19 se alcanzó el óptimo con 5 mM de NaNO₃, con una ligera diferencia en el rendimiento en el día 14 con 1.5 mM NaNO₃ (fig. 11 b). En la gráfica de la interacción concentración-tiempo se observa el óptimo para la concentración 0.5 mM en el día 19 con una ligera diferencia en el día 12 con 0.5 mM y en el día 19 con 1.5 mM, de ahí que concentración y tiempo no sean significativos.

a



b

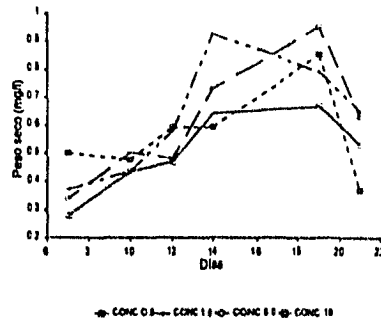


Figura 11. Rendimiento de las Cepas 1 y 2 en peso seco a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , los días 7, 10, 12 y 19: a. Ceba 1 y b. Ceba 2

6.2.3.- Análisis estadístico:

En la primera fase el análisis de varianza del incremento del número de células las interacciones que resultaron significativas fueron: cepa-sistemas ($p=0.001$), cepa-medios ($p<0.1$), y cepa-sistema-medios ($p=0.01$)(Tabla 12). Analizando las gráficas de las figuras 12 y 13 se observó que el sistema que produjo mayor incremento en el número de células fue el del matraz. La Ceba 1

garrafón (fig. 12 a). La Cepa 2 dio un mejor rendimiento en el medio Fa, y la 1 en el medio MI (fig.12 b).

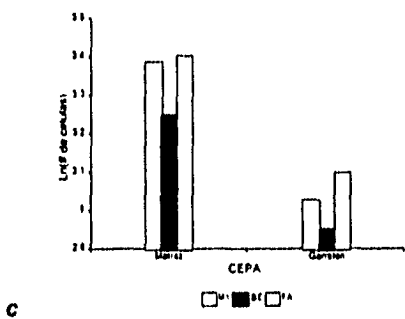
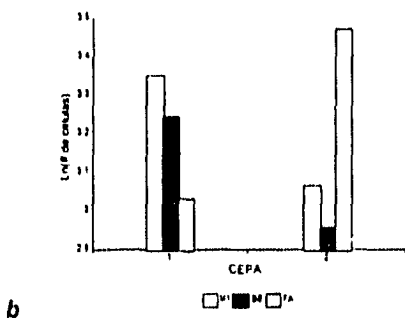
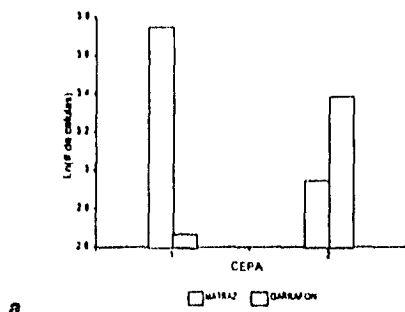


Figura 12. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en número de células (1a fase del experimento) en: a. cepa/sistema; b. cepa/medios y c. sistemas/medios.

En la gráfica de la interacción triple cepas-sistemas-medios se observó que al comparar los rendimientos considerando el número de células, en ambas cepas, el rendimiento óptimo se obtuvo en el medio de Fa (fig. 12 c). Sin embargo al comparar sistemas, cepas y medios, la Cepa 1 dio mejores resultados en el medio MI/MATRAZ. y la 2 fue mejor en MI/GARRAFÓN (fig. 13 a y b). La relación con el tiempo no fue significativa.

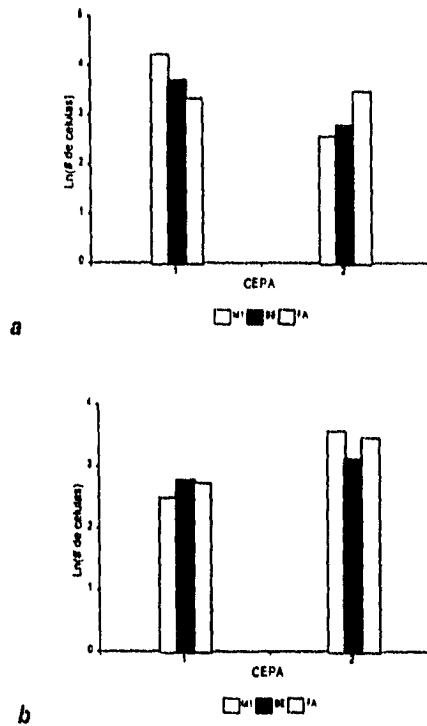
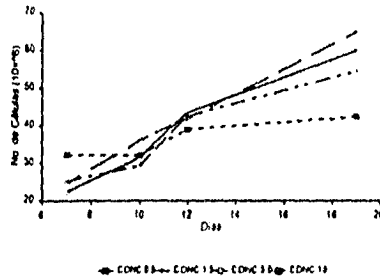


Figura 13. Desempeño en número de células de las Cepas 1 y 2, en cada uno de los sistemas utilizados, con los medios de cultivo MI, BE y FA. a. Matraz y b. Garrafón.

Los resultados del análisis tetrafactorial de la 2a fase indican que las interacciones de cepa/días y concentración/días son significativas ($<<0.001$) y en

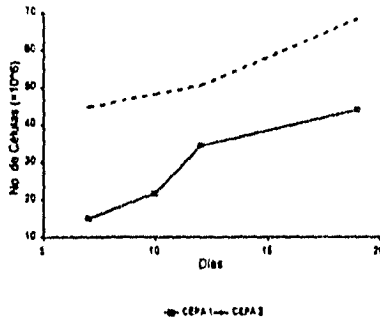
cambio no lo son las de cepa-concentración y cepa-concentración-tiempo, (Tabla 13).

Al analizar las gráficas de la interacción cepa-días se observa que ambas cepas alcanzaron su mejor rendimiento el día 19, sin embargo la Cepa 2 dio mayor rendimiento que la Cepa 1 (fig. 14 y 15).



tiempo vs. concentración

Figura 14. Desempeño en el número de células de las Cepas 1 y 2 cultivadas en 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO₃ durante 7, 10, 12 y 19 días.



cepa vs. tiempo

Figura 15. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en el rendimiento del número de células durante todo el tiempo del cultivo.

En las gráficas de la interacción concentración-tiempo, se observa que el crecimiento fue logarítmico con respecto al tiempo, alcanzando el óptimo el día 19 en la concentración 0.5 mM de NaNO₃ y no hay diferencia entre las concentraciones de 5, 1.5 y 10 mM de NaNO₃ en el día 12 (fig. 14). La interacción concentración-cepa expresada en la gráfica indica que la Cepa 2 es mejor que la 1 y que ambas alcanzaron el óptimo en la concentración 5 mM NaNO₃ (fig. 16).

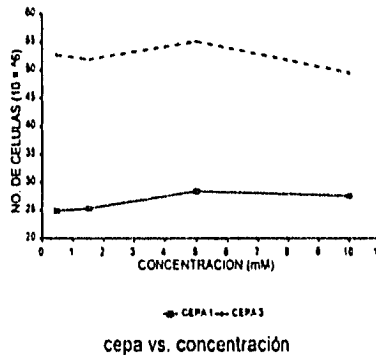
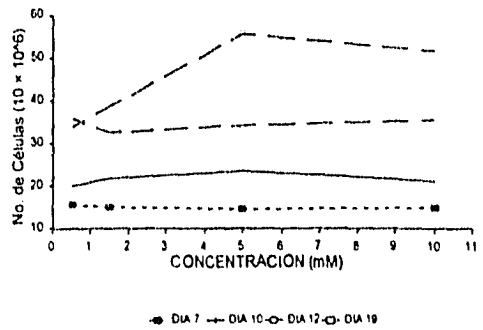
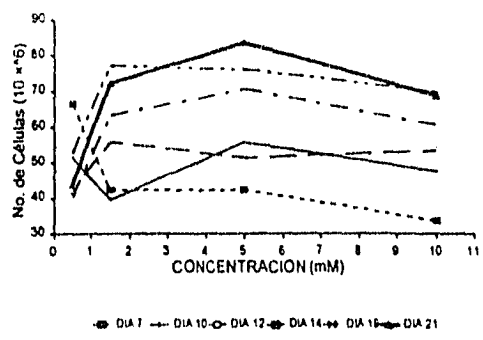


Figura 16. Comparación de las Cepas 1 y 2 en el número de células obtenido a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO₃

El análisis bifactorial del incremento del número de células para la Cepa 1 muestra que en la respuesta los días son significativos ($p < 0.0005$), en contraste al efecto de la concentración de nitratos, o de la interacción concentración-días (Tabla 14). Al analizar las gráficas para la Cepa 1, se encuentra que el óptimo se alcanza en el día 19, a la concentración de 5 mM de NaNO₃ y una diferencia muy pequeña, en relación a lo obtenido a la concentración de 10 mM NaNO₃ (fig. 17 a).



a

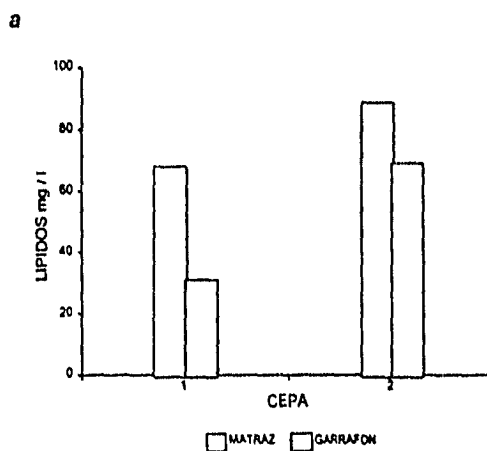


b

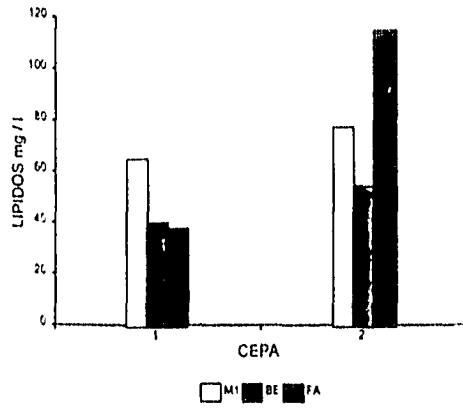
Figura 17. Rendimiento de las Cepas 1 y 2 en el número de células obtenido a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 . a. Ceba 1 y b. Ceba 2

En el análisis bifactorial para la Cepa 2, la interacción concentración-días resulta significativa ($p < 0.005$) y no así, la concentración, ni el tiempo (Tabla 15). En la gráfica se observa que el crecimiento óptimo expresado en células se alcanzó el día 21, a la concentración de 5 mM de NaNO_3 y en el día 19 se alcanzaron a las obtenidas a las concentraciones de 1.5 y 5 mM NaNO_3 (fig. 17 b).

El análisis de varianza de la primera parte del experimento para los lípidos totales señala que las interacciones significativas fueron: cepa-sistema ($p < 0.1$), cepa-medios ($p = 0.025$), cepa-días ($p = 0.025$), sistema-días ($p < 0.1$), medios-días ($p < 0.1$); y en las interacciones triples entre cepa-sistema-medios ($p = 0.01$), cepa-sistema-días ($p = 0.1$), y cepa-medios-días ($p < 0.1$); y no resultaron significativas: sistema-medios-días y cepa-sistema-medios-días (Tabla 16). Al analizar las gráficas de las interacciones se encuentra que: el número de días transcurridos a partir de la inoculación, fue importante, la Cepa 2 tuvo su mejor rendimiento en el día 14, y la 1 el día 21 (fig. 18 c) Dando mejor resultado el cultivo en el matraz (fig. 18 a).



b



c

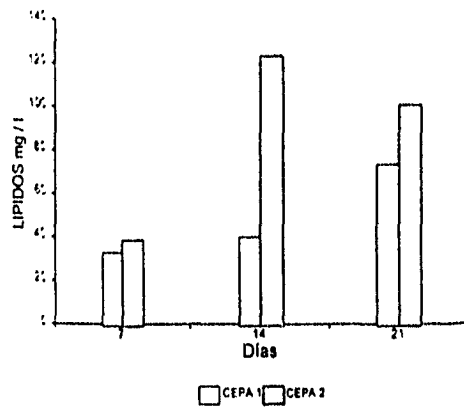


Figura 18. Rendimiento de los lípidos totales (mg/l) en la 1a fase del experimento, (solo las interacciones que resultaron significativas): a. cepa/sistema, b. cepa/medios, y c. cepa/días.

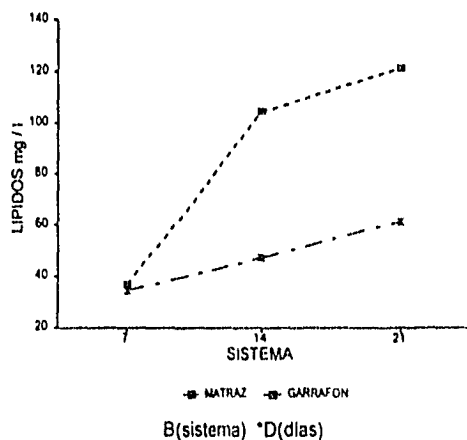


Figura 19. Rendimiento de lípidos totales de los sistemas de cultivo en relación al tiempo, en los medios MI, BE y FA y a los 7, 14 y 21 días de cultivo.

Al comparar los Medios y su respuesta en el tiempo, FA y BE dieron el mejor rendimiento en el día 14 (fig. 21 y 24 b y c), el medio MI tuvo un rendimiento sostenido hasta el día 21 (fig. 21, 24 a).

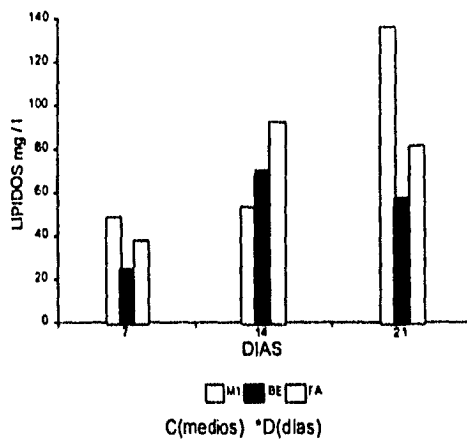
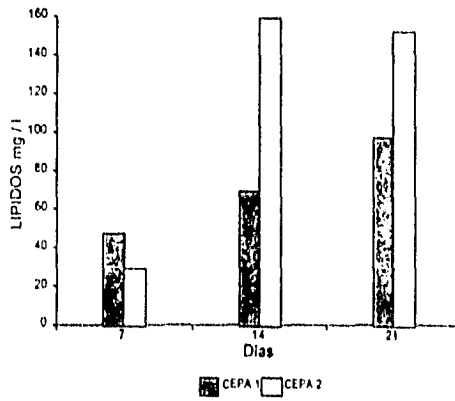


Figura 20. Rendimiento en lípidos totales obtenidos en los medios de cultivo MI, BE y FA, a los 7, 14, y 21 días.

a



b

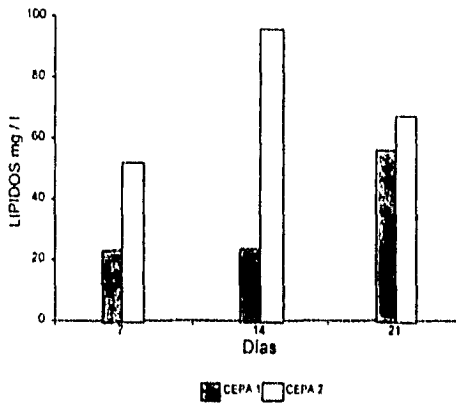


Figura 21. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en la 1a fase del experimento, en el rendimiento de los lípidos totales, en los dos sistemas utilizados, a los 7, 14 y 21 días de cultivo. a: Matraz, b: Garrafón

La Cepa 2 produjo mayor cantidad de lípidos y en consecuencia resultó más eficiente, en el día 14 (fig. 18 c, 22, 23 a y b)

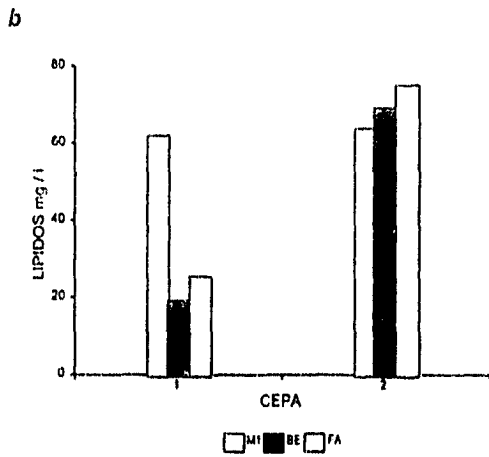
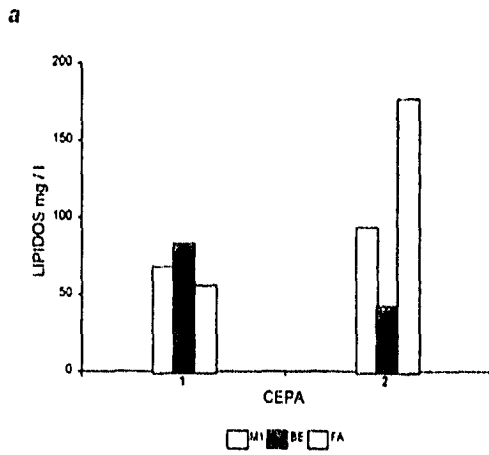
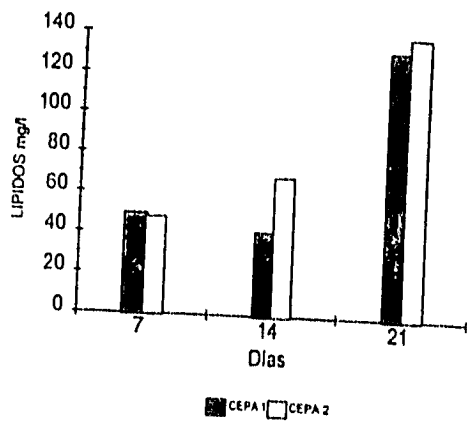
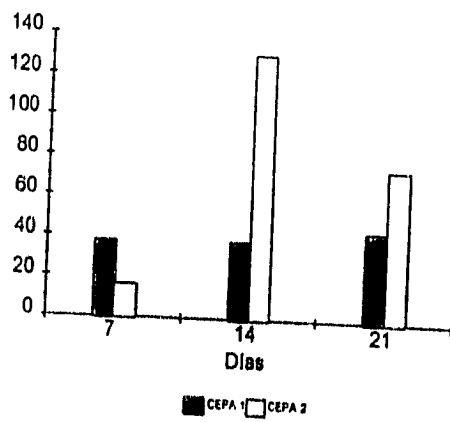


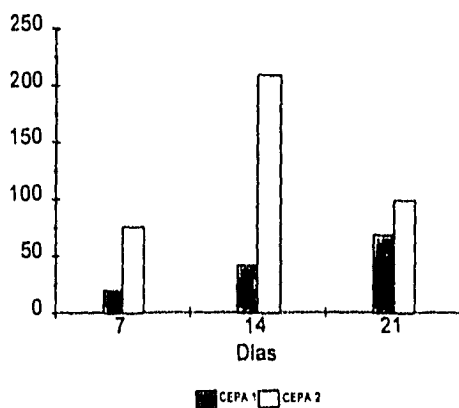
Figura 22. Desempeño de las Cepas 1 y 2, en la 1a fase del experimento en la obtención de lípidos totales, en cada uno de los sistemas utilizados para cada uno de los medios de cultivo. a. Matraz y b. Garrafón



MI



BE

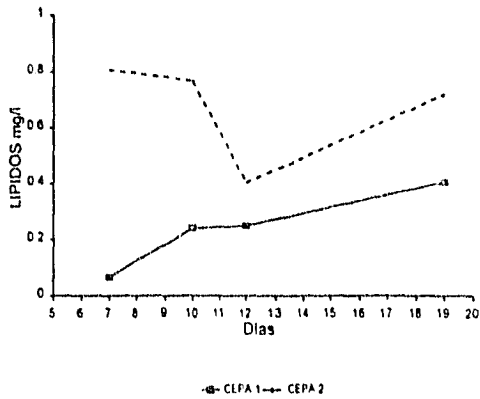


FA

Figura 23. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en el rendimiento de lípidos totales en cada uno de los medios de cultivo utilizados, a los 7, 14 y 21 días de cultivo.

A través de un análisis trifactorial se analizaron los resultados en la segunda fase para lípidos totales, observándose la respuesta en el tiempo, en que resultó significativa la interacción cepa-días ($p < 0.0005$). No lo fueron las interacciones cepa-concentración, concentración-días y cepa-concentración-días (Tabla 17).

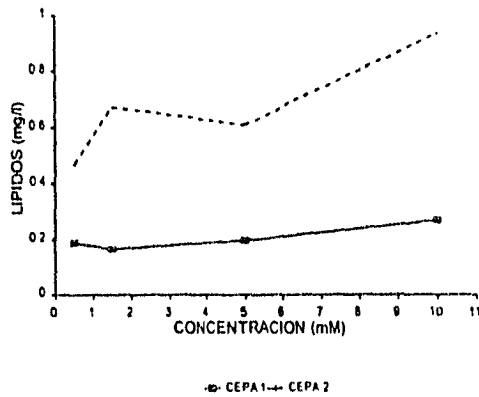
Al analizar la gráficas de la interacción cepa-días se observa que la Cepa 2 es mejor que la 1 y que alcanzó el óptimo de lípidos totales en el día 7, con una pequeña diferencia con el día 10, la Cepa 1 alcanzó el óptimo el día 19 (fig. 24).



cepa vs. tiempo

Figura 24. Rendimiento de lípidos totales obtenidos para las Cepas 1 y 2 en la 2a fase del experimento, a los 7, 10, 12 y 19 días de cultivo.

En las gráficas de las interacciones entre la concentración-cepa se observa para las dos cepas que el óptimo en lípidos totales se alcanzó con la concentración 10 mM NaNO_3 , siendo la Cepa 2 la mejor (fig. 25 a). En la gráfica de la interacción concentración-días, el óptimo en lípidos totales se alcanza el día 10 a la concentración 10 mM de NaNO_3 y en el día 19 no se manifiesta una diferencia entre las concentraciones de NaNO_3 utilizadas (fig. 25 b).



a

b

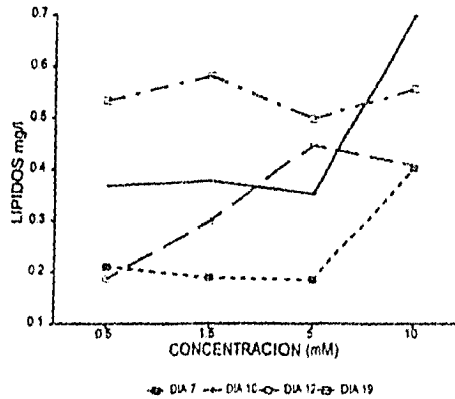


Figura 25. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en la obtención de lípidos totales, a las concentraciones 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 : a. cepa concentración y b. concentración/tiempo.

El análisis bifactorial de lípidos totales para la Cepa 1 indicó que la respuesta en el tiempo es significativa ($p < .0005$) (Tabla 18), y en las gráficas de la interacción concentración-días se observa que el óptimo se obtiene en el día 19 a la concentración 0.5 mM de NaNO_3 y el día 12 a la concentración 5 mM de NaNO_3 (fig. 26 a).

En el análisis bifactorial de los resultados del rendimiento de lípidos totales para la Cepa 2, no se observan diferencias significativas a las concentraciones utilizadas (Tabla 19). Al comparar los rendimientos obtenidos a lo largo del tiempo de cultivo, el día 10 dio mejor rendimiento a 10 mM NaNO_3 (fig. 26 b.).

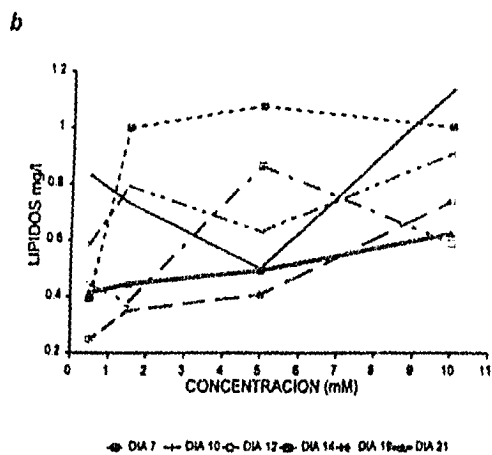
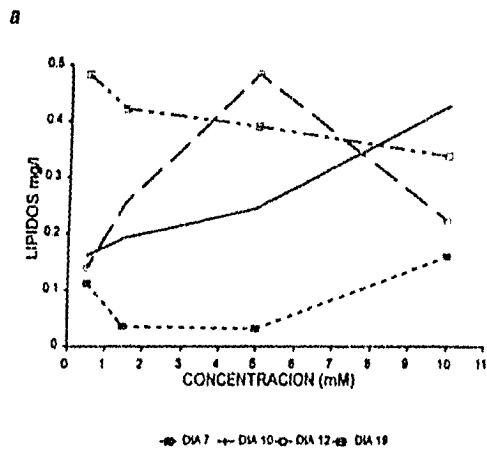


Figura 26. Desempeño de las Cepas 1 y 2 en la producción de lípidos totales a las concentraciones 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 a los 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de cultivo. a: Cepa 1 y b: Cepa 2

7.0 DISCUSION

El interés en la optimización de cultivos de *Nannochloris* spp., productores de lípidos, reside en que las microalgas de este género forman parte de las dietas básicas en la alimentación moluscos y larvas de peces así como de invertebrados utilizados en las cadenas tróficas complejas. La hipótesis sustentada en este trabajo es que al cultivar cepas marinas del género *Nannochloris* spp. bajo diferentes condiciones, es factible encontrar alguna condición que produzca el máximo rendimiento en biomasa y en lípidos, ya que está demostrado que la fracción lipídica, es la fracción determinante del valor nutritivo de la especie algal y que la porción de lípidos insaturados, especialmente los lípidos conocidos como omega-3, tales como los ácidos eicopentaénico, linoléico, linolénico y araquidónico, que son esenciales tanto en la nutrición de intermediarios de la cadena trófica, como en consumidores "tope" como los peces y el hombre (Witt *et al*, 1981, Ben-Amotz y Tornabene, 1985; Hamdy y Martin, 1986; Ben-Amotz, *et al*, 1987; Frolov, *et al*, 1991; Navarro, *et al*, 1992; Crawford *et al*, 1989 y Vergroidsen, 1989 citados En: Ahlgren *et al*, 1992; De Paw y Persone, 1988 En: Renaud *et al*, 1994).

Para la caracterización sistemática de las cepas de *Nannochloris* spp. utilizadas, se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

a.- La descripción original del género *Nannochloris* fue hecha por Naumann en 1921, (Sarokin y Carpenter, 1982), quien describe a *Nannochloris* como una cloroficea unicelular, con cloroplasto parietal, pared celular transparente libre de mucus y con división por fisión transversa en dos células hijas iguales.

b.- El que otros autores como Butcher (1952), consideren que el género *Nannochloris* no existe y que estas microalgas pertenecen al género *Chlorella* describiéndolas como *Chlorella marina*.

c.- La revisión del género hecha por Fritsch en 1949 (Brown y Elfman, 1982), establece que las diferencias entre el género *Chlorella* y *Nannochloris*, reside en la presencia o ausencia (respectivamente) de autoesporas.

d.- Otras revisiones del género hechas por Parke y Dixon, (1976) y Wood, (1979) En: Brown y Elfman, 1982, permiten establecer que además de las características generales señaladas por Naumann, algunas cepas de *Nannochloris* presentan una membrana que las envuelve y autoesporas.

Las dos cepas utilizadas en este trabajo llenan estas características: son unicelulares, de 1 a 5 μm , con membrana materna, cloroplasto parietal, con autoesporas y/o división siempre en dos células hijas iguales. Así mismo la observación de las cepas de *Nannochloris* al microscopio electrónico de transmisión, coinciden con las descripciones hechas por Sarokin y Carpenter (1982) (fig. 3).

En consecuencia las cepas CICIMAR 1 y 2 corresponden al género *Nannochloris* y es interesante hacer notar que al trabajar con estas especies pequeñas de clorofíceas, los autores como Lewin (comunicación personal) no las manejan como especies.

El aislamiento y caracterización de los pigmentos fotosintéticos permitió reconocer a las cepas seleccionadas como clorofíceas (clorofilas a y b) y

diferenciarlas de *Nannochloropsis*, una microalga muy en boga en la acuicultura que pertenece a la nueva división Eustigmatophyceae y que carece de clorofila b

(Owens *et al*, 1987). Lo anterior es de considerable importancia para entender la posición filogenética del género *Nannochloris*.

Se ha reconocido el proceso de reproducción a partir del mecanismo primitivo de autoesporulación hasta la verdadera división celular, que es la clave en el desarrollo de algas con formas de talos complejos y de las plantas terrestres (Pickett-Heaps, 1975). Si se puede encontrar una cepa de *Nannochloris* sp. que tenga una verdadera división celular en la cual el material de la pared parental sea retenido para convertirse en parte de las paredes de las células hijas, entonces es una Coccomyxaceae del orden de las Chlorosphaerales (sensu Herndon, 1958 En: Lewis y Elfman, 1982). Sin embargo con base en los datos recabados esta alga pertenece a las Chlorococcales por presentar autoesporulación.

La falta de información sobre la ultraestructura y fisiología del género es incomprendible, dado la importancia ecológica de las microclorofíceas en ambientes oceánicos y costeros, medida por la abundancia de clorofila b (Jeffrey, 1976 En: Brown y Elfman, 1982; Johnson y Sieburth, 1982 En: Lewis y Elfman, 1982). Además en acuicultura tiene una gran importancia por sus buenos rendimientos y por la facilidad de su cultivo (Witt, *et al*, 1981).

Los resultados obtenidos a partir de su patrón de crecimiento en los cultivos nos permite concluir que efectivamente CICIMAR 1 y 2 son cepas distintas, aunque del mismo género, si bien en este trabajo no se llegó a la determinación de especie en virtud del difícil acceso que se tiene para utilizar la microscopía

electrónica, así como las dificultades que se tuvieron para caracterizar a las fracciones lipídicas.

El objetivo principal del trabajo, fue el de determinar las curvas de crecimiento en cultivos estáticos de las cepas de *Nannochloris* sp. CICIMAR 1 y 2, y de esa forma conocer el tiempo óptimo de cosecha, dentro del período de máximo rendimiento en cuanto a su composición química, haciendo énfasis en la composición de la fracción lipídica.

Es muy importante identificar los factores que limitan el crecimiento y desarrollo celular de una especie, en particular si el objetivo final es utilizarla en el sostén de cadenas tróficas, ya que estos factores son determinantes para obtener buenos rendimientos en acuicultura (Renaud, *et al* 1994).

Es típico de las algas en la naturaleza dar dos respuestas a los cambios de los factores limitantes: en el rendimiento final o en la tasa de crecimiento. En este trabajo se usaron sistemas de cultivo estáticos (discontinuos) donde el crecimiento y la productividad dependen del tamaño del inoculo, de la fase del cultivo y de la relación entre los nutrientes N y P.

Según Richmond (1986), los requisitos para optimizar un cultivo, son: conocer la concentración adecuada de nutrientes, buscar una coordinación entre la tasa de crecimiento y la utilización de los nutrientes. Buscar la producción sostenida y la estandarización de la cosecha a intervalos periódicos con reemplazamiento del medio de cultivo en forma continua o semicontinua.

Para poder cultivar y establecer altas densidades de microalgas en cualquier sistema de cultivo es necesario aprovechar los factores físicos

esenciales en sus niveles óptimos. Estos factores incluyen: Iluminación, control de temperatura, control del aire (para control de pH y provisión de CO₂), características del recipiente de cultivo.

Tomando en consideración todo lo anterior, la selección de los medios de cultivo se hizo con el siguiente criterio, el MI CICIMAR era el medio utilizado en el laboratorio rutinariamente y por lo tanto se quería comparar su rendimiento con los medios utilizados por otros autores como Guillard (1975) el más comúnmente utilizado, el reportado por Fábregas (1985) y el de Nelleys (1988) que está basado en fertilizantes; esto permitía comparar entre sí a los medios que utilizaban reactivos analíticos con otro medio más económico. Al analizar los resultados obtenidos se observa que en los medios MI y FA se obtuvieron los mejores resultados, sin embargo se considero que el medio FA es un medio de cultivo más caro que el MI, ya que utiliza como regulador de pH Tris y cuando se requiere preparar volúmenes mayores a los utilizados en el experimento encarece el medio de cultivo. En el medio de cultivo FI se obtuvieron buenos resultados y es un medio de cultivo económico porque utiliza fertilizantes, sin embargo los resultados en el garrafón no fueron satisfactorios porque presentó un cambio drástico de pH, propiciando la muerte de los cultivos a los 10 días, de esta forma no se pudo hacer la comparación entre todos los medios. De ahí que el medio MI fue el que se utilizó en la segunda fase del experimento.

Por otro lado al hacer el análisis de los resultados se observa, en la comparación de los dos sistemas de cultivo, que el sistema del matraz fue mejor que el del garrafón. La mayor eficiencia del matraz sobre el garrafón se explica por la cantidad y calidad de luz recibida en el primer cultivo, que fue mejor, posiblemente debido a la transparencia y calidad del vidrio, así como por la forma

del recipiente. De ahí que en la segunda parte del experimento el sistema utilizado haya sido el matraz.

En el cultivo la radiación es difícil de medir ya que conforme el cultivo crece, la turbidez también se incrementa atenuando la radiación recibida. Al mismo tiempo la forma que tienen los sistemas de cultivo hace muy difícil medir el promedio de la intensidad luminosa recibida dentro del cultivo, sin embargo las réplicas demuestran que la atenuación de la intensidad luminosa es similar en los triplicados. De ahí que en el caso que nos ocupa, los cultivos están fotoadaptados, ya que fueron cultivados en el laboratorio de manera subsecuente y por lo tanto mantuvieron un crecimiento equilibrado.

Los resultados del análisis de varianza señalan que el máximo rendimiento de los cultivos, tanto en biomasa seca, como en número de células y de lípidos, varía en función del tiempo, de la cepa y de la concentración de nitratos. Estos parámetros permiten seleccionar el día de cosecha de acuerdo al interés del productor, ya que es factible combinarlos para obtener una mayor calidad del producto a menor costo, además de acuerdo con la tendencia actual es posible obtener cultivos que satisfagan los requerimientos específicos de los consumidores.

En relación a los nutrientes es de gran importancia interpretar el papel que juegan los diferentes elementos minerales y las condiciones de cultivo en el desarrollo y la productividad del fitoplancton, ya que no existe una distinción clara de su efecto, por ejemplo:

El carbono inorgánico disuelto puede encontrarse en forma de CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- y CO_3^{2-} y la proporción de estas formas químicas depende del pH y la salinidad del medio. Por arriba de pH 8 todo el carbono está en forma de carbonatos y además la concentración relativa del C inorgánico determina el pH (Richmond, 1986).

La fijación fotosintética del CO_2 produce un incremento en el pH del medio de suspensión sin alterar la alcalinidad, por lo que los cambios en él junto con el valor inicial de alcalinidad por carbonato se pueden utilizar para controlar los cambios en la concentración neta de carbón inorgánico. En los experimentos realizados, la variabilidad en el pH no fue significativa (de 8.3 a 9).

Es ampliamente reconocido que la tasa de crecimiento algal y el rendimiento en biomasa, están determinados por la abundancia de un solo nutriente, y en consecuencia su suministro debe ser lo más cercano al que requieren las células en crecimiento, para evitar que el exceso en concentración alcance niveles tóxicos. Lo anterior fue corroborado por Rhee (1978) y Terry 1970, 1980 (En: Terry *et al*, 1985), quienes utilizando diferentes concentraciones de nitrógeno y/o fosfato, o de vitamina B₁₂ y fosfato; definieron estas relaciones como críticas, concluyendo que las cuotas de ambos nutrientes deberán aumentarse para incrementar la tasa de crecimiento.

Los requerimientos nutricionales de fosfatos (PO_4)⁻³ varían de especie a especie, pero la mayoría de las algas presentan poca o mediana tolerancia a éste ión, elemento accesible como ácido fosfórico (H_2PO_4 -2). La absorción del ión fosfato en general es dependiente de la luz, de la concentración del ión en el medio, del pH y en algunas especies de algas de la presencia de Na^+ , K^+ ó Mg^{+2} .

Algunos síntomas de deficiencia de este elemento en algas son similares a los del nitrógeno. Cuando el fósforo es limitante, la célula tiende a disminuir el contenido de proteínas, de clorofila *a*, de RNA y de DNA, incrementándose los carbohidratos (Mostert y Grobbelaar, 1987).

Por otro lado la producción de biomasa algal está basada en la maquinaria fotosintética que convierte la energía luminosa en energía química almacenada; sin embargo en los ambientes acuáticos la luz presenta gradientes característicos y en un cultivo se tiene que afrontar el problema de su atenuación vertical, relacionada con la profundidad y los cambios fotoadaptativos resultantes de la capacidad de las algas unicelulares, para ajustar fisiológicamente el aparato fotosintético a un campo luminoso dado, optimizando en esta forma la capacidad fotosintética de la célula (Morris, 1981).

Las curvas de crecimiento de los cultivos presentan las 3 fases descritas habitualmente: una fase de latencia (muy poco definida); una fase de crecimiento acelerado (exponencial), que se alcanza hasta el día 9 en las cepas de *Nannochloris* usadas y una fase estacionaria.

Por otro lado los resultados de los experimentos señalan que hay efecto del tiempo y de los medios utilizados en la producción tanto de biomasa seca como de lípidos totales, pero no para el número de células, donde el tiempo no fue significativo, solo lo fueron los medios y el sistema. Por lo anterior, la Cepa 2, en la primera parte de los experimentos, produjo mayor biomasa en el día 21, así como la mayor cantidad de lípidos totales en el medio de cultivo de FA a los 14 días. Por otro lado la Cepa 1 tuvo un rendimiento mayor en lípidos el día 21 y en el medio de cultivo MI presentó una producción sostenida de lípidos a lo largo de

la curva de crecimiento. En el medio de cultivo de FA las cepas alcanzaron el número de células más alto.

En la primera fase del experimento es importante resaltar que al comparar las interacciones entre la relación que guardan los diferentes medios con los días, o con la materia seca o con la concentración de lípidos, se encuentra que el tiempo de incubación para una mayor producción esta entre los días 19 al 21.

En la segunda fase del experimento, al comparar las interacciones, entre las relaciones cepa/concentración y cepa/tiempo con peso seco, en la Cepa 1 fue significativa la concentración y en la Cepa 2 la relación concentración/días. La mayor producción de peso seco se alcanza el día 12 para la Cepa 1 y el día 19 para la Cepa 2.

En lo referente al número de células las interacciones significativas son: cepa/tiempo y concentración/tiempo. Para la Cepa 1 fueron significativos los días y para la 2 la concentración/días. El mayor número de células se obtuvo en el día 19, en la Cepa 1 y del día 19 al 21 la Cepa 2.

En la producción de lípidos totales resultaron significativas tanto las cepas como los días, en la Cepa 1 fueron significativos los días y en la 2 no tuvieron significancia, dando la impresión de que la concentración de lípidos no cambió a lo largo de todo el experimento. La mayor producción de lípidos totales en la Cepa 1 se obtuvo el día 19 y en la 2 los días 7 y 10. Según Hodgson *et al.* (1991) y Dunstan *et al.* (1993), aparentemente la cantidad de lípidos a lo largo del tiempo de incubación es la misma y lo único que varía son las proporciones entre sus distintas clases. Según Petkov *et al.* (1994) al utilizar en los medios de cultivo varias fuentes nitrogenas, la relación de los ácidos grasos no cambia significativamente.

En todos los experimentos realizados al comparar los resultados, obtenidos con la Cepa 2 el rendimiento fue mayor que los de la Cepa 1; esto se explica como una respuesta fenotípica que ha dado las bases para modelar el crecimiento de la población algal, sin embargo un factor que puede limitar esta aproximación autoecológica es la variabilidad genética, tanto entre diferentes clonas de organismos morfológicamente indistinguibles, como entre especies taxonómicamente diferentes. Se han encontrado diferencias significativas en las tasas de crecimiento de diferentes clonas aisladas de la misma masa de agua, lo que permite señalar una variabilidad en el crecimiento clonal, ya que las tasas de crecimiento de diferentes poblaciones están caracterizadas por coeficientes de variación que van de 3 a 12 % bajo condiciones controladas (Brand, 1981 En: Geider y Osborne, 1992).

Los incrementos en las variables presentan una gran variación en los resultados, ya que a pesar de que el número de células es alto no guarda una proporción con el incremento en peso seco, esto se puede deber a los cambios en el volumen celular producidos por la limitación de nutrientes o bien a un aumento en la salinidad, en el trabajo la salinidad no se midió sistemáticamente, pero si se manifestó un incremento de 35 a 37 ppm.

Se cree que el estrés nutricional es uno de los factores importantes que influyen en la liberación extracelular de compuestos orgánicos (Wangersky, 1978, En: Parrish y Wangersky, 1987), de ahí que la accesibilidad de nutrientes tiene una gran influencia en la composición de varias microalgas. Spoher y Milner (1949) fueron los primeros en demostrar que la deficiencia de nitrógeno inducía el incremento del contenido de lípidos, de tal manera que el porcentaje total de la masa celular es debida a los lípidos.

Al cultivar clonas microalgales bajo condiciones experimentales idénticas, se puede examinar la variabilidad en las tasas de crecimiento específico, en las tasas fotosintéticas o bien en la composición bioquímica, y ya que pueden atribuirse a una variación genética, si se hacen tales comparaciones, se puede explicar la mayoría de la variabilidad interespecífica entre microalgas (Banse, 1982 En: Geider y Osborne, 1992). El tamaño celular es una fracción significativa de la variabilidad interespecífica; como las tasas de los procesos metabólicos dependen del tamaño, de las tasas metabólicas específicas disminuyen cuando este aumenta. Esta dependencia alométrica en microalgas se hace evidente solo cuando se comparan organismos con un intervalo amplio, sin embargo la composición bioquímica en conjunto muestra poca dependencia a el tamaño (Chan, 1978, Hitchcock, 1982, Schlesinger *et al*, 1981 En: Geider y Osborne, 1992).

Los incrementos para cada una de las variables son congruentes con el tiempo de incubación.

La cuota celular de lípidos, sus clases y su composición en ácidos grasos acilados están correlacionadas con la tasa de división celular en cualquier punto particular de la curva de crecimiento; al mismo tiempo la distribución de la fase de división de las células microalgales en los cultivos estáticos, puede tener un papel fundamental en la determinación de la composición lipídica de los cultivos cuando estos se consideran como un todo: por otro lado hay que recordar que las células involucradas en una división rápida poseen una baja proporción de triglicéridos y una proporción alta de lípidos estructurales (Hodgson *et al*. 1991).

La misma variación encontrada en la respuesta de ambas cepas a las diferentes relaciones de los nutrientes N/P, expresada en la biomasa, se encontró en la cantidad de lípidos totales determinados. Los análisis bifactoriales y trifactoriales indican que no hay diferencias significativas en el comportamiento de las cepas en cuanto a la concentración, pero existe una diferencia significativa entre las cepas y el tiempo.

8.0 CONCLUSIONES

- 1.- Las dos cepas aisladas en este trabajo, pertenecen al genero *Nannochloris* spp

- 2.- El máximo rendimiento de los cultivos esta relacionado con el tiempo, los medios utilizados y la cepa, por lo tanto se pudo constatar que la cepa CICIMAR 1 y 2 se comportan de forma distinta, de tal manera que la Cepa 2 tiene mejores rendimientos que la Cepa 1.

- 3.- En la 1a fase del experimento en el medio de cultivo FA se obtuvieron mejores rendimientos entre los días 19 y 21. No obstante se decidió emplear el medio MI CICIMAR porque a pesar de sostener rendimientos ligeramente menores que el medio FA es significativamente más económico.

- 4.- Al comparar los dos sistemas de cultivo los resultados indican que el matraz es mejor que el garrafón.

- 5.- En la 2da fase del experimento de los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de cultivo, se concluye que el día de cosecha para la máxima biomasa esta entre el día 10 y 14.

BIBLIOGRAFIA

- AHLGREN, G. I.B. GUSTAFSSON y M. BOBERG, 1992. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *J. Phycol.* 28:37-50.
- BARCLAY, W. y L. CHENG, 1990. Microalgal strain selection: Perspectives on the development of algae for lipid production. *Bull. Mar. Sci.* 47(1):253-263.
- BECKER, E.W, 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. In: Richmond A (ed.), *CRC. Handbook of Microalgae Mass Culture*. CRC Press. Boca Raton Florida. pp 339-420.
- BEN-AMOTZ A., T.G.TORNABANE y W.H.THOMAS, 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21:72-81.
- BEN-AMOTZ A., R. FISHLER y A. SCHENELLER, 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.* 95:31-36.
- BEN-AMOTZ. A., 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). *J. Plant Physiol.* 131:479-487.
- BENEMANN, J.R., 1992. Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.* 4:233-245.
- BLIGH, E.G. y DYER W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37(8):911-917.

- BOLD, H.C. y M.J. Wynne, 1978. Introduction to the algae. Structure and Reproduction. Prentice-Hall Biological Sciences Series pp 63-246.
- BOROWITZKA, M.A., 1986. Micro-algae as sources of fine chemicals. Microbiol. Sci. 3: 372-375.
- BOROWITZKA, M.A., 1988. Algal growth media and sources of algal cultures. In: M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka (Eds.). Micro-Algal Biotechnology. Cambridge University Press, New York. pp 456-465.
- BRAND, L.E. y R.R.L. GUILLARD, 1981. The effect of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 50:119-132.
- BROWN, L.M. y B. ELFMAN, 1982. Is autosporulation a feature of *Nannochloris*?. Can.J.Bot. 61:2647-2657.
- BURLEW, J.S. (ed.) (1953). Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, pp 357
- BUTCHER, R.W., 1952. Contributions to our knowledge of the smaller marine algae. J. Mar. Biol. Assoc. 31:175-191.
- CHAPMAN, D.J. y K.W. GELLENGECK., 1989. An historical perspective of algal biotechnology. In: Algal and Cyanobacterial Biotechnology Cresswell, R.C., T.A.V. REES y N. SHAH eds. Longman Scientific Technical, UK pp 1-23.

- CID, A., J. ABALDE y C. HERRERO, 1992. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suocica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae). *J. Appl. Phycol.* 4:31-37.
- De PAUW, N., J. MORALES y G. PERSOONE, 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems. Progress and constraints. *Hidrobiologia* 116/117:121-134.
- De PAUW, N., J. VERBOVEN y C., CLAUS, 1983. Large-scale microalgal production for nursery rearing of marine bivalves. *Aquacult. Eng.* 2:27-47.
- DREYWOOD, R., 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18:499.
- DUNSTAN, G.A., J.K.VOLKMAN, S.M.BARRETT y C.D.GARLAND, 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5: 71-83.
- FABREGAS, J., C. HERRERO, 1985. Marine microalgae as a potential source of single cell protein (SCP). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:110-113.
- FABREGAS, J. y C. HERRERO, 1986. Marine microalgae as potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture* 51:237-243.

- FABREGAS, J., C. HERRERO, B. CABEZAS y J. ABALDE, 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentration. *Aquaculture*, 49:231-244.
- FABREGAS, J., J. ABALDE, B. CABEZAS y C. HERRERO, 1989. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea. *Aquacul. Eng.* 8:223-239.
- FRITSCH, F.E., 1965. *The Structure and Reproduction of the Algae*. Vol 1. Cambridge University Press pp1-198.
- FROLOV, A.V., S.L. PANKOV, K.N. GERADZE, S.A. PANKOVA y L.V. PEKTOROVA, 1991, Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Biochemical composition of *Brachionus plicatilis* and its food. Elsevier Science Publishers B.V. pp 181-202.
- FULKS, W. y K.L. MAIN (Eds), 1991. *Rotifer and Microalgae Culture Systems*. Proceedings of a U.S.- Asia Workshop. Honolulu, Hawaii. The Oceanic Institute Makapuu Point. pp 3-46.
- GEIDER, R.J. y B.A. OSBORNE, 1992. Algal Photosynthesis. The measurement of algal gas exchange. *Current Phycology* 2. Ed. Chapman and Hall pp1-258.

- GUILLARD, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in Smith, W.L. y M.H. Chanley eds. Culture of marine invertebrate animals. Plenum Press, New York. pp 29-60.
- GRIFFITHS, D.V., 1973. Factors affecting the photosynthetic capacity of laboratory cultures of the diatom *Phaeodactylum tricomutum*. Mar. Biol. 21:91-97
- GROBBELAAR, J.U., 1990. Modeling algal productivity in large outdoor cultures and waste treatment systems. Biomass 21:297-314.
- GUDIN, C., 1987. Why bother with microalgae? In: Algal Biotechnology Stadler, T., J.Mollion, M.C.Verdus, Y.Karamanos, H.Morvan y D. Christianen (eds). Elsevier Applied Science pp 33-53.
- HAMDY, A. y D.F. MARTIN, 1986. A comparison of fatty acids and sterols in two significant Florida marine algae, *Ptychosicus brevis* y *Nannochloris* sp.. Fla Scient. 49 (1):1-6.
- HARRISON, P.J., P.A. THOMPSON y G.S. CALDERWOOD, 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. J. Appl. Phycol. 2:45-56.
- HODGSON, P.A., R.J. HENDERSON, J.R. SARGENT y J.W. LEFTLEY, 1991. Patterns of variation in lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture I. The growth cycle. J. Appl. Phycol 3:169-181.

- KATES, M., 1972. Isolation, analysis and identification of lipids. In: T.S. WORK AND E. WORK (Edit). Techniques in lipidology. Elsevier, Amsterdam, pp.268-618.
- IRVINE, D.E.G. y D.M. JOHN, 1984. Systematics for the green algae. The systematics association special volume No. 27. Systematics Association, Academic Press 1-449.
- LEWIN, R.A., 1989. A simple method for separating chlorophylls a and b from algae. Marine Biology Research Division, Scripps Inst. Ocean pp1-2.
- LEWIS, M. B. y B. ELFMAN, 1982. Is autosporeulation a feature of *Nannochloris*?. Can. J. Bot. 61: 2647-2656.
- LOPEZ ALONSO, D., E. MOLINA GRIMA, J.A. SANCHEZ PEREZ, J.L. GARCIA SANCHEZ y F. GARCIA CAMACHO, 1992. Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid. Aquaculture, 102: 363-371.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- MORRIS, J., 1981. Photosynthetic products, Physiological state, and Phytoplankton Growth. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 210:83-101

- MOSTERT, E.S. y J.U. GROBBELAAR, 1987. The influence of nitrogen and phosphorus on algal growth and quality in outdoor mass algal cultures. *Biomass* 13:219-233.
- NAVARRO, J.C., F. AMAT y J.R. SARGENT, 1992. Fatty acid composition of coastal and inland *Artemia* sp. populations from Spain. *Aquaculture* 102:219-230.
- NELLEYS, M., O. NUSETTI y A. VÉLEZ, 1988. Producción experimental de fitoplancton para alimento de juveniles del mejillón *Perna perna*, influencias sobre el crecimiento y metabolismo energético. Congreso Iberoamericano y del Caribe (Resúmenes). Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Univ. de Oriente. Venezuela Isla Margarita Pta Piedra pp 109.
- OSTROWSKI, A.C. y S. DIVAKARAN, 1990. Survival and bioconversion of n-3 fatty acids during early development of dolphin (*Coryphaena hippurus*) larva fed oil-enriched rotifers. *Aquaculture* 89:273-285.
- OWENS, T.G., J.C. GALLAGHER y R.S. ALBERTE, 1987. Photosynthetic light-harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* 23: 79-85
- PANIAGUA-MICHEL, J., 1994. Biotecnología microalgal y obtención de productos químicos y alimenticios, Serie Científica, U.A.B.C.S. No. Especial 2(1):109-119.

- PARRISH, C.C. y P.J. WANGERSKY, 1987. Particulate and dissolved lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricomutum* in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 35:119-128.
- PETKOV, G.D., S.T. FURNADZIEVA y R.D. ANDREEVA, 1994. Fatty acid and sterol composition on *Nannochloris* sp. *Algolog. Stud.* 72:133-135
- PICKETT-HEAPS, J.D., 1975. Green Algae. Structure, reproduction and evolution in selected genera. Senauer Associates. Sunderland, Mass pp 69-130
- PIORRECK, M., K.H. BAASCH y P. POHL, 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23(2):207-216.
- RAYMOND, M.G. y J.E. MAXEY, 1994. Microalgal feeds for aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 6:131-141.
- RENAUD, S.M., D.L. PARRY y T. LUONG-VAN, 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *J. Appl. Phycol.* 6:337-345.
- RENAUD, S.M. y D.L. PARRY, 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. *J. Appl. Phycol.* 6:347-356.

- RICHMOND, A. y K. PREISS, 1980. The Biotechnology of Algaculture. Interdisciplinary Science Review. 5 (1):60-69.
- RICHMOND, A., 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida pp 1-528.
- RICHMOND, A., 1990. Large scale microalgal culture and applications. In: Round F.E. CHAPMAN (eds.) Progress in physiology Research. Biopress Ltd. 7:269-330.
- ROESSLER, P.G., 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: Comercial Implications and Future research directions. J. Phycol. 26:393-399.
- SAROKIN, D.J. y E.J. CARPENTER, 1982. Ultrastructure and Taxonomic observations on Marine Isolates of the Genus *Nannochloris* (Chlorophyceae). Bot. Mar. 25:483-491.
- SOUTH, G.R., y A. WHITTICK, 1987. Introduction to Phycology. Blackwell Scientific Publications. pp 1-162.
- SPOHER, H.A. y H.W. MILNER, 1949. The chemical composition of *Chlorella*. Effect of enviromental conditions. Plant Physiol. 24:120-49.
- STEIN, J.R., 1973. In: Handbook of Phycological Methods, Culture Methods & Growth Meaurements. pp1-445

- SOKAL, R.R. y F.J. ROHLF, 1981. Biometry. 2a ed. W.H. Freeman and Company pp202-399.
- TERRY, K.L., E.A. LAWS y D.J. BURNS, 1985. Growth rate variation in the N:P requirement ratio of phytoplankton. J. Phycol. 21:323-329.
- THRONDSSEN, J., 1985. An introduction to the identification of Marine Flagellates. International Phytoplankton course Napoli pp1-61.
- TURNER, M.F. y R.J. GOWEN, 1984. Some aspects of the nutrition and taxonomy of fourteen small green and yellow-green algae. Bot. Mar. 27: 249-255.
- UREÑA C. F., 1986. Manual de Técnicas Básicas para Microscopía Electrónica. Universidad de Costa Rica.
- VOLKMAN, J.K., S.W. JEFFREY, P.D. NICHOLS, G.I. ROGERS y C.D. GARLAND, 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 128:219-240.
- YU SUEN, J.S. HUBBARD, G. HOLZER y T.G. TORNABENEE, 1987. Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. Q11 under different nitrogen regimes. J. Phycol. 23:289-296.
- WATANABE, T. y V.KIRON, 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124:223-251

WILHELM, C.G., EISENBEIS, A. WILD, y R. ZAHN, 1982. *Nannochlorum* eucaryotum: A very reduced coccoid species of marine Chlorophyceae. Z Naturforsch. 37 (c): 107-114

WITT, L., P.H. KOSKE, D. KUHLMANN, J. LENZ y W. NELLEN, 1981. Production of *Nannochloris* spec. (Chlorophyceae) in large-scale outdoor tanks and its use as a food organism in marine aquaculture. Aquaculture 23:171-181.

WIKFORS, G.H., J.W. TWARONG, R. UKELES, 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters *Crassostrea virginica*. Biol. Bull. 167:251-263.

ANEXO 1

Técnica de purificación celular. Stein, J.R. (1973).

La purificación de las células microalgales se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 1.- Se centrifugaron 20 ml del cultivo de microalgas, a 630 rpm por 10'.
- 2.- Se decantaron el sobrenadante con mucho cuidado, ya que las células no están perfectamente empacadas.
- 3.- Se resuspendieron a las células en medio de cultivo estéril y fresco, centrifugar.
- 4.- Se repitieron los lavados por lo menos 5 veces.
- 5.- Del paquete celular obtenido por el método anterior, se tomó una asada para hacer aislamiento en placa por estría cruzada, en medio de cultivo sólido.
- 6.- Se transfirieron a las células a medio de cultivo fresco, utilizando una pipeta Pasteur estéril.
- 7.- Se colocaron las placas bajo luz constante y a temperatura ambiente.
- 8.- Se inocularon los clones obtenidos anteriormente en tubos de ensayo, con medio de cultivo líquido.
- 9.- Cuando los tubos mostraron crecimiento, se verificó que no existiera contaminación por bacterias.

ANEXO 2

Técnica para separación de pigmentos. Lewin, R.A. (1989)

- 1.- Centrifugar 20 ml de cultivo, por 10', obteniendo el paquete celular.
- 2.- A partir de una muestra concentrada, utilizar 0.1 ml del paquete celular y calentar a 70 °C durante 1' (inactivando la carboxilasas).
- 3.- Extracción, tratar con 10 ml de una mezcla de metanol-acetona 1:1, durante 1 hr en frío y en la obscuridad (añada unos cristales de Na₂SO₄).
- 4.- Lavar los solventes polares y sales con 5 ml de hexano, seguido de 10 ml de agua (este proceso se lleva a cabo con luz media).
- 5.- Obtener la fracción de pigmentos lipídicos (capa superior) y transferirlos a un tubo limpio.
- 6.- Añada 10 ml de agua, removiendo el metanol y la acetona.
- 7.- Extraer la capa de hexano con una pipeta y transferirla a un tubo limpio y seco, con 100 a 200 mg de sulfato de sodio anhidro (repetir en otro tubo limpio)
- 8.- Decantar la solución de hexano a un tubo de 50 mm de largo y secar con nitrógeno.
La separación de clorofilas a y b se hace por medio de cromatografía de capa fina.
- 9.- Resuspender el extracto de pigmentos en 0.02 ml de hexano.
- 10.- Aplicar sobre una placa de TLC sílica gel de 200 µ de grosor, unas gotas del extracto.
- 11.- Cuando la mancha sea de color verde oscuro, seque la placa al aire por 2-3'.
- 12.- Preparar un frasco con tapón de rosca con 5 ml de una mezcla de acetona-hexano 1:4 y dejar hasta saturación.
- 13.- Colocar la placa dentro del frasco por 5' y retirarlo cuando el frente del solvente se encuentra cerca del extremo.
- 14.- Secar la placa al aire y colocarla de nuevo en el frasco para separación posterior de los componentes con migración lenta, durante 5'.
- 15.- Sacar la placa y secarla al aire marcando la posición de los pigmentos respectivos.
- 16.- Fotocopiar la placa para su registro permanente.

Se utilizan como estándares de referencia hojas de *angiospermas ó extractos del cultivo de *Euglena* o de *Chlorella*.

ANEXO 3

Técnica para microscopía electrónica. Ureña, F. (1986) modificada.

- 1.- Concentrar una alícuota del cultivo (2 veces) en tubos de microcentrifuga durante 5'.
- 2.- Fijar en glutaraldehído al 3% en regulador de fosfatos, pH 7.2 , por 30' a temperatura ambiente.
- 3.- Lavar la muestra (2 veces) con regulador de fosfatos 0.1M; mantener en el regulador de fosfato del 2º lavado en el refrigerador, durante toda la noche.
- 4.- Eliminar el regulador de fosfato de la muestra, centrifugando ligeramente.
- 5.- Tratar la muestra con osmio al 2% en regulador de fosfatos pH7.2 en baño de hielo, por 2 hrs. dentro de la campana de extracción.
- 6.- Deshidratar con Acetona al 30% por 10'
" 50% por 10'
" 96% por 10'
" 100% por 10' (2 veces)
- 7.- Tratar con óxido de propileno 1, 3, (2 veces), el líquido se extrae con aire para no llevarse la muestra.
- 8.- Se saca la muestra del tubo de microcentrifuga y se coloca en viales para la preinclusión con la resina, girando lentamente las muestras dentro de los viales, en un rotor por espacio de 1 hr. Utilice espátula de madera y con un papel filtro retire el exceso de óxido de propileno.
- 9.- Inclusión se realiza con resina Epon 812+óxido de propileno 1:1, durante 24 hrs.
- 10.- Preparar las cápsulas con Epon 812 y colocar con mucho cuidado parte de la muestra y centrifugar ligeramente.
- 11.- Polimerizar por 48 hrs. a 80 °C
- 12.- Obtener los cortes en el ultramicrotomo y montar éstos en rejillas de cobre.
- 13.- En un portaobjetos excavado coloque gotitas de acetato de uranilo al 2% en cada excavación y coloque la rejilla de tal manera que el reactivo toque el corte durante 30', con mucho cuidado para no perder el corte. Cubrir con un portaobjetos normal.

- 14.- Lavar con agua bidestilada, tomando la rejilla con las pinzas perfectamente limpias.
- 15.- Preparar una caja de petri con un pedazo de papel parafilm y unas gotas de citrato de plomo y unas cuantas lentejas de NaOH (para atrapar el CO₂).
- 16.- Colocar las rejillas con los cortes sobre las gotas del citrato de plomo, por 15'
- 17.- Observar al microscopio y fotografiar.

Las resinas utilizadas en la técnica anterior fueron:
Nadic Methyl anhidride, Epoxy hardener PM 178.19
Docecenylsuccinic anhydride
Poly/Bed 812 como medio de imbibición
Glutaraldehido al 70%
Película Kodackrome II R.C.F. 3 M. y papel profesional

ANEXO 4

MEDIOS DE CULTIVO

MI CICIMAR		BETA	
NaNO ₃	1100µM	NaNO ₃	883µM
Na ₂ HPO ₄	100µM	Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	36.3µM
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	150µM	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	54.10µM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10µM	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.9µM
ZnCl ₂	25µM	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.08µM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	5µM	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.03µM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	150nM	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.05µM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20µM	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.04µM
EDTA	80.6µM	C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	8.9µM
CIANOCOBALAMINA	1µg	FeC ₆ H ₅ O ₇	80.1µM
BIOTINA	1µg	CIANOCOBALAMINA	1µg
TIAMINA	100µg	BIOTINA	1µg
		TIAMINA	100µg

MEDIO FABREGAS (FA)

NaNO ₃	2mM
NaH ₂ PO ₄	100µM
ZnCl ₂	1µM
MnCl ₂	1µM
Na ₂ MoO ₄	1µM
CoCl ₂	0.1µM
CuSO ₄	0.1µM
FeC ₆ H ₅ O ₇	20µM
Na.EDTA	26.4µM
Tris-HCl	15mM
CIANOCOBALAMINA	3µg
BIOTINA	5µg
TIAMINA-HCl	35µg

MEDIO NELLYS (FI)

SULFATO DE AMONIO	0.2g/l
FOSFATO DIAMONICO	0.01 g/l
UREA	0.02 g/l
SILICATO DE SODIO	0.142 g/l

Tabla 1. Método empleado para preparación de la muestra del cultivo y la determinación de lípidos totales, proteínas y carbohidratos.

Centrifugar x ml de cultivo a 4000 rpm/10'

Lavar con H₂O destilada, centrifugando.

Agregar 3 ml CHCl₃:CH₃OH (1:2)
(dejar en reposo 24 hrs.)

Centrifugar a 4000 rpm/5'

Decantar y lavar (x no. veces) con
CHCl₃:CH₃OH

Pastilla	sobrenadante
-Se seca con N ₂	-Agregar H ₂ O destilada
-Agregar 1 ml H ₂ O y agitar vigorosamente	-Centrifugar 4000/5 separándose 2 fases
-0.5ml muestra con 2.5 ml HCl 2N	-centrifugar + CHCl ₃ hasta separar la fase clorofórmica
0.5ml muestra con 2.5 ml NaOH 2N	
-Tapar y poner a ebullición por 1 hr.	- Concentrar en el rolavapor
-Neutralizar ambas muestras a pH 7	- pasar a viales y secar con N ₂
-Medir el volumen final	- obtener el peso
-La muestra hidrolizada con NaOH sirve para determinar proteínas.	
-La muestra hidrolizada con HCl sirve para determinar carbohidratos	

Tabla 2. 1a fase del experimento: lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 1 cultivada en matraz..

MEDIOS	DIAS	REPLICA	LÍPIDOS mg/l	PESO SECO mg/l	No. CELULAS 10 ⁶ / ml
MI	7	a	40	273	31,35
MI	7	b	32	420	35,55
MI	14	a	66	260	75,5
MI	14	b	78	395	89,5
MI	21	a	112	525	98,5
MI	21	b	132	655	127,75
MI	28	a	180	595	123,6
MI	28	b	214	840	162,4
BE	7	a	40	320	31,75
BE	7	b	176	366,6	23,6
BE	14	a	120	380	52,95
BE	14	b	48	250	37,35
BE	21	a	112	465	61
BE	21	b	72	350	49,75
BE	28	a	192	325	64
BE	28	b	104	285	55,6
FA	7	a	34	313,3	15,05
FA	7	b	35	255	20,3
FA	14	a	58	130	21,1
FA	14	b	62	170	30,325
FA	21	a	70	235	28,5
FA	21	b	100	365	85,5
FA	28	a	140	515	104,4
FA	28	b	260	1050	176
FI	7	a	20	300	9,65
FI	7	b	30	255	16,3
FI	14	a	60	770	64,3
FI	14	b	30	380	58,75
FI	21	a	114	730	94,25
FI	21	b	128	670	122,5
FI	28	a	458	1445	198,4
FI	28	b	256	1265	159,2

Tabla 3. 1a fase del experimento; cantidad de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 1 cultivada en garratón.

MEDIOS	DIAS	REPLICA	LÍPIDOS mg/l	PESO SECO mg / l	No. CELULAS 10 ⁶ / ml
MI	7	a	180	15	8,00
MI	7	b	26	25	10,08
MI	14	a	22	100	14,65
MI	14	b	26	90	9,20
MI	21	a	264	220	20,85
MI	21	b	80	140	13,47
MI	28	a	262	125	44,85
MI	28	b	49	105	17,80
BE	7	a	20	5	13,13
BE	7	b	14	5	10,28
BE	14	a	18	90	14,45
BE	14	b	20	95	21,70
BE	21	a	20	145	18,58
BE	21	b	24	150	22,53
BE	28	a	34	190	27,35
BE	28	b	92	140	29,90
FA	7	a	8	100	15,65
FA	7	b	14	50	6,55
FA	14	a	44	145	25,05
FA	14	b	18	85	9,25
FA	21	a	72	115	32,00
FA	21	b	42	140	17,15
FA	28	a	49	178	24,57
FA	28	b	62	153	15,00
FI	7	a	18	95	15,88
FI	7	b	16	115	20,25
FI	14	a	40	150	31,13
FI	14	b	140	115	22,95
FI	21	a	62	230	53,95
FI	21	b	52	140	23,00
FI	28	a	80	215	43,40
FI	28	b	114	190	40,40

Tabla 4. Resultados obtenidos de la 1a fase del experimento; lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 cultivada a nivel de matraz.

MEDIOS	DIAS	REPLICA	LIPIDOS mg/l	PESO SECO mg/l	No. CELULAS 10 ⁶ /ml
MI	7	a	44	175	9,36
MI	7	b	28	150	7,15
MI	14	a	88	485	19,35
MI	14	b	76	685	20,25
MI	21	a	338	555	11,25
MI	21	b	228	860	23,00
BE	7	a	10	170	9,54
BE	7	b	7	160	6,67
BE	14	a	154	285	13,75
BE	14	b	68	185	7,05
BE	21	a	158	710	100,25
BE	21	b	50	405	30,50
FA	7	a	54	180	9,61
FA	7	b	126	215	11,89
FA	14	a	126	260	35,00
FA	14	b	472	300	29,00
FA	21	a	128	2670	72,30
FA	21	b	152	1000	136,75

Tabla 5. Resultados obtenidos en la 1a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 cultivada a nivel de garrafón.

MEDIOS	DÍAS	REPLICA	LIPIDOS mg/l	PESO SECO mg/l	No. CELULAS 10 ⁶ /ml
MI	7	a	64	115	17,27
MI	7	b	66	145	16,87
MI	14	a	70	115	35,50
MI	14	b	48	110	34,65
MI	21	a	82	405	80,10
MI	21	b	58	320	68,77
MI	28	a	112	240	82,00
MI	28	b	72	370	73,20
BE	7	a	26	335	6,27
BE	7	b	38	260	9,60
BE	14	a	98	55	40,80
BE	14	b	282	35	19,35
BE	21	a	72	375	65,36
BE	21	b	56	320	44,00
BE	28	a	126	200	58,00
BE	28	b	82	70	44,00
FA	7	a	136	140	23,75
FA	7	b	34	65	16,65
FA	14	a	124	250	46,55
FA	14	b	66	190	16,92
FA	21	a	82	395	86,00
FA	21	b	58	245	40,80
FA	28	a	106	280	88,00
FA	28	b	74	135	42,80

Tabla 6. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 1 (concentraciones de 10 y 5 mM de NaNO₃).

MEDIOS NaNO ₃	DIAS	REPLICA	LIPIDOS mg/l	PESO SECO mg/l	No. CELULAS 10 ⁶ /ml
10mM	7	a	0.198	0.27	17,550
	7	b	0.11	0.19	12,000
	7	c	0.187	0.285	15,750
10mM	10	a	0.246	0.27	21,250
	10	b	0.525	0.195	16,500
	10	c	0.602	0.31	27,000
10mM	12	a	0.2805	0.28	43,200
	12	b	0.176	0.41	23,800
	12	c	0.2255	0.275	43,200
10mM	19	a	0.365	0.21	51,425
	19	b	0.259	0.215	44,250
	19	c	0.41	0.33	60,450
5mM	7	a	0.022	0.2	12,750
	7	b	0.102	0.145	13,350
	7	c	0.014	0.15	18,000
5mM	10	a	0.1	0.155	22,200
	10	b	0.23	0.14	21,150
	10	c	0.648	0.22	27,750
5mM	12	a	0.2	0.2	36,900
	12	b	0.126	0.195	30,300
	12	c	4.51	0.14	35,850
5mM	19	a	0.2875	0.155	69,000
	19	b	0.3325	0.065	48,300
	19	c	0.6045	0.265	51,000

Tabla 6. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 1 (concentraciones de 1.5 y 0.5mM de NaNO₃).

MEDIOS NaNO ₃	DIAS	REPLICA	LIPIDOS mg/l	PESO SECO mg/l	No. CELULAS 10 ⁶ /ml
1.5mM	7	a	0.022	0.245	16,350
	7	b	0	0	18,450
	7	c	0.054	0.215	11,250
1.5mM	10	a	0.462	0.285	24,600
	10	b	0.08	0.19	23,700
	10	c	0.195	0.155	17,850
1.5mM	12	a	0.252	0.175	32,400
	12	b	0.234	0.225	32,400
	12	c	0.276	0.21	32,700
1.5mM	19	a	0.52	0.275	29,750
	19	b	0.45	0.28	39,750
	19	c	0.324	0.26	48,450
0.5mM	7	a	0.0525	0.19	15,000
	7	b	0.12	0.185	16,650
	7	c	0.225	0.17	15,450
0.5mM	10	a	0.176	0.23	19,050
	10	b	0.175	0.255	19,575
	10	c	0.14	0.215	21,600
0.5mM	12	a	0.144	0.29	34,350
	12	b	0.08	0.815	34,050
	12	c	0.24	0.19	39,750
0.5mM	19	a	0.486	0.32	30,600
	19	b	0.492	0.285	37,500
	19	c	0.4725	0.255	34,150

Tabla 7. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 a concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , a los 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de incubación.

MEDIOS NaNO_3	DIAS	REPLICA	LIPIDOS mg/l	DIAS	REPLICA	PESO SECO mg/l	No. CELULAS $10^4/\text{ml}$
1/10	7	a	0.3272	7	1/10a	0.27	42,825
		b	0.4785		1/10b	0.31	
		c	0.32				
2/10	7	a	0.6	7	2/10a	0.235	27,450
		b	2.311		2/10b	0.25	
		c	4.766				
3/10	7	a	1.1785	7	3/10a	0.345	32,625
		b	0.4266		3/10b	0.275	
		c	1.5487				
1/10	10	a	0.9333	10	1/10a	0.43	55,875
		b	1.29		1/10b		
		c			2/10a	0.395	
2/10	10	a	0.6111	10	2/10b		
		b	0.715				
		c					
3/10	10	a	1.47	10	3/10a	0.485	39,250
		b	2.52		3/10b		
		c					
1/10	12	a	0.07125	12	1/10a	0.775	69,912
		b	0.625		1/10b		
		c					
2/10	12	a	2.66	12	2/10a	0.375	38,850
		b	0.0571		2/10b		
		c					
3/10	12	a	0	12	3/10a	0.355	56,350
		b	0		3/10b		
		c					
1/10	14	a	0.7222	14	1/10a	0.52	80,000
		b	1.9012		1/10b		
		c					
2/10	14	a	0.595	14	2/10a	0.71	43,250
		b	0.69		2/10b		
		c					
3/10	14	a	0.4	14	3/10a	0.56	64,000
		b	0.087		3/10b	0.87	
		c					

Tabla 7. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 a concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , a los 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de incubación.

MEDIOS NaNO_3	DIAS	REPLICA	LÍPIDOS mg/l	DIAS	REPLICA	PESO SECO mg/l	No. CELULAS $10^6/\text{ml}$
1/10	19	a	4	19	1/10a	0.815	98,750
	19	b	0.888		1/10b		
	19	c					
2/10	19	a	0.4155	19	2/10a	0.575	62,750
	19	b	0.272		2/10b		
	19	c					
3/10	19	a	0.73625	19	3/10a	0.635	55,000
	19	b	1.05		3/10b		
	19	c					
1/10	21	a	0.585	21	1/10a	0.375	84,500
	21	b	0.6171		1/10b		
	21	c					
2/10	21	a	0.546	21	2/10a	0.67	60,500
	21	b	1.1375		2/10b		
	21	c					
3/10	21	a	0.7385	21	3/10a	0.565	63,750
	21	b	0.225		3/10b		
	21	c					
1/5	7	a	3.5116	7	1/5a	0.285	39,800
	7	b	2.59		1/5b		
	7	c	1.9175				
2/5	7	a	0.4533	7	2/5a	0.35	50,850
	7	b	0.245		2/5b		
	7	c	0.7625				
3/5	7	a	1.54	7	3/5a	0.38	37,350
	7	b	0.4987		3/5b		
	7	c	0.8414				
1/5	10	a	4.896	10	1/5a	0.58	53,250
	10	b	0.549		1/5b		
	10	c					
2/5	10	a	0.055	10	2/5a	0.47	55,375
	10	b	0.93		2/5b		
	10	c					
3/5	10	a	0.765	10	3/5a	0.465	58,875
	10	b	0.4781		3/5b		
	10	c					

Tabla 7. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 a concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO₃, a los 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de incubación.

MEDIOS NaNO ₃	DIAS	REPLICA	LIPIDOS mg/l	DIAS	REPLICA	PESO SECO mg/l	No. CELULAS 10 ⁶ /ml
1/5	12	a	0.188	12	1/5a	0.5	47,950
	12	b	0.3315		1/5b		
	12	c					
2/5	12	a	0.4333	12	2/5a	0.48	54,075
	12	b	0.7		2/5b		
	12	c					
3/5	12	a	0.736	12	3/5a	0.46	52,325
	12	b	0.186		3/5b		
	12	c					
1/5	14	a	0.7842	14	1/5a	0.475	69,750
	14	b	0.4614		1/5b		
	14	c					
2/5	14	a	3.6905	14	2/5a	0.845	77,500
	14	b	0.756		2/5b		
	14	c					
3/5	14	a	0.4505	14	3/5a	0.715	65,000
	14	b	0.4845		3/5b		
	14	c					
1/5	19	a	0.675	19	1/5a	0.905	78,500
	19	b	0.8		1/5b		
	19	c					
2/5	19	a	0.38	19	2/5a	1.02	68,750
	19	b	0.42		2/5b		
	19	c					
3/5	19	a	1.325	19	3/5a	0.935	81,500
	19	b	0.3825		3/5b		
	19	c					
1/5	21	a	0.2971	21	1/5a	0.69	87,000
	21	b	0.8775		1/5b		
	21	c					
2/5	21	a	0.546	21	2/5a	0.61	95,250
	21	b	0.2383		2/5b		
	21	c					
3/5	21	a	0.39	21	3/5a	0.685	70,500
	21	b	0.6587		3/5b		
	21	a					

Tabla 7. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 a concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , a los 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de incubación.

MEDIOS NaNO_3	DIAS	REPLICA	LIPIDOS mg/l	DIAS	REPLICA	PESO SECO mg/l	No. CELULAS $10^6/\text{ml}$
1/1.5	7	a	0.3125	7	1/1.5a	0.365	51,475
	7	b	0.4287	7	1/1.5b	0.65	
	7	c	0.72				
2/1.5	7	a	3.0655	7	2/1.5a	0.33	30,300
	7	b	2.55	7	2/1.5b	0.235	
3/1.5	7	a	0.6644	7	2/1.5a	0.345	48,975
	7	b	0.9006	7	3/1.5b	0.365	
1/1.5	10	a	0.375	10	1/1.5a	0.445	43,625
	10	b	0.3		1/1.5b		
	10	c					
2/1.5	10	a	4.5125	10	2/1.5a	0.505	33,625
	10	b	1.05		2/1.5b		
3/1.5	10	a	0.333	10	3/1.5a	0.37	42,625
	10	b	0.51		3/1.5b		
1/1.5	12	a	0.609	12	1/1.5a	0.655	70,000
	12	b	0.5357		1/1.5b		
	12	c					
2/1.5	12	a	0.1785	12	2/1.5a	0.505	42,700
	12	b	0.111		2/1.5b		
3/1.5	12	a	0.4085	12	3/1.5a	0.585	58,275
	12	b	0.6375		3/1.5b		
1/1.5	14	a	0.344	14	1/1.5a	0.915	70,750
	14	b	0.265		1/1.5b		
	14	c					
2/1.5	14	a	0.464	14	2/1.5a	0.935	46,250
	14	b	0.226		2/1.5b		
3/1.5	14	a	0.5075	14	3/1.5a		73,500
	14	b	0.546		3/1.5b		
1/1.5	19	a	0.2138	19	1/1.5a	0.86	64,000
	19	b	0.9262		1/1.5b		
	19	c					
2/1.5	19	a	0.6	19	2/1.5a	0.735	79,750
	19	b	0.805		2/1.5b		
3/1.5	19	a	1.175	19	3/1.5a	0.785	90,000
	19	b	1.316		3/1.5b		

Tabla 7. Resultados obtenidos en la 2a fase del experimento, de lípidos (mg/l), peso seco (mg/l) y número de células, para *Nannochloris* sp. Cepa 2 a concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , a los 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de incubación.

MEDIOS NaNO_3	DIAS	REPLICA	LIPIDOS mg/l	DIAS	REPLICA	PESO SECO mg/l	No. CELULAS $10^6/\text{ml}$
1/1.5	21	a	1.2321	21	1/1.5a	0.595	60,750
	21	b	0.9142	21	1/1.5b	0.65	
	21	c					
2/1.5	21	a	0.09	21	2/1.5a	0.53	69,500
	21	b	0.5333	21	2/1.5b	5.685	
3/1.5	21	a	0.414	21	3/1.5a	1.015	89,500
	21	b	0.12	21	3/1.5b	0.58	
1/5	7	a	0.5166	7	1/5a	0.52	49,875
	7	b		7	1/5b	0.3	
2/5	7	a	0.325	7	2/5a	0.465	83,700
	7	b	0.4062	7	2/5b	0.375	
3/5	7	a	0.2812	7	3/5a	0.725	70,250
	7	b	0.385	7	3/5b	0.725	
1/5	10	a	0.481	10	1/5a	0.455	50,000
	10	b	1.6916	10	1/5b		
2/5	10	a	0.2216	10	2/5a	0.56	55,000
	10	b	0.4	10	2/5b		
3/5	10	a	0.44	10	3/5a	0.425	49,000
	10	b	2.9766	10	3/5b		
1/5	12	a	0.205	12	1/5a	0.38	33,250
	12	b	0.2587	12	1/5b		
2/5	12	a	0.2666	12	2/5a	0.75	50,925
	12	b	0.2044	12	2/5b		
3/5	12	a	0.2555	12	3/5a	0.77	44,975
	12	b	0.3142	12	3/5b		
1/5	14	a	0.3118	14	1/5a	0.38	35,500
	14	b	0.3542	14	1/5b		
2/5	14	a	0.555	14	2/5a	0.75	52,500
	14	b	0.3	14	2/5b		
3/5	14	a	0.385	14	3/5a	0.77	47,750
	14	b	0.84	14	3/5b		
1/5	19	a	0.385	19	1/5a		
	19	b	1.2	19	1/5b	0.655	46,250
2/5	19	a	0.5357	19	2/5a		65,750
	19	b	0.9428	19	2/5b		
3/5	19	a	0.112	19	3/5a	0.85	49,000
	19	b	0.585	19	3/5b		
1/5	21	a	0.2528	21	1/5a	0.425	34,250
	21	b	0.3142	21	1/5b	0.395	
2/5	21	a	0.3312	21	2/5a	0.395	47,500
	21	b	0.4714	21	2/5b	0.375	
3/5	21	a	0.6571	21	3/5a	0.21	52,500
	21	b	0.8	21	3/5b	0.42	

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza para la obtención de Peso seco del Ln (mg/l). Dos cepas de *Nannochloris* sp., dos sistemas (matraz y garrafón), y en los Medios (M1, BETA y FA) durante 7, 14 y 21 días de incubación. (1a fase del experimento).

Fuente	SumCuad	gl	CM	F	P
Cepas(A)	5.8355	1	5.8355268	8.9384416	
Sist.(B)	24.5816	1	24.581628	37.652377	
Medios(C)	1.2489	2	0.6244448	0.9564797	
Días(D)	17.2970	2	8.6485052	13.24716	
SCAXB	3.0732	1	3.0731737	4.7072672	0.05
SCAXC	0.0697	2	0.0348277	0.0533466	ns
SCAXD	1.4421	2	0.7210699	1.1044832	ns
SCBXC	0.8715	2	0.4357645	0.6674729	ns
SCBXD	0.8460	2	0.4230172	0.6479474	ns
SCCXD	0.5369	4	0.134227	0.2055994	ns
SCAXBXC	2.1252	2	1.0625877	1.6275957	ns
SCAXBXD	7.9929	2	3.9964513	6.1214777	0.01
SCAXCXD	5.2060	4	1.3014998	1.9935441	ns
SCBXCXD	1.7966	4	0.4491584	0.6879887	ns
AXBXCXD	2.8337	4	0.7084352	1.0851303	ns
Denro	23.5029	36	0.6528573		
Total		71			

Tabla 9. Resultados del análisis de varianza para Peso Seco con las Cepas 1 y 2 de *Nannochloris* sp. a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5 y 10 mM de NaNO_3 , durante 7, 10, 12, 14, 19 y 21 días de incubación (2da fase del experimento)

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Cepa(A)	17.124722	1	17.124722	240.03875	
Conc.(B)	0.9905565	3	0.3301855	4.6282395	
Días(C)	2.7918958	3	0.9306319	13.04475	
A X B	1.3535077	3	0.4511692	6.3240794	<0.001
A X C	1.5822932	3	0.5274311	7.3930479	<0.0005
B X C	0.3352204	9	0.0372467	0.5220904	ns
A X B X C	0.8847475	9	0.0983053	1.3779538	ns
Dentro	4.5658554	64	0.0713415		
Total		95			

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza para Peso Seco, en la Cepa 1

Fuente	SC	gl	CM	F	P
A(conc)	1.8367431	3	0.6122477	6.3024503	<.0025
B(días)	0.3249153	3	0.1083051	1.1148879	ns
A X B	0.8202823	9	0.0911425	0.9382165	ns
Dentro	3.1086205	32	0.0971444		
Total		47			

Tabla 11. Resultados del análisis de varianza para Peso Seco, con la Cepa 2.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
A(conc)	0.1452071	3	0.4356213	3.251581	
B(días)	1.0084528	5	5.042264	22.58200	
A X B	0.0952479	15	1.4287178	2.132858	<.05
Dentro	0.0446574	48	2.1435538		
Total		71	9.0501569		

Tabla 12. Resultados del análisis de varianza, para el Número de células Ln (cel/ml), en la 1a fase del experimento.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Cepas(A)	0.033765	1	0.033765	0.103945	
Sist.(B)	1.8399951	1	1.8399951	5.664381	
Medios(C)	0.2911516	2	0.1455758	0.448152	
Días(D)	16.658242	2	8.3291211	25.641	
SCAXB	10.46283	1	10.46283	32.20957	0.001
SCAXC	2.1221705	2	1.0610853	3.266526	<0.1
SCAXD	1.4713405	2	0.7356702	2.264743	ns
SCBXC	0.0140069	2	0.0070034	0.02156	ns
SCBXD	0.0986987	2	0.0493484	0.151921	ns
SCCXD	0.6066514	4	0.1516629	0.46689	ns
SCAXBXC	3.5951365	2	1.7975682	5.533771	0.01
SCAXBXD	0.0707435	2	0.0353718	0.108891	ns
SCAXCXD	0.9684784	4	0.2421196	0.745359	ns
SCBXCXD	1.115052	4	0.278763	0.858165	ns
AXBXCXD	1.2136196	4	0.3034049	0.934025	ns
Dentro	11.684098	36	0.324836		
Total		71			

Tabla 13. Resultados del análisis de varianza, para el número de células de las Cepa 1 y 2, en la 2da fase del experimento,

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Cepa(A)	11.056905	1	11.056905	297.32421	
Conc.(B)	0.1256025	3	0.0418675	1.1258326	
Días(C)	7.5281725	3	2.5093908	67.478433	
A X B	0.0925141	3	0.030838	0.8292455	ns
A X C	1.9930842	3	0.6643614	17.86492	<<0.001
B X C	1.0967193	9	0.1218577	3.2767979	<<0.001
A X B X C	0.5711298	9	0.0634589	1.7064319	ns
Dentro	2.3800347	64	0.037188		
Total		95			

Tabla 14. Resultados del análisis bifactorial para el número de células de la Cepa 1, en la 2da fase del experimento.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
A(conc)	0.1476551	3	0.0492184	1.4918886	ns
B(días)	8.2869544	3	2.7623181	83.730323	<<0.0005
A X B	0.4144088	9	0.0460454	1.3957104	ns
Dentro	1.0557009	32	0.0329907		
Total		47			

Tabla 15. Resultados del análisis bifactorial para el número de células de la Cepa 2, en la 2da fase del experimento.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
A(conc)	0.1680815	3	0.4982445	3.5278809	
B(días)	0.3490776	5	1.7453878	7.4150589	
A X B	0.1365333	15	2.0479999	2.9002227	<0.005
Dentro	0.0470788	48	2.2596885		
Total		71	6.5513207		

Tabla 16. Resultados del análisis de varianza para la obtención de lípidos totales del Ln (mg/l), en la primera parte del experimento.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Cepas(A)	5.131263	1	5.131263	13.70121	
Sist.(B)	4.777059	1	4.777059	12.7554	
Medios(C)	2.434181	2	1.217090	3.249808	
Días(D)	10.26731	2	5.133659	13.70761	
SCAXB	1.282821	1	1.282821	3.425319	<0.1
SCAXC	3.13617	2	1.56808	4.187022	0.025
SCAXD	3.179042	2	1.589521	4.244252	0.025
SCBXC	1.031248	2	0.515624	1.376791	ns
SCBXD	1.847829	2	0.92391	2.466986	<0.1
SCCXD	3.650588	4	0.912647	2.436900	<0.1
SCAXBXC	4.616337	2	2.308168	6.163144	0.01
SCAXBXD	1.840129	2	0.920064	2.456706	=0.1
SCAXCXD	3.354748	4	0.838687	2.239416	<0.1
SCBXCXD	1.433538	4	0.358384	0.956938	ns
AXBXCXD	1.395044	4	0.348761	0.93124	ns
Dentro	13.48241	36	0.374511		
Total		71			

Tabla 17. Resultados del análisis de varianza, en la obtención de lípidos totales en las Cepa 1 y 2, en la 2da fase del experimento.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Cepa(A)	33.27404	1	33.27404	55.346612	
Conc.(B)	3.6915377	3	1.2305126	2.0467819	
Días(C)	9.6464718	3	3.2154906	5.3485093	
A X B	0.7669696	3	0.2556565	0.4252481	ns
A X C	15.438598	3	5.1461993	8.5599673	<0.0005
B X C	3.4337086	9	0.3815232	0.6346093	ns
A X B X C	7.521515	9	0.8357239	1.3901073	ns
Dentro	38.476403	64	0.6011938		
Total		95			

Tabla 18. Resultados del análisis bifactorial para lípidos de la Cepa 1, en la 2da fase del experimento.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
A(conc)	1.5279145	3	0.5093048	0.9898125	ns
B(días)	21.322332	3	7.107444	13.813019	<<.0005
A X B	8.5776687	9	0.9530743	1.8522599	ns
Dentro	16.465496	32	0.5145468		
Total		47			

Tabla 19. Resultados del análisis bifactorial para lípidos de la Cepa 2, en la 2da fase del experimento.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
A(conc)	1.0215135	3	3.0645404	1.8229589	ns
B(días)	0.9414167	5	4.7070838	1.6800209	ns
A X B	0.2470321	15	3.7054819	0.4408453	ns
Dentro	0.5603601	48	26.897285		
Total		71	38.374391		