

49
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

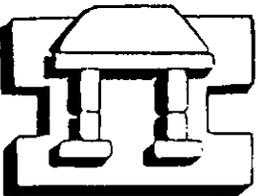
CAMPUS · IZTACALA

PRODUCCION DE TRES MICROALGAS
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LUIS HECTOR HERNANDEZ HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS: BIOL. MARIO ALFREDO FERNANDEZ ARAIZA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

266841



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente al Biól. Mario Alfredo Fernández Araiza, Jefe del Acuario, por su atinada dirección de este trabajo, por el apoyo y por la oportunidad de permitirme colaborar con él en su equipo de trabajo, pero sobre todo por su invaluable amistad.

Al M. en C. Angel Durán Díaz por su valiosos consejos y por su apoyo en la parte estadística de este trabajo.

Al M. en C. Ignacio Peñalosa Castro por su apoyo para la realización de los análisis bromatológicos y sus acertados comentarios.

A las Biólogas Guadalupe Oliva y Lucia Pavón por sus comentarios y sugerencias para mejorar el escrito.

A Martha y Harm (mis patrones) por su apoyo, por dejarme compartir un poco del mundo real y su gran amistad.

Al Biól. José Luis Gama, por su apoyo siempre incondicional , por compartir conmigo su amplia experiencia y por su amistad.

Al Biól. Nicolás Rodríguez por compartir conmigo sus vastos conocimientos del área de Metodo IV y por su amistad.

Y a mis amigos biólogos Romulo y Teresa por compartir gran parte de la carrera y por su apoyo siempre incondicional.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	7
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS.....	40
ANEXOS.....	48

RESUMEN

Se realizaron cultivos estáticos para determinar la cinética poblacional de *Chlorella vulgaris* FIZTA 1, *Nannochloropsis* sp. y *Spirulina* sp. bajo condiciones de laboratorio. También se determinó la mejor concentración de inóculo y el contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y clorofila *a*. En el caso de *C. vulgaris*, la mejor concentración inicial fue la de 5.0×10^6 céls./ml, y la cinética poblacional y composición bioquímica están determinadas por la iluminación continua y la utilización de NaNO_3 como única fuente de N. En *Nannochloropsis* sp., se determinó que la mejor concentración inicial para su producción fue la de 5.0×10^6 céls/ml y que la cinética y composición bioquímica están determinadas por la iluminación continua y probablemente la salinidad. En el caso de *Spirulina* sp., la mejor concentración inicial fue la de 0.07 mg/ml, y su crecimiento está determinado por la temperatura y la concentración de NaHCO_3 en el medio de cultivo. Bajo las condiciones en las cuales se realizaron los cultivos, las 3 microalgas son susceptibles de producción y aprovechamiento en Acuicultura.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un amplio grupo de organismos fotosintéticos que se han utilizado en diversas actividades: extracción de químicos finos, producción de complementos alimenticios, tratamiento de aguas residuales, generación de energía y en acuicultura (Ramos y Salazar, 1990; Arredondo y Vazquez, 1991). En esta área las microalgas tienen un papel relevante, pues son el primer eslabón dentro de cualquier cadena trófica acuática y sirven de alimento al zooplancton y a muchos estados larvales de peces, crustáceos y bivalvos de interés comercial (Le Borgne, 1991; Torrentera y Tacon, 1989). De ahí que sea lógico que la producción de microalgas sea una parte integral dentro de muchas operaciones acuaculturales (Fernández y Hernández, 1997).

Actualmente, se utilizan un sistema de aprovechamiento y dos de producción de microalgas dentro de los sistemas acuculturales (De Pauw et al. 1984; De Pauw y Persoone, 1992):

– Aprovechamiento del fitoplancton. En este sistema se utilizan las microalgas que crecen en los sistemas de cultivo (mar, lagunas costeras o estanques) y tiene como única ventaja que no se invierten recursos. Sin embargo, su problema más grave es que los organismos en cultivo están expuestos a consumir especies que son tóxicas, además de que no existe ningún control sobre la calidad nutritiva de las microalgas y la cantidad que se aprovecha.

– Sistema de producción semi-intensivo. Consiste en inducir florecimientos del fitoplancton natural, utilizando fertilizantes agrícolas. Este procedimiento puede realizarse en el mar, lagunas y estanques donde se mantienen a los organismos principales de cultivo, además de que también puede llevarse a cabo en contenedores separados. Es barato y la producción que se tiene es considerable, pero se puede inducir el crecimiento de especies tóxicas y existe

poco control sobre la densidad celular y la calidad nutritiva de las especies utilizadas.

- Sistema de producción intensivo. Utiliza cepas puras de microalgas seleccionadas en medios específicos y bajo condiciones axénicas. Se lleva a cabo en laboratorios separados de los cuerpos de agua donde se mantienen los organismos de cultivo y su ventaja más importante es que se tiene un conocimiento exacto de la calidad y cantidad de alimento que se suministra. Sin embargo, el costo de producción es relativamente alto, debido a los reactivos que se utilizan para los medios de cultivo, la luz, la aireación y el material que se requiere; además de que se producen volúmenes relativamente pequeños. Trotta (1981) ha utilizado una variante de este sistema, realizando florecimientos de cepas puras provenientes del laboratorio en estanques fertilizados con nutrientes agrícolas. Con ello se han logrado reducir los costos de producción y se tiene un control en la cantidad y calidad de alimento que se suministra.

Existen alrededor de 40 especies aisladas en diferentes partes del mundo que se utilizan en diferentes operaciones acuaculturales (De Pauw y Persoone, 1992). La gran mayoría de ellas son marinas (p. ej. algunas especies de los géneros *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Chaetoceros* y *Skeletonema*) y se utilizan principalmente en el cultivo de moluscos (*Crassostrea*, *Merceneria* y *Ostrea*), larvas de camarón (*Penaeus*) y algunas especies de peces (*Mugil cephalus* y *Sparus aurata*). Existe, además un aprovechamiento de *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) y de una especie de *Chlorella* marina para la alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* y del copépodo *Tigriopus japonicus* (Yamaguchi, 1997), que a su vez sirven como alimento a diferentes especies de peces marinos (Watanabe et al. 1983).

Algunas especies de agua dulce, pertenecientes a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* se han procesado para alimentar carpa herbívora y Tilapia, aunque también se han utilizado para alimentar a algunas especies de rotíferos (*Brachionus rubens* y *B. calyciflorus*) y cladóceros (*Daphnia* y *Moina*), en algunos cultivos de peces de ornato. La cianofita *Spirulina* se utiliza en Japón para alimentar carpas Koi, algunas especies pequeñas de peces y de camarones juveniles (Benemann, 1992). También es ampliamente utilizada para alimentar *Artemia salina*, que se utiliza en muchas operaciones acuaculturales de agua dulce y marina (Watanabe et al. 1983; Castro et al. 1994).

Al ser el alimento natural de muchas especies acuáticas, las microalgas son fuentes de nutrientes para muchos organismos de interés comercial, en por lo menos un estadio de desarrollo (Benemann, 1992). El valor nutritivo de las microalgas está relacionado con su composición bioquímica, especialmente en proteínas, lípidos y composición de ácidos grasos (Renaud et al. 1991).

Es bien sabido que las microalgas pueden tener hasta un 70% de proteínas del total de materia seca y actualmente se ha determinado que en especies de peces y camarones, los requerimientos protéicos en sus dietas para un buen crecimiento fluctúan en un intervalo de 24 a 57 %, equivalente al 30-70% del contenido energético total de la dieta en forma de proteína, por lo que las microalgas cumplen satisfactoriamente las necesidades en este rubro.

En cuanto a la calidad de las proteínas, determinada por el contenido, proporción y disponibilidad de aminoácidos, los perfiles de diversas microalgas han demostrado que pueden cubrir las necesidades de estos compuestos, ya que no solo son capaces de sintetizar todos los aminoácidos (Becker, 1994), sino que muchas especies presentan niveles muy altos de

algunos de ellos como leucina, fenilalanina o treonina, que son esenciales en el desarrollo de peces, crustáceos y bivalvos (Brown, 1991).

La importancia de la cantidad y composición de lípidos en las microalgas esta asociada con los niveles de algunos ácidos grasos altamente poliinsaturados, sobre todo al ácido eicosapentaenoico 20:5(n-3) o EPA y al ácido docosahexaenoico 22:6(n-3) o DHA, que pertenecen a la familia omega-3. Se ha demostrado que el EPA y el DHA son esenciales en las dietas de diferentes especies comerciales marinas, ya que aumentan su supervivencia y permiten el crecimiento (Renaud et al. 1991; Volkman et al. 1989). Lo mismo sucede con el EPA en organismos dulceacuicolas (Lubenz et al. 1995). Las microalgas son las únicas capaces de sintetizar estos compuestos *de novo* en el medio acuático, por lo que organismos consumidores sólo pueden obtenerlos a lo largo de las cadenas alimenticias (Radmer y Parker, 1994), ya que se van acumulando a lo largo de éstas (Watanabe et al. 1983).

Existen otros compuestos que son sintetizados por las microalgas como algunas vitaminas, ácido ascórbico (Brown y Miller, 1992), esteroides, carbohidratos (Brown, 1991) y pigmentos (Yamaguchi, 1997), los cuales son también muy importantes para los organismos que se aprovechan dentro de la Acuicultura.

La calidad nutritiva de las microalgas puede cambiar con la especie y en respuesta a las condiciones ambientales de los cultivos (Renaud et al. 1994). Los cambios bioquímicos más drásticos se presentan cuando existen niveles bajos de nitrógeno, causando una disminución en la cantidad de proteínas y un aumento en la síntesis de carbohidratos y lípidos. Las temperaturas altas aumentan la concentración de proteínas y lípidos, mientras que el aumento en la intensidad luminosa genera la producción de β -caroteno y cambios en los perfiles de ácidos grasos, disminuyendo la síntesis de formas altamente insaturadas (Roessler, 1990; Renaud et al. 1991). Existen además cambios

bioquímicos al modificar la salinidad (Renaud y Parry 1994), la concentración de micronutrientes y al suministrar CO₂ (Becker, 1994).

Así, al seleccionar una especie de microalga debe tomarse en cuenta el uso que se le va a dar dentro de la operación acuacultural y en que condiciones ambientales se va a cultivar, para saber su valor nutritivo. Además debe considerarse el tamaño y forma adecuados, nula toxicidad, facilidad de cultivo, altas tasas de crecimiento y bajos costos de producción (Vega, 1996; Fernández, 1996). Cuando se pretende cultivar en exteriores, también es necesario que las cepas tengan una alta capacidad a fluctuaciones en la temperatura, intensidad luminosa y a cambios osmóticos (Becker, 1994) y que muestre poco potencial para causar contaminación de las aguas (Yamaguchi, 1997).

ANTECEDENTES

Existen diversos trabajos relacionados con microalgas, entre ellos, los realizados por Burlew (1953), Tamiya (1957), Stein (1979), Shelef y Soeder (1980), Richmond (1986), Borowitzka y Borowitzka (1992), Paniagua (1989) y el de Becker (1994). Cada uno de ellos maneja diferentes técnicas de producción y escalas, desde el cultivo en laboratorio hasta la producción masiva, medios de cultivo, especies cultivables, cosecha y diferentes actividades de aplicación de los cultivos, entre los que se destaca la Acuacultura.

De manera más específica y para mejorar el cultivo de *Chlorella*, se han manejado diferentes condiciones ambientales, sobre todo cambios en fotoperíodos. Hirata (1975) que encontró la mayor parte de las células en cultivo continuo y sometidas a un ciclo de luz-oscuridad, se dividen durante el periodo de oscuridad. Oh y Rhee (1991) reportan la tasa de crecimiento bajo condiciones de luz limitada de *Chlorella* sp. aislada de cultivos de arroz. Kroon y Dijkman (1996) encontraron mejor actividad fotosintética de células de *C. vulgaris* sometidas a un régimen de luz fluctuante y un ciclo de luz-oscuridad. Así mismo, se han realizado diferentes trabajos con la concentración de nutrientes en los medios de cultivo, como el de Piorreck et al. (1984) donde encontraron que *C. vulgaris* aumentaba la producción de biomasa, contenido de proteína y clorofila a conforme aumentaba la concentración de N en el medio. Lee y Tay (1991) encontraron que altas concentraciones de CO₂ en el medio disminuye la tasa de crecimiento de *C. pyrenoidosa*. Jeanfils et al. (1993) reportan el crecimiento de *C. vulgaris* a altas concentraciones de nitratos. También existen diversos trabajos sobre la composición bioquímica de este genero, Piorreck y Pohl (1984) reportaron el contenido de proteínas, lípidos y clorofilas en *C. vulgaris*. Yongmanichai y Ward (1991) reportan altos niveles de lípidos y de ácidos grasos poliinsaturados en una cepa de *C. minutissima*. Brown y Jeffrey (1992) realizaron análisis de proteínas, aminoácidos,

carbohidratos y pigmentos en 3 especies no determinadas de *Chlorella*, 2 de las cuales son ampliamente utilizadas en operaciones acuaculturales de Australia. Ahlgren et al. (1993) reportan la composición química y contenido de ácidos grasos de *C. homosphaera*. De igual forma, Renaud et al. (1994) reportan la composición de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como ácidos grasos de 2 especies no determinadas de *Chlorella* con uso en Acuicultura. Vega (1996) reporta el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de una cepa de *C. vulgaris* con posible uso dentro de Acuicultura.

La eustigmatoficea *Nannochloropsis*, es ampliamente utilizada en diferentes operaciones acuaculturales, debido a su alto valor nutritivo especialmente en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados esenciales. Es por ello que la gran parte de los trabajos con esta microalga se han enfocado al efecto de algunas variables ambientales en el crecimiento poblacional y en su composición bioquímica. La concentración de nutrientes es uno de los aspectos que se ha revisado, como Hodgson et al. (1991) en el que evaluó el crecimiento y los patrones de variación de lípidos durante un ciclo de crecimiento en cultivos estáticos con 2 concentraciones diferentes de N y P en *N. oculata*. Flynn et al. (1993) reportan el comportamiento de la tasa de crecimiento de *N. oculata*, así como las relaciones C-N en un cultivo estático y sometido a un ciclo luz-oscuridad. Existen también trabajos relacionados con el efecto de ciclos luz-oscuridad e intensidad luminosa como el de Sukenik et al. (1989), que sometieron a *Nannochloropsis* sp. a 3 niveles de intensidad luminosa, encontrando que el mejor crecimiento se daba en la intensidad de saturación y una mayor concentración de lípidos en la intensidad de fotoinhibición. Sukenik y Carmeli (1990) reportan que en cultivos de *Nannochloropsis* sp. sometidos a un ciclo de luz-oscuridad, la mayor parte de las divisiones celulares se llevan a cabo durante el periodo de oscuridad y también reportan el comportamiento de la composición de lípidos y ácidos grasos en sus cultivos. Renaud et al. (1991) sometieron cultivos de *N. oculata* a diferentes intensidades luminosas, encontrando las densidades más altas a

intensidades cercanas a la saturación y reportan la composición química en las diferentes intensidades. Sukenik et al. (1993) evaluaron la calidad bioquímica de *Nannochloropsis* sp. sometida a diferentes condiciones ambientales de intensidad luminosa, disponibilidad de nitrógeno y temperatura. Hernández et al. (1996) reportan el efecto de la iluminación y temperatura en el crecimiento poblacional de *N. gaditana*. Existen también trabajos realizados con el efecto de la salinidad sobre el crecimiento y la composición química de *N. oculata*, como el de Renaud y Parry (1994), en el que obtuvieron una disminución en el crecimiento en 35 ‰, así como aumentos en el contenido de lípidos y de cenizas conforme aumenta la salinidad. Álvarez et al. (1996) determinaron que *N. oculata* aumenta su tolerancia a altas temperaturas conforme disminuye la salinidad. Existen, además, diversos trabajos sobre evaluación química de esta microalga, como el realizado por Brown (1991), en el que reporta que *N. oculata* presenta el porcentaje más alto de proteínas y de prolina de 16 especies de microalgas evaluadas. Volkman et al. (1993) reportan la composición bioquímica de 4 cepas de eustigomatofíceas, encontrando similitudes en porcentaje de proteínas, lípidos, carbohidratos y clorofila a. Brown et al. (1993) reportan la composición bioquímica de *N. oculata* en cultivo continuo, semi-continuo y estático. Dunstan et al. (1993) reportan la composición de lípidos de *N. oculata* y que el mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en la fase logarítmica de cultivos estáticos.

En *Spirulina* existen también diversos trabajos sobre el efecto de factores ambientales en el crecimiento poblacional, como el de Zarrouk (1966) en el que reporta el crecimiento y la actividad fotosintética de *S. maxima* bajo distintos factores ambientales. Richmond et al. (1980) reportan que la capacidad de penetración de la luz es el factor que más afecta a la producción de *S. platensis* en cultivos exteriores. Vonshak et al. (1983) reportan la mejor concentración de NaHCO_3 para mantener un monocultivo y una mejor producción de *S. platensis*. Olaizola y Duerr (1990) reportan la tasa de

crecimiento y composición de pigmentos de *S. platensis* en cultivos sometidos a diferentes intensidades luminosas y calidad de luz. Quiang et al. (1996) reportan el crecimiento y la actividad fotosintética de *S. platensis* cultivada a ultra altas densidades celulares. Quiang y Richmond (1996) reportan el efecto de la intensidad luminosa, densidad celular y tasa de mezcla en la productividad y eficiencia fotosintética de *S. platensis* y Vonshak et al. (1996) reportan la actividad fotosintética de esta misma microalga a altas intensidades luminosas. Existen otros trabajos donde se reportan la composición bioquímica de *Spirulina* bajo diferentes condiciones de cultivo, como el Chung et al. (1978) donde *S. platensis* se cultivó en agua con desechos de cerdos. Durand (1980) trabajó en un cultivo exterior masivo de *S. maxima* y reporta la composición química. Saxena et al. (1982) reportan la composición química de *S. platensis* cultivada en un medio sintético y en agua de desecho enriquecida con nitratos y urea. Santillan (1982) reporta el contenido de proteína, lípidos, carbohidratos, pigmentos y diversos minerales de *Spirulina* sp. cultivada en exteriores. Piorreck et al. (1984) reporta la producción de biomasa y composición química de *S. platensis* cultivada en diferentes fuentes de nitrógeno. Ciferri y Tiboni (1985) reportan la composición química de *S. maxima* y *S. platensis* en cultivos de laboratorio y exteriores. Ortega et al. (1993) reporta la composición química de 3 diferentes productos alimenticios hechos de *Spirulina*. No existe mucha información sobre el uso de esta microalga en Acuicultura, solo que se ha utilizado en forma procesada en el cultivo de algunas especies de ornato y de *Artemia* (Benemann, 1992 y Castro et al. 1994).

La utilización de *C. vulgaris* dentro de la Acuicultura no es muy común, por lo que el conocimiento del crecimiento poblacional, la mejor concentración de inóculo inicial y la composición química porcentual bajo cultivos masivos estáticos en condiciones de laboratorio, contribuirá a la optimización de su cultivo y a un mejor aprovechamiento de esta microalga en diferentes operaciones acuiculturales que se realizan en el país. Así mismo, la cianofita *Spirulina* sp., es una microalga que tampoco se utiliza de manera regular dentro

de Acuicultura, por lo que su cultivo masivo bajo condiciones de laboratorio contribuye tanto al conocimiento del crecimiento poblacional, como a una producción que pueda satisfacer las necesidades de alimento vivo y a que tenga una buena calidad nutritiva. En el caso de *Nannochloropsis* sp., se utiliza un medio de cultivo que hasta el momento no ha sido probado en esta microalga, así como el comportamiento poblacional y la composición química bajo condiciones de laboratorio aportan elementos para una mejor producción.

OBJETIVOS

Objetivo general

Producir las microalgas *Chlorella vulgaris* Biejrck, *Spirulina* sp. y *Nannochloropsis* sp. en condiciones de laboratorio.

Objetivos particulares

Determinar la cinética poblacional de cada una de las especies.

Determinar la densidad de siembra óptima para la producción de cada una de las especies.

Determinar la composición porcentual de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como la concentración de clorofila *a* de cada una las especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en su totalidad en las instalaciones del Centro de Apoyo Acuario "Mto. Juan Luis Cifuentes Lemus" de la UNAM *campus* Iztacala.

1. Obtención de las cepas

La cepa de *Chlorella vulgaris* Bieijrick con registro FIZTA 1 fue proporcionada por el Herbario IZTA de la UNAM *campus* Iztacala. La eustigmatoficea *Nannochloropsis* sp. fue donada por la estación Yashima en Japón. La cepa de *Spirulina* sp. se aisló a partir de muestras colectadas en el Lago de Texcoco, según la técnica de filtrado con algodón reportada por Torrenterra y Tacon (1989).

2. Mantenimiento de las cepas y escalamiento de cultivos.

La cepa de *Chlorella vulgaris* se mantuvo en cajas Petri con medio Bold basal sólido (Agar-agar 15 g/l), según lo reporta Nichols (1979). A partir de éstas, se iniciaron cultivos líquidos, aumentando progresivamente el volumen en cada resiembra, hasta llegar a un litro de medio como máximo. *Nannochloropsis* sp. se mantuvo por primera vez en medio Bold basal sólido en agua destilada con 28 ‰ de NaCl. De la misma forma, a partir de las cajas petri se iniciaron cultivos líquidos hasta llegar a un volumen de 1 l. En el caso de la *Spirulina* se utilizó el medio reportado por Becker (1994) y siempre se utilizó medio líquido, ya que esta microalga no creció en el medio solidificado. Para las tres microalgas, se utilizaron todos los medios de cultivo esterilizados en olla exprés a 15 libras de presión durante 15 minutos y un periodo de exposición de 45 minutos a luz UV durante el enfriamiento de los medios, para evitar contaminaciones posteriores.

3. Producción a diferentes concentraciones de inóculo inicial y cinética poblacional.

a. *Chlorella vulgaris*. Para esta microalga se utilizaron 3 concentraciones iniciales de cultivo: 2.5, 5 y 10 millones de células por mililitro en un cultivo estático o "batch". Para la determinación de la densidad celular inicial se utilizó un hematocitómetro con cámara de Neubauer, según la técnica reportada por Fernández (1996). Se realizaron las inoculaciones para cada concentración en 4 botellas de plástico de 2 l, conteniendo 1.85 l de medio Bold basal. Las condiciones de cultivo fueron: aireación constante, luz continua suministrada por 2 lamparas fluorescentes de luz de día de 30 w, con una intensidad luminosa de $57 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (medición realizada con un radiómetro Hansatech O.lr con sensor SKO216Q). La temperatura se mantuvo en $26 \pm 1^\circ \text{C}$. El pH inicial de todos los cultivos fue de 7.2 y al finalizar las pruebas se registraron valores de hasta 9.1. Cada tercer día y después de tomar las muestras para el conteo, se agregó agua destilada con 1 g/l de NaHCO_3 , para reponer el agua evaporada y como fuente de carbono inorgánico.

b. *Nannochloropsis* sp. Para esta microalga, también se utilizaron 2.5, 5 y 10 millones de células por mililitro como densidades iniciales en un cultivo estático, determinadas con un hematocitómetro, según la técnica reportada por Fernández (1996). Se utilizó por primera vez medio Bold basal en agua destilada con 28 ‰ de NaCl. Las pruebas se realizaron por cuadruplicado en botellas de plástico de 2 l, bajo las mismas condiciones ambientales que las de *Chlorella* y la salinidad se mantuvo en las 28 ‰, agregando agua destilada con 1 g/l de NaHCO_3 cada tercer día y mantener el nivel de 1850 ml.

c. *Spirulina* sp. Se determinaron 3 concentraciones iniciales de 0.023, 0.0325 y 0.07 miligramos de materia seca de *Spirulina* por mililitro con la técnica de Sorokin (1979), utilizando mallas de 20μ de abertura de poro para

retener a las células. Todos los pesos se tomaron en una balanza analítica Ainsworth AA-160. Para cada concentración, se inocularon 4 botellas de 2 l con 1.85 l de medio de cultivo reportado por Becker (1994) y se tomaron muestras cada 24 horas para determinar peso seco de la forma ya descrita. La inoculación se realizó directamente de cultivos frescos en plena fase de crecimiento, debido a la dificultad para cosechar este microorganismo. Las condiciones de cultivo fueron iluminación con 2 lámparas de luz de día de 30 watts en un ciclo de luz-oscuridad de 18:6 horas, con una intensidad luminosa de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (medición realizada con un radiómetro Hansatech O.Ir con sensor SKO216Q). La temperatura en las concentraciones iniciales de 0.023 y 0.0325 mg de materia seca/ml fue de $26 \pm 1^\circ \text{C}$, mientras que para la de 0.07 mg de materia seca/ml fue de $30 \pm 1^\circ \text{C}$. El pH de todos los cultivos al inicio fue de 9.1 y al final de las pruebas se obtuvieron valores de hasta 9.8. Cada tercer día, se agregó agua destilada con 0.5 g/l de NaHCO_3 para reponer el agua evaporada.

4. Análisis estadístico.

Con los datos obtenidos de crecimiento poblacional se elaboraron diagramas de dispersión, a partir de los cuales se determinaron las curvas de crecimiento de las tres microalgas. En el caso de *Nannochloropsis* sp y *Chlorella vulgaris*, se observó un crecimiento de tipo logístico:

$$C = A / (1 + be^{-kt})$$

donde:

C = células $\times 10^6$ / ml

b = ordenada al origen

k = tasa de crecimiento

A = número máximo de individuos

t = tiempo (días)

En el caso de la *Spirulina*, el crecimiento fue de tipo lineal y se ajustó el modelo general de la recta:

$$C = kt + b$$

donde

C = miligramos de peso seco de *Spirulina* / ml

t = tiempo (días)

b = ordenada al origen

k = tasa de crecimiento

Los parámetros se calcularon para ambos modelos por especies y concentración inicial. Así mismo, se calculó el coeficiente de determinación (r^2 %).

Para cada especie, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre las tasas de crecimiento (k) de cada una de las concentraciones iniciales. Así mismo, se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias (prueba de Fisher o LSD) para determinar entre cuales de las concentraciones existía diferencia.

5. Determinación porcentual de proteínas, lípidos, carbohidratos y concentración de clorofila a.

Se realizó un análisis bromatológico de las 3 microalgas. Se cosecharon los cultivos en fase de crecimiento tardía, para obtener la mayor cantidad de células y se encuentren en las mejores condiciones fisiológicas posibles (Brown, 1991). En el caso de las microalgas unicelulares, las botellas de cultivo

se dejaron sedimentar por aproximadamente 48 horas a 4 °C. Se desechó la mayor parte de medio de cultivo y el resto se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en ambos casos con agua destilada. En el caso de la *Spirulina*, se filtró a través de una malla de 20 μ y se lavó con agua destilada.

En todos los caso se transfirieron a una charola de aluminio y se secaron en un horno a 50 °C durante 48 h.

La determinación de proteína cruda se realizó por triplicado mediante la técnica de micro-Kjeldalh, con un factor de multiplicación de 5.7 (Otero y Fábregas, 1997). Para la determinación de lípidos totales se utilizó por triplicado la técnica de Soxlet con éter etílico como extractor y para determinar carbohidratos se aplicó la técnica colorimétrica con antrona (método micro). Todas estas técnicas están reportadas por González y Peñalosa (1984).

Para determinar el contenido de clorofila-a se utilizó la extracción con acetona al 90%, midiendo la absorbancia en espectrofotómetro Spectronic 20 a 645 y 663 nm, según la técnica y fórmula reportadas por Becker (1994).

RESULTADOS

Durante el presente estudio, se logró el crecimiento en cultivo estático de las microalgas *Chlorella vulgaris* Biejirick, *Spirulina* sp. y *Nannochloropsis* sp. bajo las condiciones de laboratorio señaladas.

1. Cinética poblacional.

a. *Chlorella vulgaris*. Se obtuvo la curva de crecimiento promedio para cada una de las 3 diferentes concentraciones de inoculación (Figura 1). Dichas curvas se ajustaron a un modelo logístico de crecimiento, representado por la ecuación $C = A/(1+be^{-kt})$, donde la pendiente (k) corresponde a la tasa de crecimiento (Cuadro 1).

El coeficiente de determinación (r^2 %) fue de 99.3 para 2.5×10^6 céls./ml, de 96.6 para 5.0×10^6 céls./ml y de 95.7 para 10×10^6 céls./ml.

Cuadro 1. Cinética poblacional de *Chlorella vulgaris* a diferentes densidades iniciales de inóculo.

Inóculo (10^6 céls./ml)	Tasa de crecimiento (k)	Densidad máxima (10^6 céls./ml)	Tiempo de duración de la fase de inducción (Días)	Tiempo de duración de la fase de crecimiento (Días)	Tiempo de duración de la fase estacionaria (Días)	Tiempo total de la prueba (Días)
2.5	0.692	18.20	1	6	4	11
5.0	0.511	20.11	1	6	2	9
10.0	0.647	21.67	0	5	3	8

De acuerdo con el ANOVA aplicado, se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de crecimiento con diferentes densidades iniciales. La prueba de LSD mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las 3 tasas de crecimiento, siendo la más alta a 2.5×10^6 céls/ml y la menor a 5.0×10^6 céls/ml.

b. *Nannochloropsis* sp. Esta microalga creció en medio Bold basal en agua destilada a una concentración 28 ‰ de NaCl y al igual que con *C. vulgaris*, (Figura 2) la curva se ajustó a un modelo logístico.

El coeficiente de determinación (r^2 %) fue de 97.5 para 2.5×10^6 céls./ml, de 92.2 para 5.0×10^6 céls./ml y de 74.4 para 10×10^6 céls./ml.

Cuadro 2. Cinética poblacional de *Nannochloropsis* sp. a diferentes densidades iniciales de inóculo.

Inóculo (10^6 céls./ml)	Tasa de crecimiento (k)	Densidad máxima (10^6 céls./ml)	Tiempo de duración de la fase de inducción (Días)	Tiempo de duración de la fase de crecimiento (Días)	Tiempo de duración de la fase estacionaria (Días)	Tiempo total de la prueba (Días)
2.5	0.742	22.50	1	7	3	11
5.0	0.865	23.02	1	5	5	11
10.0	0.819	23.56	1	4	6	11

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en el ANOVA, se determinó que existían diferencias significativas entre las tasas de crecimiento. Con la prueba de LSD se determinó que existían diferencias significativas ($p <$

0.001) entre las 3 tasas de crecimiento, siendo más alta a 5.0×10^6 céls/ml y la más baja a 2.5×10^6 céls/ml.

Spirulina sp. Se obtuvieron la curva de crecimiento promedio para cada una de las 3 concentraciones de inoculación (Figura 3). Estas curvas se ajustaron a un modelo general de la recta, representado por la ecuación $C = kt + b$, donde la pendiente (k) representa la tasa de crecimiento. En los 3 casos, en las curvas están definidas 2 fases, una de crecimiento y otra de equilibrio (Cuadro 3).

El coeficiente de determinación (r^2 %) fue de 98.9 para la prueba de 0.023 mg/ml, de 99.5 para la de 0.0325 mg/ml y de 98.3 para la de 0.070 mg/ml.

Cuadro 3. Cinética poblacional de *Spirulina* sp. a diferentes densidades iniciales de inóculo.

Inóculo (mg de materia seca/ml)	Tasa de crecimiento (k)	Densidad máxima (mg./ml)	Tiempo de duración de la fase de crecimiento (Días)	Tiempo de duración de la fase estacionaria (Días)	Tiempo total de la prueba (Días)
0.0230	0.0234	1.12	40	7	47
0.0325	0.0249	1.10	37	7	44
0.0700	0.0614	1.13	30	6	36

Con los resultados del ANOVA, se determinó que existían diferencias significativas en las tasas de crecimiento y con la prueba de LSD se determinó que existen diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las 3 tasas de

crecimiento, resultando más alta a 0.07 mg de materia seca/ml y la menor a 0.0234 mg de materia seca/ml.

2. Análisis bromatológicos.

Los valores obtenidos para cada una de las 3 especies en los análisis para determinar la composición porcentual, se resumen en el cuadro 4.

Cuadro 4. Valores obtenidos en el análisis bromatológico en las 3 especies (con una desviación stanadar menor al 0.5).

Especie	Proteínas (% de materia seca)	Lípidos (% de materia seca)	Carbohidratos (% de materia seca)	Clorofila-a (mg/ml)
<i>Chlorella vulgaris</i>	23.62	10.38	16.18	0.2136
<i>Nannochloropsis</i> sp.	21.38	21.46	16.02	0.05
<i>Spirulina</i> sp.	29.36	9.60	17.38	3.555

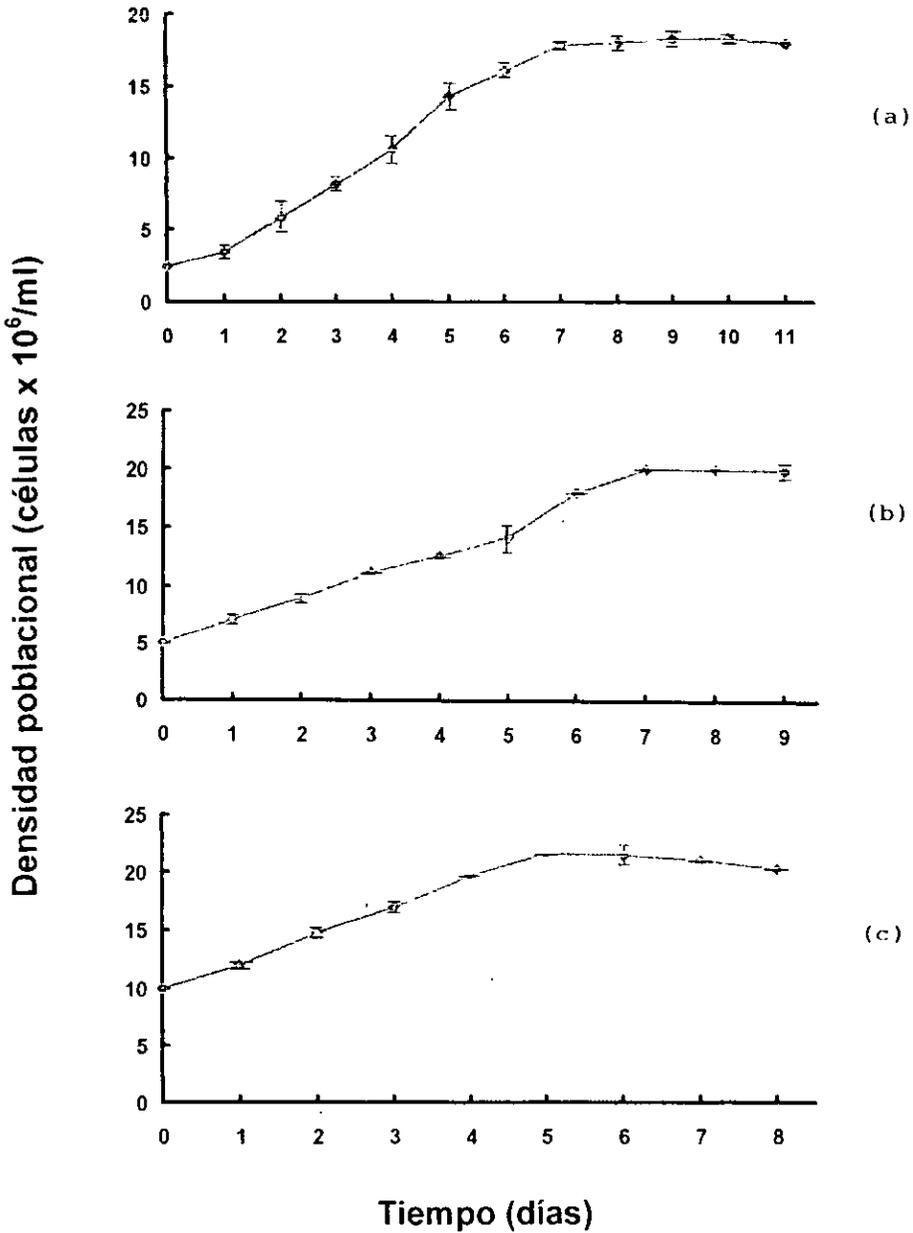


Figura 1. Crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* a 3 diferentes densidades iniciales: (a) 2.5×10^5 células/ml, (b) 5.0×10^5 células/ml y (c) 10.0×10^5 células/ml.

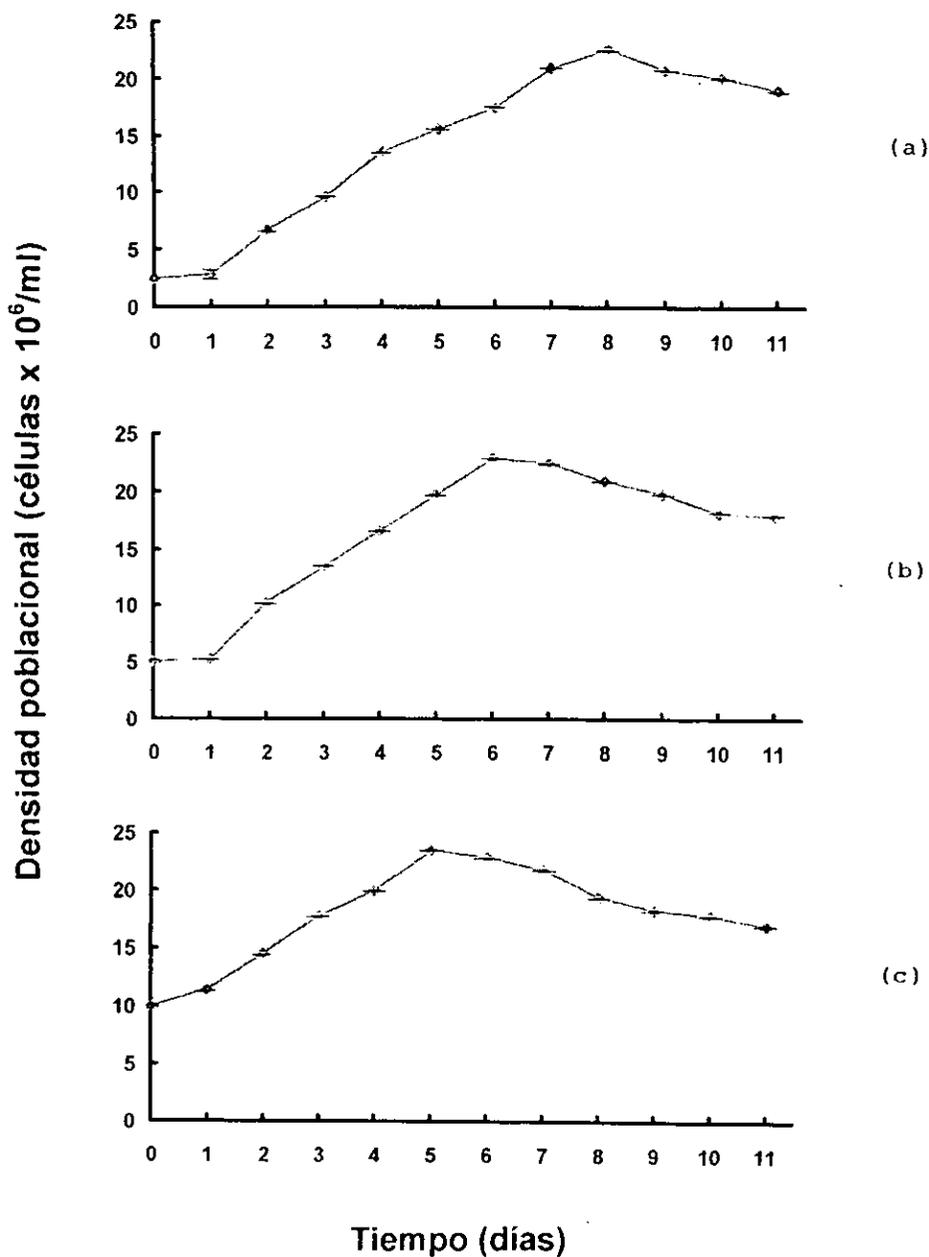


Figura 2. Crecimiento poblacional de *Nannochloropsis* sp. a 3 diferentes densidades iniciales: (a) 2.5×10^6 células/ml, (b) 5.0×10^6 células/ml y (c) 10.0×10^6 células/ml.

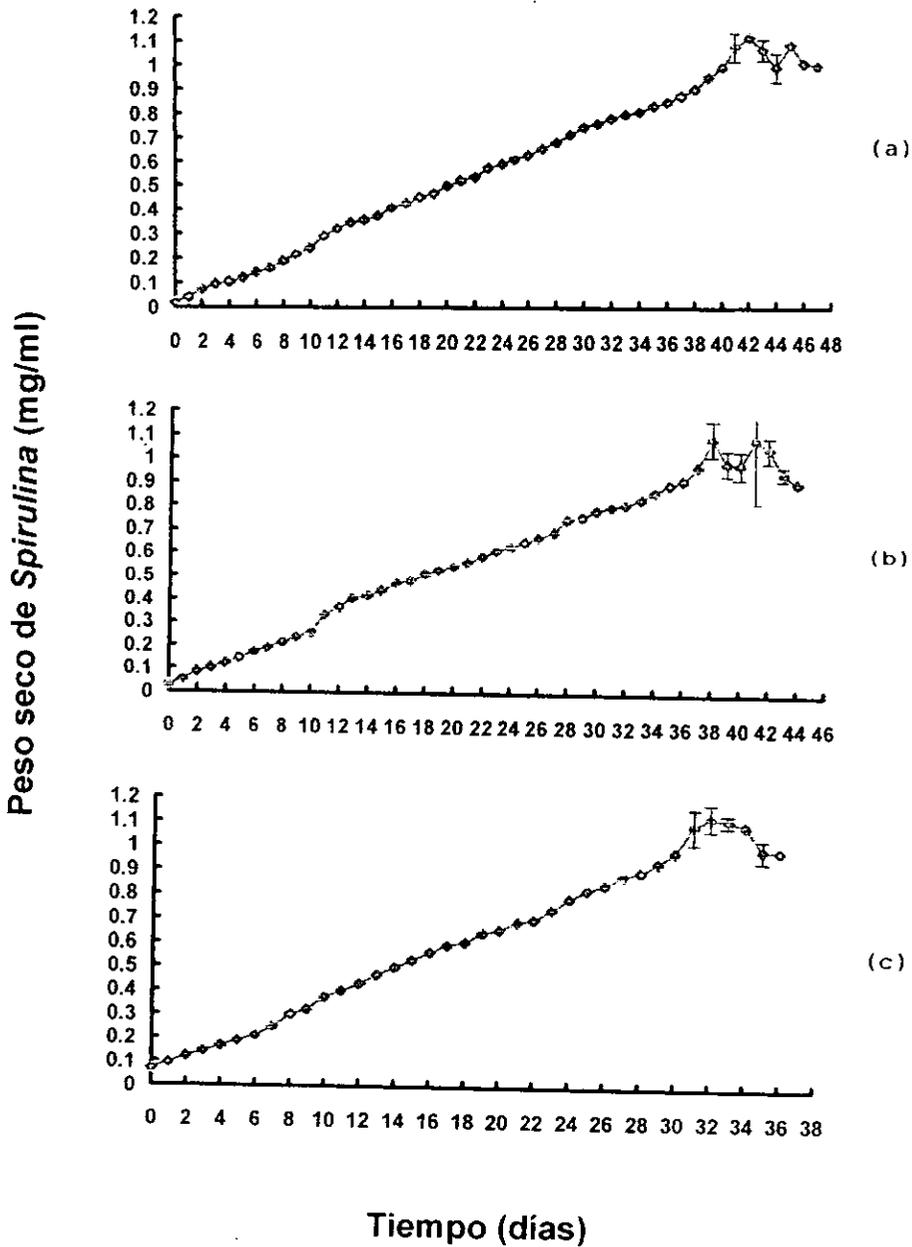


Figura 3. Crecimiento poblacional de *Spirulina* sp. a diferentes densidades iniciales: (a) 0.023 mg de peso seco de *Spirulina*/ml, (b) 0.033 mg de peso seco de *Spirulina*/ml y 0.07 mg de peso seco de *Spirulina*/ml.

DISCUSIÓN

1. Cinética poblacional.

a. *Chlorella vulgaris*. El comportamiento observado en las diferentes fases presentadas en las curvas de crecimiento de esta microalga fue de tipo logístico, con coeficientes de determinación muy cercanos al 100% (Daniel, 1990), diferente al comportamiento exponencial reportado por otros autores como Hirata (1972), Hirata (1975), Oh-Hama y Miyachi (1992) y Vega (1996).

El crecimiento poblacional de esta microalga en las 3 concentraciones de inoculo, muestra que el tamaño inicial no influye en el comportamiento de las curvas de crecimiento, pues se observa que existen las mismas fases en las 3 curvas. No se presentan las 5 fases descritas por Fogg (1975) para el crecimiento poblacional de estos microorganismos, debido a que las condiciones ambientales influyen en la desaparición o duración de algunas de las fases (Becker, 1994).

La fase de aclimatación o de inducción, dura 1 día en las 3 concentraciones y se debe principalmente a que los inoculos utilizados se tomaron de cultivos en plena fase de crecimiento y una buena cantidad de células se encontraba en buenas condiciones fisiológicas, como se discutirá más adelante.

La fase de crecimiento no muestra la duplicación de la población cada 24 horas, debido al régimen de iluminación continua, ya que como lo reportan Kroon y Dijkman (1996), la reproducción de las células aumenta si se les somete a un periodo de oscuridad. De esta forma, Lorenzen (1980) reporta que las células de la cepa de *Chlorella* 211-8b cultivada en este régimen continuo, las células tuvieron tasa de crecimiento reducidas. Esto queda confirmado al hacer referencia a los resultados obtenidos por Vega (1996) con la misma cepa

y sometida a un ciclo de 12:12 h luz-oscuridad, pues aunque las tasas de crecimiento obtenidas en este trabajo son más altas que la obtenida por ella (0.2204 div./día) debido al tiempo de duración en que se llevaron a cabo ambas pruebas, la densidad máxima alcanzada en este último es significativamente más alta. También es posible que el régimen lumínico continuo afecte la asimilación del NaNO_3 , tal como lo reportan Jeanfils et al. (1993). Así mismo, el ion NO_3^- aumenta el costo energético de asimilación de N, comparado con el ion NH_4^+ (Levasseur et al. 1993; Turpin, 1991). Piorreck et al. (1984), reportó un menor tiempo en la fase de crecimiento al utilizar NH_4Cl , que con KNO_3 .

La fase de equilibrio se mantiene aproximadamente de 3 a 5 días en las pruebas, pero se observó una disminución drástica después de este tiempo e incluso severas contaminaciones con protozoos y bacterias. Esta disminución se debe al agotamiento de nutrientes en el medio y que al aumentar la densidad celular, disminuye la entrada de luz al cultivo (Fogg, 1975).

El tiempo total para alcanzar la máxima densidad depende del tamaño del inóculo, ya que a mayor inóculo, es menor el tiempo que tardan los cultivos para llegar a su máxima densidad. Haciendo referencia al tiempo obtenido por Vega (1996) con la misma cepa, obtuvo 13 días para llegar a la máxima densidad en cultivo con un inóculo de 0.5×10^6 céls/ml, mientras que en la prueba de 2.5×10^6 céls/ml, sólo necesitó de 7 días para alcanzar la máxima densidad. Esto se debe principalmente a que a altas concentraciones iniciales (más de 5×10^6 céls./ml), un mayor número de células son viables y están en posibilidad de reproducirse, pues según Fogg (1975), al momento de la inoculación existen muchas células que mueren o pierden temporalmente la capacidad de reproducirse debido a los tratamiento a las que se les somete para la cosecha y reinoculación (centrifugación, refrigeración, cambios drásticos de pH).

La densidad máxima alcanzada en cada una de las 3 concentraciones, es baja en comparación con la obtenida por Vega (1996) de 40×10^6 céls/ml con la misma cepa. Esto se debe a el régimen lumínico, pues la eficiencia fotosintética y la reproducción, disminuyen con periodos de luz más prolongados (Kroon y Dijkman, 1996).

La tasa de crecimiento más alta fue la de 2.5×10^6 céls/ml, lo cual fue significativo de acuerdo al ANOVA realizado. Sin embargo, se observan mejores comportamientos en las otras 2 concentraciones, ya que no sólo producen más células, sino también alcanzan las máximas densidades en menos tiempo. Así y desde el punto de vista de la producción en Acuicultura, la mejor concentración inicial es la 5×10^6 cels./ml, debido a que produce una densidad máxima comparable a la de 10×10^6 céls./ml, junto con el tiempo que tarda para alcanzar dicha densidad, aun cuando tenga la constante de crecimiento más baja.

b. *Nannochloropsis* sp. El comportamiento observado en las curvas de crecimiento de esta microalga se ajusta a un modelo de tipo logístico, con coeficientes de determinación muy cercanos al 100 %. Este modelo ha sido aplicado muy pocas veces en esta microalga (Cruz, 1985 y Hernández et al. 1997).

Al igual que *C. vulgaris*, las fases en las 3 curvas de *Nannochloropsis* no se ven afectadas por la diferencia en tamaño de inóculo. Sólo se presentan 3 de las 5 fases reportadas por Fogg (1975), debido a las condiciones ambientales en las cuales se realizaron los cultivos (Becker, 1994), sobre todo al régimen lumínico al que se les sometió.

La fase de inducción es muy corta, ya que para la inoculación se utilizaron cultivos en pleno crecimiento y altas concentraciones iniciales, lo que ayuda a un crecimiento acelerado de la población (Fogg, 1975). Así mismo,

Hernández et al. (1997) reportan fases de inducción muy cortas al utilizar inóculos muy densos.

Durante la fase de crecimiento, se encontraron similitudes con los trabajos de Álvarez et al. (1996) con *N. gaditana* y de Hernández et al. (1997) con *N. oculata*, ya que no existe un crecimiento con la duplicación de la población cada 24 horas. Esto se debe a que la iluminación constante podría afectar la eficiencia de los fotosistemas e incidir en un descenso en la reproducción celular (Kroon y Dijkman, 1996). Sukenik y Carmeli (1990) encontraron en *Nannochloropsis* sp. sometida a un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, que durante la fase oscura la población se dividía hasta en 60% y que no existía ese proceso durante el periodo de luz y la mayor cantidad de clorofila *a* se encontraba en el inicio de esta fase, sintetizada durante la fase oscura del ciclo. Esto confirma que un régimen de luz de 24 horas no es el más adecuado para la producción de grandes densidades de esta microalga.

La fase de equilibrio se mantuvo entre los 4 y 7 días, con disminuciones en el número de células en cada una de los conteos. Esta disminución se debe al agotamiento de nutrientes en el medio y que al aumentar la densidad celular, disminuya la entrada de luz al cultivo (Fogg, 1975), ya que como lo reportan Flynn et al. (1993) para esta microalga, al disminuir la concentración de N, no existe un crecimiento poblacional muy alto (aproximadamente 7.70×10^6 céls./ml en 25 días).

El tiempo para alcanzar las densidades más altas depende de la concentración inicial de inóculo y es muy probable que se deba a la mayor cantidad de células inoculadas, pues una mayor proporción puede sobrevivir a los cambios físicos y químicos a las que se le somete al momento previo y durante la inoculación, como lo reporta Fogg (1975). Esto se ve reforzado por el trabajo de Hernández et al. (1997), donde se manejan altas inoculaciones para

iniciar sus pruebas (de 17.5×10^6 céls/ml) y se alcanzan las máximas densidades en 7 días.

La máxima densidad alcanzada en este trabajo es baja en comparación con los trabajos de Brown et al. (1993), Hernández et al. (1996), Álvarez et al. (1996) y Hernández et al. (1997) con especies del mismo género y donde incluso se alcanzan densidades de 150×10^6 céls./ml. Esto se debe, como ya se maneja anteriormente, al régimen lumínico que se aplicó a los cultivos de esta microalga. La salinidad es otro parámetro que podría influir, no sólo en las máximas densidades iniciales, sino también en las tasas de crecimiento. Muchos trabajos se han realizado con agua de mar natural y se han obtenido densidades más altas que las reportadas en este trabajo (Sukenik y Carmeli, 1990; Brown et al. 1993).

En cuanto a las tasas de crecimiento obtenidas en este trabajo son más altas que las de Hernández et al. (1997) y muy similares a las encontradas por Sukenik et al. (1989) en condiciones de iluminación continua y a una intensidad luminosa cercana ($60 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), lo que indica que el régimen lumínico afecta la eficiencia de los cultivos para aumentar la producción. En el caso de *Nannochloropsis* no se encontró ningún argumento para determinar que NaNO_3 como fuente de N haya afectado las constantes de crecimiento como en el caso de *C. vulgaris*, pues aunque sí existe una preferencia por el NH_4^+ en la clase Eustigmatophyceae, las tasas de crecimiento son similares utilizando ambos iones como única fuente de N (Levasseur et al. 1993).

Se observa que el mejor comportamiento es el 5×10^6 céls/ml, lo cual es significativo de acuerdo al ANOVA realizado. Esto se debe a que se producen más células por unidad de tiempo en esta concentración, aunque debe de considerarse que la tasa de crecimiento de la concentración inicial de 10×10^6 céls/ml incluye más valores en la fase de equilibrio.

Desde el punto de vista de la producción para la Acuicultura, la concentración de 5×10^6 céls./ml es la más adecuada pues no solo su reproducción es la mejor, sino que la máxima densidad obtenida es similar a la de 10×10^6 céls/ml y la diferencia para llegar a esta densidad es de apenas 1 día. Así, esta concentración responde a la necesidades que se requieren para la producción de una microalga, rápido desarrollo y un producción aprovechable (De Pauw et al. 1984).

Spirulina sp. El comportamiento de esta microalga observado en las curvas de crecimiento se ajustó al modelo general de la recta, con coeficientes de determinación muy cercanos al 100 % (Daniel, 1990). Este comportamiento es diferente al exponencial reportado por otros autores (Vonshak et al. 1983; Vonshak y Richmond, 1985; Qiang y Richmond. 1996).

La densidad inicial no afecta el comportamiento de las curvas de crecimiento, ya que las 3 presentan las 2 fases, una de crecimiento lineal y otra de equilibrio.

La ausencia de fase de inducción se debe a 2 factores, el primero es que para los inoculos se utilizaron cultivos en plena fase de crecimiento y el segundo, a que se utilizó una técnica de inoculación distinta a la que se les aplicó a las microalgas unicelulares. El uso directo de cultivos en buen estado para la inoculación podría disminuir los tiempos de producción para otras microalgas y desaparecer la fase de inducción, aún cuando no se hagan inoculos muy densos como en caso de este trabajo, en comparación con otros trabajos (Qiang et al. 1996).

La fase de crecimiento no presenta el típico desarrollo exponencial, debido a 2 factores ambientales. Uno es la temperatura, pues en la curva de inoculación con 0.07 mg/ml fue la que tuvo un mejor crecimiento y en menor

tiempo debido a que la prueba se llevó a cabo a una temperatura más alta que las otras 2. Así, la temperatura es uno de los factores que puede influir directamente en el crecimiento de esta microalga, como lo demuestran algunos otros trabajos al mantener los cultivos entre los 32 y 35 °C (Cohen et al. 1993; Tanticharoen et al. 1994; Qiang et al. 1996; Qiang y Richmond, 1996) y obtener crecimientos del tipo exponencial. Así mismo, Piorreck et al. (1984) obtuvieron fases de crecimiento con una duración de 35 días con *S. platensis* con una temperatura continua de 22 °C. Otro factor importante que podría influir es la concentración de NaHCO_3 aplicada en el medio de cultivo. Vonshak et al. (1983) y Chung et al. (1978) reportan que obtienen mejores crecimientos en concentraciones de 15 a 30 g/l de NaHCO_3 para *S. platensis* en condiciones de laboratorio. La concentración de NaHCO_3 en el medio de cultivo reportado por Becker es de 9 g/l y aunque esta cepa nunca pudo crecer de forma adecuada en una concentración de más de 16 g/l, es posible que a concentraciones entre 12 y 15 g/l se de un crecimiento mejor y más rápido, combinado con temperaturas más altas.

La fase de equilibrio duró 6.5 días en promedio en las 3 pruebas, con fluctuaciones en los valores de biomasa y se debe a que altas densidades, existe un aumento en la turbidez impidiendo la entrada de luz al cultivo y causando lisis en algunas células, además un agotamiento de nutrientes (Qiang et al. 1996). La máxima densidad alcanza en las 3 concentraciones, es similar a los resultados de otros autores (Piorreck et al. 1984; Olaizola y Dueer, 1990; Qiang y Richmond, 1996).

Se observa que el mejor crecimiento se obtuvo en la concentración de 0.07 mg/ml, lo cual es significativo de acuerdo al ANOVA realizado, ya que no solo tiene una constante de crecimiento más alta, sino también un menor tiempo en alcanzar la máxima densidad. Es importante hacer notar que esta prueba se realizó en una temperatura más alta y que esto definitivamente influyó en el mejor rendimiento.

Desde el punto de vista de aprovechamiento, la concentración de 0.07 sigue siendo la más adecuada para la producción, ya que no requiere de mucho volumen de inóculo y que produce una densidad máxima adecuada. Es probable que las constantes de crecimiento aumenten y por ende la producción, si los cultivos son sometidos a temperaturas más altas y se aumenten las concentraciones de NaHCO_3 .

2. Composición porcentual de proteínas, lípidos, carbohidratos y concentración de clorofila a.

a. *Chlorella vulgaris*. El contenido de proteína obtenido de 23.62 % de la materia seca es relativamente más bajo que los reportados por Becker (1994), Oh-Hama y Miyachi (1992) y Renaud et al. (1994). Esto se debe al régimen lumínico continuo que causa una disminución en la cantidad de proteínas, como lo reportan Brown (1991) y Renaud et al. (1994). Además, la iluminación continua podría afectar la asimilación de N y afectar la síntesis normal de proteínas (Piorreck et al. 1984). Esto queda reforzado, con el trabajo de Ahlgren et al. (1992), que manteniendo iluminación continua, encuentra niveles de proteína muy parecidos a los obtenidos en este trabajo.

Los niveles de clorofila-a, son bajos con respecto a los obtenidos en otros trabajos (Piorreck et al. 1984; Piorreck y Pohl, 1984; Oh y Rhee, 1991), debido al régimen lumínico, que impide la síntesis normal de fotopigmentos (Kroon y Dijkman, 1996).

El 10.83 % de lípidos obtenido en este trabajo, son más altos a los reportados por Oh-Hama y Miyachi (1992). Esto podría deberse a que el régimen de iluminación continua afecta la asimilación del ion NO_3^- y generar un proceso similar a la deficiencia de N, ya que durante ésta, las células aumentan la síntesis de lípidos y se cree que se debe a que estos compuesto

son moléculas de reserva y no requieren de N para sintetizarlos (Roessler, 1990).

Aunque no existe mucha información con respecto a la cantidad de carbohidratos bajo condiciones de iluminación continua y/o deficiencia de N, se cree que también pueden aumentar bajo estas condiciones (Roessler, 1990; Becker, 1994). Sin embargo en esta cepa es difícil determinar si la cantidad de carbohidratos es alta, ya que Vega (1996) reporta que la concentración de estos compuestos es la más alta en las células, con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 y el mismo medio de cultivo, por lo que es posible que sea una característica de la cepa. Así mismo, existen diversos reportes con porcentajes similares a los encontrados en este trabajo (Brown y Jeffrey 1992; Becker, 1994), por lo que esta constancia no sólo podría darse en la cepa, sino en todo el género.

b. *Nannochloropsis* sp. En el caso de esta microalga, el porcentaje de 21.36 de proteínas, es más bajo que los reportados por otros autores en diferentes especies de *Nannochloropsis* (Brown, 1991; Renaud et al. 1991; Brown et al. 1993; Volkman et al. 1993 y Renaud et al. 1994). Esto se debe principalmente al régimen lumínico en que se realizaron los cultivos, ya que todos estos trabajos se realizaron con ciclo de 12:12 horas luz-oscuridad. Así mismo, Brown (1991) reporta un descenso en el porcentaje de proteína en cultivos con iluminación continua, en comparación con los sometidos a un periodo de oscuridad.

El contenido de clorofila-a es extremadamente bajo, en comparación con los reportes antes mencionados, lo que refuerza la idea de que la luz continua afecta no sólo la producción de proteínas, sino también la de clorofila, que finalmente incide en la producción. Sukenik y Carmeli (1990) reportan que la síntesis de clorofila-a en *Nannochloropsis* se realiza en la fase oscura, por lo que la iluminación continua genera muy poca producción de este pigmento.

El 21.46 % de lípidos es similar a los reportados en otros trabajos (Brown et al., 1993; Renaud et al., 1994 ; Volkman et al. 1993) o ligeramente más alto (Renaud et al. 1991). Se sabe que las especies del género *Nannochloropsis* tienen altas concentraciones de lípidos, sin embargo pueden aumentar conforme aumenta la salinidad, tal como lo reportan Renaud y Parry (1994). Este aumento en los lípidos, no ha sido explicado completamente, pero podría deberse en respuesta al aumento de la presión osmótica (Roessler, 1990).

El 16.02 % de carbohidratos son significativamente más altos a los encontrados en los trabajos ya mencionados. Este comportamiento podría deberse al régimen lumínico continuo al cual se sometieron los cultivos, ya que se ha sugerido que bajo esta condición los carbohidratos aumentan (Roessler, 1990). No existen argumentos para determinar que la salinidad afecta su síntesis, como en el caso de los lípidos, ya que Renaud y Parry (1994) reportan niveles constantes a diferentes salinidades. Sin embargo, la variación de carbohidratos bajo condiciones ambientales diferentes no ha sido estudiada a profundidad y solo existen muy pocos reportes con la descripción de la composición que presentan algunas especies (Brown, 1991; Brown y Jeffrey, 1992).

c. *Spirulina* sp. El 29.36 % de proteínas de esta cianofita es notablemente más bajo que las reportadas para *S. maxima* y *S. platensis* en diferentes trabajos, donde incluso se obtiene hasta un 70%. (Chung et al. 1978; Durand, 1980; Saxena et al. 1982; Santillan, 1982; Ciferri y Tiboni, 1985; Reed et al. 1985; Ortega et al. 1993; Becker, 1994). Ciferri y Tiboni (1985) y Richmond (1992) reportan que altas concentraciones de NaHCO_3 en la biomasa seca pueden disminuir significativamente el contenido de proteína hasta en un 30% (muy cercano al obtenido en este trabajo), debido a un aumento en las cenizas. Esta interferencia por NaHCO_3 ocurre en biomasa

obtenida por filtración, donde no siempre es posible un buen lavado. Esta técnica de cosecha se llevó a cabo en el presente estudio, por lo que es posible que la cantidad de proteína este subestimada.

La cantidad de clorofila-a determinada en este trabajo se encuentra en niveles similares e incluso más altos a los obtenidos en otros trabajos (Saxena et al. 1982; Santillan, 1982; Ortega et al. 1993), lo que indica que la cantidad de proteínas se encuentra subestimada, ya que existe una relación muy estrecha en la síntesis de proteínas y de pigmentos para la fotosíntesis (Turpin, 1991).

El contenido de lípidos en esta microalga, es muy semejante al obtenido en otros trabajos (Chung et al. 1978; Durand, 1980; Saxena et al. 1982; Santillan, 1982; Ciferri y Tiboni, 1985; Ortega et al. 1993; Becker, 1994). Los porcentajes entre el 4 y 9 % parece ser una constancia dentro del género, ya que no existe ningún reporte en que bajo diferentes condiciones existan cambios significativos en la concentración de estos compuestos (Piorreck et al. 1984). Se tienen reportes que bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad luminosa, solo existen cambios en la composición de las fracciones más importantes de lípidos (Cohen et al. 1987; Cohen y Vonshak, 1991).

Al igual que los lípidos, los carbohidratos parecen tener una constancia en todas las especies del género que actualmente se producen. El porcentaje de 17.38 es semejante a los obtenidos en los trabajos ya mencionados. De igual forma, ningún parámetro ambiental parece influir en la síntesis de estos compuestos, aunque existen muy pocos reportes sobre este aspecto.

3. Utilización dentro de la Acuicultura.

La utilización de estas 3 microalgas cultivadas bajo las condiciones ya mencionadas, dentro de la producción acuacultural es bastante amplio.

La cepa de *C. vulgaris* ha demostrado ser susceptible de producirse a nivel masivo y puede servir de alimento para algunas especies de rotíferos o de cladóceros. Estos 2 grupos de organismos son capaces de degradar la gruesa pared celular que caracteriza a las especies del genero *Chlorella*. Los niveles de proteínas, lípidos y carbohidratos reportados, aunque relativamente bajos, han permitido el crecimiento de poblaciones de *Brachionus calyciflorus* (Sarma et al. 1997) y a su vez éstos han servido como alimento a crías de algunas especies de ornato que actualmente se reproducen en Acuario de la UNAM campus Iztacala (observaciones personales). Así, la producción de esta microalga bajo las condiciones de laboratorio en las cuales se cultivó durante este trabajo, puede servir como apoyo en la producción de peces de ornato o de especies comestibles como la tilapia o la carpa herbivora (Benemann, 1992), ya sea en forma fresca o procesada.

La eustigmatophyceae *Nannchloropsis* sp., tiene una larga tradición como organismo de cultivo en granjas de peces marinos, camarones y sobre todo para la alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis*. Este aprovechamiento se debe al gran contenido de EPA y DHA, que han demostrado ser esenciales para el crecimiento de los organismos (Renaud et al. 1994; Fernández, 1996 y Yamaguchi, 1997). Sin embargo, todavía no se encuentran las condiciones ideales de producción de estos ácidos grasos (obviamente sin olvidar los demás compuestos, como proteínas y carbohidratos), por lo que la investigación en este punto es variada, como lo demuestran los diversos trabajos realizados (Renaud y Parry, 1994; Álvarez et al. 1996; Hernández et al, 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las altas concentraciones de lípidos pueden ser susceptibles de producción bajo iluminación continua, aunque no se obtengan densidades muy altas. Esta microalga puede ser utilizada en las fases más críticas de alimentación de peces de ornato marinos o en forma seca para alimentar a peces dulceacuícolas, donde el EPA también es esencial (Lubenz et al. 1995).

También es posible utilizar este tipo de cultivos para obtener inoculos de buena calidad para una producción masiva en exteriores, tal como lo reporta Trotta (1981).

La utilización de *Spirulina* dentro de la Acuicultura siempre se ha reducido a la alimentación de *Artemia* (Watanabe, 1983; Castro et al. 1994). Bajo las condiciones de cultivo en las que se mantuvo a esta microalga, puede ser utilizada para aumentar la coloración de algunas especies de ornato y debido a su alto contenido de proteína, también puede ser utilizada en la alimentación de juveniles de peces de ornato y comestibles dulceacuícolas. También es posible utilizarla en forma procesada para alimentación de especies comestibles marinas, ya que la fracción lipídica de esta microalga es abundante en ácido γ -linolenico (Tanticharoen et al. 1994), el cual ha incrementado la supervivencia de algunas especies de peces comerciales (Benemann, 1992). También es posible utilizarla para alimentar al rotífero *Brachionus dimidiatus*, que a su vez podría utilizarse en la alimentación de peces de ornato.

CONCLUSIONES

1. Se logró la producción de las microalgas *Chlorella vulgaris* Biejirick, *Nannochloropsis* sp. y *Spirulina* sp. bajo las condiciones en las que se mantuvieron en el laboratorio.
2. Las curvas de crecimiento en caso de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* sp. se ajustaron a un modelo logístico. Las curvas de crecimiento de *Spirulina* sp. se ajustaron a un modelo lineal.
3. La cinética poblacional de cada una de las especies está determinada por factores ambientales. En el caso de *C. vulgaris*, por el régimen lumínico de 24 h y por el uso de NaNO_3 como fuente de N. Para *Nannochloropsis* sp., el principal factor fue el régimen lumínico y probablemente la salinidad. En el caso de la *Spirulina* sp., la temperatura juega un papel determinante en comportamiento de la cinética, así como la concentración de NaHCO_3 .
4. El mejor tamaño de inóculo para la producción desde el punto de vista de la Acuicultura en las 2 especies unicelulares es la de 5×10^6 céls./ml, debido a las ventajas que presenta al alcanzar la máxima densidad en un tiempo corto y que se pueden producir grandes volúmenes.
5. En el caso de la producción de *Spirulina* sp., la máxima eficiencia de encontró en la concentración de 0.07 mg/ml.
6. Las concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos en cada una de las 3 especies están determinadas por las condiciones ambientales. En el caso de *C. vulgaris*, el régimen lumínico y por el uso de NaNO_3 como fuente de N. Para *Nannochloropsis* sp. el factor más importante fue el de la iluminación continua. En el caso de *Spirulina* sp., parece existir una constancia en estos compuestos.

7. Estas 3 especies fueron producidas exitosamente bajo las condiciones de cultivo en las que mantuvieron y pueden utilizarse dentro de cualquier operación acuacultural

8. Se pueden considerar ajustes en los cultivos de *C. vulgaris*, con la implementación de un ciclo luz-oscuridad y una fuente de N más fácilmente asimilable para esta microalga. En el caso de *Nannochloropsis* sp., aumentar la salinidad podría aumentar la cantidad de biomasa por unidad de cultivo. Por ultimo, en el caso de *Spirulina* sp., aumentar la temperatura acortaría el tiempo de cultivo y permitiría una mayor producción de biomasa.

REFERENCIAS

- Ahlgren, G., Gustafsson, Y. y Boderg, M. 1992. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *J. Phycol.* 28: 37-50
- Álvarez, L., Hernández, O., Comas, A., Martínez, V. y Lozano, B. 1996. Efecto de la reducción de salinidad sobre la tolerancia a altas temperaturas en la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1981. *Hidrobiológica*. 6: 39-42
- Arredondo, B. y Vazquez, R. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. XVII (98): 99-111
- Becker, E. 1994. Microalgae, Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press. Cambridge. 293 pp.
- Benneman, J. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.* 4: 233-245
- Borowitzka, M. y Borowitzka, L. (Eds.) 1992. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge. 477 pp.
- Brown, M. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145: 79-99
- Brown, M. y Miller, K. 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *J. Appl. Phycol.* 4: 205-215
- Brown, M. y Jeffrey, S. 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 91-113
- Brown, M., Garland, C. Jeffrey, S. Jameson, Y. y Leori, J. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.* 5: 285-296
- Burlew, J. (Ed.) 1953. Algal culture from laboratory to pilot plant. Pub no. 600, Washington D.C., Carnegie Institution.
- Castro, T., de Lara, R. y Castro, J. 1994. El crustaceo *Artemia franciscana* alimentado con *Spirulina* spp. fresca, como dieta de especies acuáticas comerciales. *Hidrobiológica*. 4: 15-20
- Chung, P., Pond, W., Kingsbury, J., Walker, E. y Krook, L. 1978. Production and nutritive value of *Arthrospira platensis* a spiral blue-green alga grown on swine wastes. *J. Animal Science*. 47: 319-330

- Cifferi, O. y Tiboni, O. 1985. The biochemistry and industrial potencial of *Spirulina*. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 503-526
- Cohen, Z., Vonshak, A. y Richmond, A. 1987. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various enviromental conditions. *Phytochemistry.* 26: 2255-2258
- Cohen, Z. y Vonshak, A. 1991. Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina*-like and Cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. *Phytochemistry.* 30: 205-206
- Cohen, Z., Reungjitachawali, M., Siangdung, W. y Tanticharoen, M. 1993a. Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* 5: 109-115
- Cruz, S. 1985. Crecimiento de fitoplancton en cultivo bialgal. *Rev. Invest. Mar.* 6: 109-117
- Daniel, W. 1993. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3ª. Limusa-Noriega. México. 667 pp.
- De Pauw, N. Morales, J. y Persoone, G. 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture system: Progress and constarins. *Hydrobiologia.* 116/117: 122-134
- De Pauw, N. y Persoone, G. 1992. Micro-algae for aquaculture en Borowitzka, M. y Borowitzka, L. (Eds.) *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge Univerdity Press. Cambridge. 197-221
- Durand, H. 1980. Production and use of *Spirulina* in Mexico en Shelef, G. y Soeder, C. (Eds.) *Algae Biomass*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. 51-64
- Dunstan, G., Volkman, J., Barret, S. y Gardlan, C. 1993. Changes in the lipid composition and maximation of the polyinsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5: 71-83
- Fernández, M. 1996. Microalgae culture en *International workshop on rotifer culture system manual*. UNAM Iztacala. 9-21
- Fernández, M. y Hernández, H. 1997. Isolation of desired algal species and preparation of inoculum en *International workshop on field cultivation technology of rotifers for use as food in Aquaculture, field and laboratory manual*. UNAM Iztacala. 7-14

- Flynn, K. Davidson, K. y Leftley, J. 1993. Carbon-nitrogen relations during batch growth of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) under alternating light and dark. *J. Appl. Phycol.* 5: 465-475
- Fogg, G. 1975. Algal cultures and Phytoplankton Ecology. 2a. University of Wisconsin Press. London. 12-36
- González, S. y Peñalosa, I. 1984. Técnicas de biomoléculas. ENEP Iztacala-UNAM. 350 pp.
- Hernández, O., Álvarez, L., Comas, A. y Martínez, V. 1996. Efectos de la temperatura y la iluminación sobre el crecimiento de dos microalgas: *Nannochloropsis gaditana* Lubian 1982 y *Tetraselmis tetraathele* (West) Butcher, 1959. *Hidrobiológica*. 6: 43-47
- Hernández, O., Álvarez, L., Comas, A. y Martínez, V. 1997. Efectos del CO₂ en la productividad del cultivo en agua salada de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1981. *Rev. Invest. Mar.* 18: 58-64
- Hirata, H. 1972. The growth of *Chlorella* cells in culture. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 21: 15-21
- Hirata, H. 1975. Preliminary report on the photoperiodic acclimation for growth of *Chlorella* cells in synchronized culture. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 24: 1-6
- Hodgson, P., Henderson, R., Sargent, J. y Leftley, J. 1991. Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture I. The growth cycle. *J. Appl. Phycol.* 3: 161-181
- Jeanfils, J., Canisius, M. y Burlion, N. 1993. Effect of high nitrate concentration on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *J. Appl. Phycol.* 5: 369-374
- Karlson, B., Potter, D., Kuylenstierna, M. y Andersen, R. 1996. Ultrastructure, pigment composition and 18s rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae) a marine ultraplankton isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. *Phycologia*. 35: 253-260
- Kroon, B. y Dijkman, N. 1996. Photosystem II quantum yields, off line measured P/I parameters and carbohydrate dynamics in *Chlorella vulgaris* grown under a fluctuating light regimen and its application for optimizing mass cultures. *J. Appl. Phycol.* 8: 313-324

LeBorgne, Y. 1991. Cultivo de microalgas en: Barnabé, G. (Ed.) *Acuicultura I.Omega*. Barcelona. 156-1

Lee, Y. y Tay, H. 1991. High CO₂ partial pressure depresses productivity and bioenergetic growth yield of *Chlorella pyrenoidosa* culture. *J. Appl. Phycol.* 3: 95-101

Lavassieur, M., Thompson, P. y Harrison, P. 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *J. Phycol.* 29: 587-595

Lorenzen, H. 1980. Time measurements in unicellular algae and its influence on productivity en Shelef, G. y Soeder, C. (Eds.) *Algae Biomass*. Elsevier/Holland Biomedical. Amsterdam. 411-419

Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O. y Sukenik, A. 1995. Potencial advantages of frozen algae (*Nannochloropsis*) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*. 133: 295-309

Nichols, W. 1979. Growth media - freshwater en: Stein (Ed.) *Handbook of phycolological methods, culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. Cambridge. 7-24

Oh, H. y Rhee, G. 1991. A comparative study of microalgae isolated from flooded rice paddies: light-limited growth, C fixation, growth efficiency and relative N and P requirement. *J. Appl. Phycol.* 3: 211-220

Oh-Hama, T. y Miyachi, S. 1992. *Chlorella* en Borowitzka, M. y Borowitzka, L. (Eds.) *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge. 3-26

Olaizola, M. y Dueer, E. 1990. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* 2: 97-104

Ortega, J., Mazuelos, C. Hermosin, B y Saiz, C. 1993. Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. *J. Appl. Phycol.* 5: 425-435

Otero, A. y Fábregas, J. 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*. 159: 11-123

Paniagua, J., Bückle, F., Granados, C. y Loya, D. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. 2ª. CICESE. México. 61 pp.

Piorreck, M., Baasch, K. y Pohl, P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*. 23: 207-216

Piorreck, M. y Pohl, P. 1984. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue green algae during one growth phase. *Phytochemistry*. 23: 217-223

Quiang, H., Guterman, H. y Richmond, A. 1996. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities. *J. Phycol.* 32: 1066-1073

Quiang, H. y Richmond, A. 1996. Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by lighth intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate. *J. Appl. Phycol.* 8: 139-145

Radmer, R. y Parker, B. 1994. Commercial aplications of algae: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 6: 93-98

Ramos, A. y Salazar, M. 1990. Uso potencial de los cultivos masivos de microalgas en De la Lanza, G. y Arredondo, J. (Eds.) *La Acuicultura en México: de los conceptos a la producción*. Instituto de Biología-UNAM. México. 274-288

Reed, R., Warr, S., Richardson, D. Moore, D. y Stewart, W. 1985. Blue-green algae (cyanobacteria): prospects and prespective. *Plant and Soil*. 89: 97-106

Renaud, S., Parry D., Thinh, L., Kuo, C. Padovan, A. y Sammy, N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 3: 43-53

Renaud, S., Parry, D. y Thinh L. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: gross chemical and fatty acids composition of twelve species of microalgae from the Nothern Teritorry, Australia. *J. Appl. Phycol.* 6: 337-345

Renaud, S. y Parry, D. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acids composition of three species of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 6: 347-356

Richmond, A., Vonshak, A. y Arad, S. 1980. Enviromental limitations in outdoor production of algal biomass en Shelef, G. y Soeder, C. (Eds.) *Algae Biomass*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. 65-72

Richmond, A. (Ed.) 1986. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press. Boca Raton.

- Richmond, A. 1992. *Spirulina* en Borowitzka, M. y Borowitzka, L. (Eds.) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge. 85-121
- Roessler, P. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26: 393-399
- Santillan, C. 1982. Mass production of *Spirulina*. *Experientia*. 38: 40-43
- Sarma, S., Fernández, M y Amador, R. 1997. Influence of food concentration and inoculation density on the population growth of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera). *Env. Ecol.* 5:435-441
- Saxena, P., Ahmad, M., Shyam, R. y Misra, P. 1982. Chemical composition of sewage-grown *Spirulina platensis*. *Experientia*. 38: 1438
- Shelf, G. y Soeder, C. (Eds.) 1980. Algae biomass. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Sorokin, C. 1979. Dry weight, packed cell volumen and optical density en Stein (Ed.) *Handbook of phycolological methods, culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. Cambridge. 313-320
- South, R. y Whittick, A. 1987. Introduction to phycology. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 5-45
- Stein, J. (Ed.) 1979. Handbook of phycolological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. Cambridge
- Sukenik, A., Carmeli, Y. y Berner, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25: 686-692
- Sukenik, A. y Carmeli, Y. 1990. Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *J. Phycol.* 26: 463-469
- Sukenik, A., Zmora, O. y Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipids composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*. 17: 313-32
- Tamiya, H. 1957. Mass culture of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8: 304-334

Tanticharoen, M., Reungjitchachawali, M., Boonag, B., Vonktaveesuk, A., Vonshak, A. y Cohen, Z. 1994. Optimatization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* 6: 295

Torrentera, L. y Tacon, A. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. FAO. Brasil. 90 pp.

Trotta, P. 1981. A simple and inexpensive system for continous monoanexic mass culture of marine microalgae. *Aquaculture.* 22: 383-387

Turpin, D. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* 27: 14-20

Vega, S. 1996. Caracterización y análisis bromatológico de una cepa monoalgal: *Chlorella vulgaris* Beijerinck colectada de la atmosfera con posible uso en Acuicultura. Tesis Profesional. UNAM *campus* Iztacala. México. 46 pp.

Volkman, J., Jeffrey, S., Nichols, P., Rogers, G. y Garland, C. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240

Volkman, J., Brown, M., Dunstan, G. y Jeffrey, S. 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. *J. Phycol.* 29: 69-78

Vonshak, A., Boussiba, A., Abeliovich, A. y Richmond, A. 1983. Production of *Spirulina platensis* biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. *Biotechnology and Bioengineering.* 25:341-349

Vonshak, A. y Richmond, A. 1985. Problems in developing tha biotechnology of algal biomass production. *Plant and Soil.* 89: 129-135

Vonshak, A. 1987. Strain selection of *Spirulina* suitable for mass production. *Hydrobiologia.* 151/152: 75-77

Vonshak, A., Chanawongse, L., Bunnag, B. y Tanticharoen, M. 1996. Ligth acclimation and photoinhibition in three *Spirulina platensis* (cyanobacteria) isolates. *J. Appl. Phycol.* 8:30-40

Watanabe, T., Kitajima, C. y Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish:a review. *Aquaculture.* 34: 115-143

Yamaguchi, K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *J. Appl. Phycol.* 8: 487-502

Yongmanitchai, W. y Ward, O. 1991. Screening of algae for potencial alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*. 30: 2963-2967

Zarrouk, C. 1966. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physique et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Ph. D. thesis. University of Paris. France.

APÉNDICE 1

Clasificación de los organismos producidos bajo condiciones de laboratorio (Tomada de South y Whittick, 1987)

Reino Plantae
 División Chlorophycota
 Clase Chlorophyceae
 Orden Chlorococcales
 Familia Chlorellaceae
Chlorella vulgaris Biejerinck 1890

Descripción (Vega, 1996). Células verdes aisladas de forma elipsoidal hasta esférica o globular en células viejas. Autoesporas generalmente elipsoidales, raramente esféricas y ligeramente irregulares. Pared celular delgada sin zonas fragmentadas de celulosa, hidroxiprolina y glicosidos. Cloroplasto en forma de copa o formando una banda como cinta en forma de caldero. Un pirenoide visible usualmente con 2 a 4 granulos de almidón en forma de copa y cubiertos. Principales pigmentos, clorofila *a* y *b*; α , β y γ carotenos. Sustancias de reserva, almidón (Amilosa y amilopectina).

Reino Plantae
 División Chromophycota
 Clase Eustigmatophyceae
 Orden Monodopsicoccales
 Familia Monodopsidaceae
Nannochloropsis sp. Hibbert 1981

Descripción (Karlson et al. 1996). Células verdes de forma globosa de 2 a 4 μm de diametro. Con 1 a 2 cloroplastos con un gran cuerpo naranja a rojizo, el cual es completamente independiente del cloroplasto. Reproducción asexual por la formación de autoesporas o zoosporas, esta últimas presentan un flagelo sencillo un segundo cuerpo basal. Células sin pared. Principales pigmentos, clorofila *a* y *c*, β caroteno, violaxantina y vaucherixantina. Sustancias de reserva, aceites.

Reino Monera
 División Cyanoaphycota
 Clase Cyanophyceae
 Orden Oscillatoriales
 Familia Oscillatoriaceae
Spirulina sp. De Toni 1936

Descripción (Richmond, 1992). Tricomas multicelulares de forma espiral y sin ramificaciones, envueltos en una delgada vaina. Reproducción a través de células intercalares que pierden el citoplasma, formando un neridio el cual se rompedando origen a pequeñas cadenas de células. Principales pigmentos, clorofila *a*, β -caroteno, *c*-ficoeritrina, allofocianina, *c*-fococianina, Sustancia de reserva, ficocianina.

MEDIO BOLD BASAL (Nichols, 1979)

MACRONUTRIENTES. Disolver los siguientes reactivos en 1 l de agua destilada:

1. NaNO_3	25.0 g
2. CaCl_2	2.5 g
3. MgSO_4	7.5 g
4. K_2HPO_4	7.5 g
5. KH_2PO_4	17.5 g
6. NaCl	2.5 g

De estas soluciones, agregar 10 ml a 1 l de agua

MICRONUTRIENTES. Disolver los siguientes reactivos en 1 l de agua destilada:

Solución A.

1. EDTA	50.0 g
2. KOH	31.0 g

Solución B.

1. FeSO_4	4.98 g
2. H_2SO_4	1.00 ml

Solución C.

1. H_3BO_3	11.42 g
----------------------------	---------

Solución D.

1. ZnSO_4	8.82 g
2. MnCl_2	1.44 g
3. MoO_3	0.71 g
4. CuSO_4	1.57 g
5. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$	0.49 g

MEDIO PARA *Spirulina* (Becker, 1994). Disolver los siguientes reactivos en 1 l de agua destilada.

NaHCO_3	9.00 g
K_2HPO_4	0.50 g
NaNO_3	1.50 g
MgSO_4	0.20 g
FeSO_4	0.01 g
K_2SO_4	1.00 g
CaCl_2	0.04 g
Sal marina	1.00 g