

PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE *Chaetoceros muelleri* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES Y DENSIDADES DE INÓCULOS.

Mario Nieves ^{1*}, Diana J. López ¹, M. Alejandra Medina ¹, Pablo Piña ¹, Sylvia Leal ² y José Antonio López-Eliás ³

(1) Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo para la Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n, CP 82000, Sinaloa, Mazatlán, México.

(2) Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16 No. 114, Playa, CP 11300, Ciudad Habana, Cuba.

(3) Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Rosales y Niños Héroes s/n Col. Centro, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.

(*) Autor correspondiente: Email: maniso@mzt.megared.net.mx

RESUMEN

En el presente trabajo se combinan diferentes niveles progresivos del medio f con distintas densidades de inóculo con el fin de disminuir el tiempo en la rutina de producción de la microalga marina *Chaetoceros muelleri* Lemmermann. Se ensayaron cinco niveles del medio de cultivo de Guillard (f/2, f, 2f, 4f, 8f) y cuatro densidades de inóculos: 50, 100, 150 y 200 x 10³ cel·mL⁻¹. Se analizó la concentración celular, la tasa de división a las 24 y 48 horas y la cantidad de biomasa a las 48 horas. Los cultivos se realizaron por triplicado con cuatro réplicas por tratamiento. Se determinó la densidad celular por conteo directo, la tasa de división acumulada, el peso seco total y orgánico, así como la composición proximal. Los resultados permiten asegurar que existe una tendencia al aumento de la densidad celular a niveles progresivos del medio f, pero menos significativa con la densidad del inóculo. El contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos también presentó este comportamiento, siendo más evidente para los inóculos de 100 y 200 x 10³ cel·mL⁻¹. A las 24 horas de cultivo, cualquier combinación de los medios f, 2f, 4f y 8f, con los inóculos de 100, 150 y 200 x 10³ cel·mL⁻¹, es adecuada para escalar a mayores volúmenes de cultivo sin necesidad de agregar nutrientes, reduciendo de esta manera la rutina de producción.

Palabras clave: microalgas; cultivo; medios de cultivo; inóculos; biomasa; composición bioquímica; *Chaetoceros muelleri*

ABSTRACT

This work tested different progressive levels of the medium f combined with different inocula densities, with the purpose of reducing the production routine time of the marine microalgae *Chaetoceros muelleri* Lemmermann. Five levels of the Guillard culture medium (f/2, f, 2f, 4f, 8f) and four initial cell densities of 50, 100, 150 and 200 x 10³ cel·mL⁻¹ were evaluated in triplicate with four replicas for each treatment. Cellular density and division rate were analyzed after 24 and 48 hours. Cellular density was determined by direct count, rate of accumulated division, dry weight, organic weight, and proximal composition were also determined. The results suggest that there is a tendency to increase the cellular density according to the progressive levels of the medium f, but less significant with the inocula density. The content of proteins, lipids and carbohydrates also presented this behavior, particularly the inocula of 100 and 200 x 10³ cel·mL⁻¹. After 24 hours of culture, any combination of the media f, 2f, 4f and 8f, with the inocula of 100, 150 and 200 x 10³ cel·mL⁻¹, is adequate to reach greater culture volumes without necessity of adding nutrients, thus reducing the production routine.

Key words: microalga; culture; culture medium; inocula; biomass; biochemical composition; *Chaetoceros muelleri*

El cultivo a nivel masivo de microalgas es considerado como la fuente de alimento de mayor importancia para los organismos cultivados comercialmente, debido a la calidad y factibilidad de cultivo del fitoplancton. La necesidad de producir grandes cantidades, con buena calidad, a bajos costos, ha traído como consecuencia la aplicación de diversos medios de cultivo. Entre ellos, el más comúnmente usado para cultivar especies de agua salada, es el medio f de Guillard y Ryther (1962), del cual se utilizan varias diluciones y variantes como las llamadas f/2 y h/2 (López-Eliás *et al.*, 2008).

Los laboratorios productores de larvas de *Litopenaeus vannamei* utilizan diferentes niveles de dilución del medio f para la producción de microalgas, además de que hay cultivos que se realizan en el interior y otros al exterior. En el caso de los cultivos interiores, la temperatura y la luz son controladas, mientras que en el segundo, estos factores no son controlados causando modificaciones que repercuten en la variabilidad de la cantidad de biomasa y de la composición bioquímica de las microalgas producidas (López-Eliás *et al.*, 2005).

De acuerdo a las condiciones ambientales y ubicación geográfica de los laboratorios se deben establecer rutinas de producción, donde se obtengan en el menor tiempo posible concentraciones de microalgas adecuadas, que a su vez, servirán como inóculos en el escalado de los cultivos que exige la producción final de biomasa para ser utilizada en la alimentación de organismos cultivados.

Entre las especies de microalgas más comúnmente utilizadas como alimento vivo en acuicultura se encuentran varias diatomeas planctónicas, como *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *T. weissflogii*, y desde luego varias más del género *Chaetoceros*, destacando por su uso frecuente en la alimentación de larvas de camarones peneidos, la especie *Chaetoceros muelleri* (Apt y Behrens, 1999; Farías-Molina, 2001; Voltolina y López-Elías, 2002).

La composición bioquímica de las microalgas, al igual que cualquier otro organismo, varía en función de la respuesta metabólica y fisiológica propia de cada especie a las condiciones ambientales en las cuales se lleva a cabo su cultivo. De este modo, aunque los cultivos se realizaran bajo las mismas condiciones, las especies de microalgas pertenecientes a un mismo género e incluso entre las mismas especies podrían presentar una composición bioquímica diferente, y en consecuencia variaciones tanto en peso individual como en composición proximal en términos de proteínas, lípidos y carbohidratos.

La mayor parte de los costos en la producción de microalgas se atribuyen, principalmente, a los salarios del personal asignado a esa área, así como a la energía eléctrica utilizada, sobre todo en los cultivos interiores derivada de la iluminación constante y el control de la temperatura. Considerando que el costo del medio de cultivo ocupa el último lugar en el marco de los insumos aplicados a la rutina de producción, en este estudio se investiga la posibilidad de incidir en la reducción de la duración de la misma para la diatomea marina *C. muelleri*. Con esta finalidad, se comparan diferentes niveles progresivos del medio f y densidades del inóculo, bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie *Chaetoceros muelleri* se obtuvo por donación de la Colección de Microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de

Ensenada (CICESE), México y mantenida en la Laboratorio de Microalgas de la Universidad de Sinaloa con la clave CH-M-1.

El agua de mar que se utilizó en los cultivos, cuya salinidad se mantuvo entre 34 y 35 ups, fue filtrada a través de tres filtros de cartucho de 10, 5 y 1 μm y después a través de dos filtros de carbón activado. Posteriormente se trató químicamente adicionando hipoclorito de sodio comercial al 5% durante 24 horas. El cloro residual fue eliminado agregándole 0.06 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiosulfato de sodio, verificando la neutralización con ortotoluidina.

La concentración de nutrientes de los cinco niveles progresivos del medio Guillard f propuestos en este estudio fueron el f/2, f, 2f, 4f y 8f que se prepararon de acuerdo a la formulación descrita por Guillard y Ryther (1962).

Los experimentos se realizaron en recipientes de plástico transparente con capacidad de 3.5 L que fueron colocados aleatoriamente sobre estantes de madera donde recibían iluminación constante generada por seis tubos fluorescentes de luz blanca que emitían un flujo de fotones de 120-130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Cada tratamiento constó de cuatro repeticiones donde el volumen experimental fue de 3.0 L. Los cultivos fueron agitados mediante burbujeo continuo con aire pasado por filtro de cartucho de 1 μm . La temperatura del cuarto de cultivo se mantuvo entre 23 y 24°C.

El inóculo de cada uno de los cuatro tratamientos fue cultivado en medio f/2 los cuales fueron preparados en recipientes independientes de 20 L, en volúmenes de 12 L y con densidades de inóculo de 50, 100, 150 y 200 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹. Posteriormente los inóculos fueron distribuidos en las cuatro repeticiones de cada tratamiento.

Cada experimento se repitió tres veces con una duración de 48 horas, midiendo el pH a intervalos de 24 horas con un potenciómetro calibrado con estándares de 7 y 10 unidades de pH. La densidad celular se evaluó diariamente mediante conteo directo bajo un microscopio compuesto binocular Olympus modelo CH30, con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad equipado con regilla de Neubauer.

Análisis de la biomasa.

La biomasa de los cultivos fue evaluada solamente a las 48 horas. Se obtuvieron muestras para determinar el peso seco (PS) y el peso orgánico (PO)

de las microalgas para de esta manera obtener la biomasa producida en cada uno de los tratamientos. Durante este proceso se utilizaron filtros de fibra de vidrio GF/C de 47 mm, previamente precalibrados en una balanza analítica semimicro Denver Instrument modelo M-220D de 0.01 mg de precisión. Una vez concentradas las microalgas en el filtro, las muestras se lavaron con 2-3 mL de una solución de formiato de amonio al 4%.

Los filtros con las muestras se secaron en una estufa convencional a 60°C durante, al menos, 24 horas y posteriormente se pesaron en una balanza analítica semimicro. Se repitió este procedimiento al menos tres veces hasta lograr un peso constante. Una vez obtenido éste los filtros que contenían las muestras fueron incinerados en una mufla a 450°C durante 8 horas, pesándolos cada hora hasta obtener el peso constante correspondiente a la cantidad de cenizas. Finalmente la cantidad de sustancia orgánica fue calculada a partir de la diferencia entre el PS de las microalgas retenidas en el filtro y el peso de las cenizas del mismo (Sorokin, 1973).

La tasa de división o duplicación celular de cada una de las repeticiones en los diferentes tratamientos se calculó a las 24 y 48 horas, de acuerdo a la siguiente fórmula: $\mu = \ln(C_{t+1}/C_t)/\ln 2$ donde: C_{t+1} = concentración celular al tiempo t+1 y C_t = concentración celular al tiempo t (Nieves *et al.*, 1998). Por otra parte, la tasa de división acumulada ($\Sigma\mu$), que equivale al número de divisiones registradas al tiempo t, se calculó sumando de manera sucesiva los valores de μ . Este parámetro aporta la detección precisa de la fase final del crecimiento exponencial que no es fácilmente identificable de manera visual a partir de las curvas de crecimiento.

La composición proximal de las microalgas se estimó con las técnicas analíticas convencionales, usando muestras filtradas en filtros GF/C de 25 mm. La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.* (1951), previa extracción con hidróxido de sodio 0.1 mol L⁻¹ en calor durante 15 minutos. La extracción de los carbohidratos se realizó con ácido sulfúrico de acuerdo a Whyte (1987), cuantificando con el procedimiento de Dubois *et al.* (1956). Los lípidos se extrajeron según Bligh y Dyer (1959) y se cuantificaron con el método de Pande *et al.* (1963).

Las curvas de calibración se hicieron con los estándares de albúmina de suero de bovino (Sigma A-7906), de glucosa anhidra (Sigma G-8270) y de

tripalmitina (Sigma T-5888) para proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente. En el mismo orden se utilizaron las longitudes de onda 750, 485 y 590 nm para las lecturas de absorbancia de los estándares y de las muestras.

Análisis estadístico

Los datos generados en cada fase experimental se analizaron mediante pruebas de análisis de varianza de dos factores, paramétricos o no paramétricos, dependiendo de los resultados de las pruebas de normalidad de Lilliefors y de igualdad de varianzas de Bartlett. Cuando los estadísticos de prueba resultaron significativos, los datos se contrastaron mediante las correspondientes pruebas *a posteriori* de comparaciones múltiples de Tukey o tipo Tukey según fuera el caso (Wilson, 1956; Box *et al.*, 1978; Snedecor y Cochran, 1980; Conover, 1980; Zar, 1999; Sokal y Rohlf, 2000). Se trabajó con un nivel de significancia de 0.05 y los datos fueron procesados con el paquete estadístico SigmaStat versión 2.0 para Windows.

RESULTADOS

Concentración celular

En la [Tabla 1](#) se muestran los valores de las concentraciones celulares promedio a las 24 y 48 horas. En ella se observa que los valores más bajos registrados a las 24 horas fueron con el medio f/2 y con el inóculo de 50 x 10³ cél·mL⁻¹; y el más alto, se obtuvo con el tratamiento 8f-200 x 10³ cél·mL⁻¹. Se puede notar además, que la densidad celular promedio a las 48 horas se mantuvo independiente del inóculo utilizado e incrementándose con la concentración de nutrientes, de tal manera que las menores concentraciones celulares se obtuvieron con el medio f/2 y las mejores con el 8f-100 y el 8f-200 x 10³ cél·mL⁻¹.

Aunque a las 24 horas se observa una cantidad abundante de traslapes en los tratamientos f y 2f combinados con 100, 150 y 200 x 10³ cél·mL⁻¹, los resultados no dejan de ser alentadores, debido a que son adecuados para ser utilizados como inóculos para escalar los cultivos con factores de dilución entre 5 y 7. Con respecto al resto de los tratamientos, que resultaron significativamente superiores a partir del medio f y el inóculo de 100 x 10³ cél·mL⁻¹; y más específicamente, enfocando la atención en los valores mejores que se registraron en los tratamientos 4f-100, 8f-100 y 8f-200 x 10³ cél·mL⁻¹, con promedios que fluctuaron entre 1.413 y 1.565 x 10⁶ cél·mL⁻¹, se

Tabla 1. Concentración celular promedio y desviación estándar ($\times 10^6$ cel·mL⁻¹) de *Chaetoceros muelleri* a las 24 y 48 horas cultivada con diferentes niveles del medio f y densidades de inóculo ($\times 10^3$ cel·mL⁻¹). Letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

INÓCULO	MEDIOS DE CULTIVO (Tratamientos)				
	f/2	f	2f	4f	8f
24 horas					
50	0.687 ^a ± 0.088	0.764 ^a ± 0.117	0.755 ^a ± 0.084	0.659 ^a ± 0.094	0.751 ^a ± 0.107
100	0.741 ^a ± 0.065	1.068 ^{bcd} ± 0.081	1.065 ^{bcd} ± 0.107	1.187 ^{de} ± 0.077	1.426 ^f ± 0.108
150	0.721 ^a ± 0.072	1.091 ^b ^{cd} ± 0.333	1.081 ^{bcd} ± 0.114	0.969 ^b ± 0.064	1.036 ^{bc} ± 0.085
200	0.742 ^a ± 0.099	1.163 ^{cde} ± 0.076	1.285 ^e ± 0.074	1.413 ^f ± 0.091	1.565 ^g ± 0.162
48 horas					
50	0.926 ^a ± 0.076	1.316 ^b ± 0.150	1.829 ^c ± 0.179	2.858 ^{ef} ± 0.302	3.454 ^g ± 0.379
100	0.828 ^a ± 0.091	1.372 ^b ± 0.100	2.077 ^d ± 0.251	3.310 ^g ± 0.299	3.839 ^h ± 0.452
150	0.789 ^a ± 0.091	1.439 ^b ± 0.139	1.818 ^c ± 0.143	2.673 ^e ± 0.235	3.40 ^g ± 0.347
200	0.782 ^a ± 0.123	1.413 ^b ± 0.089	1.968 ^{cd} ± 0.142	2.930 ^f ± 0.268	3.998 ^h ± 0.470

Tabla 2. Tasa de división a las 24 horas (div·dia⁻¹) y número de divisiones totales a las 48 horas de *Chaetoceros muelleri* cultivada con diferentes niveles del medio f y densidades de inóculo ($\times 10^3$ cel·mL⁻¹). Letras diferentes indican que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

INÓCULO	MEDIO DE CULTIVO (Tratamientos)				
	f/2	f	2f	4f	8f
24 horas					
50	3.763 ^{hi} ± 0.203	3.916 ⁱ ± 0.239	3.908 ⁱ ± 0.169	3.706 ^h ± 0.207	3.896 ⁱ ± 0.207
100	2.885 ^e ± 0.130	3.413 ^f ± 0.112	3.406 ^f ± 0.137	3.566 ^g ± 0.094	3.830 ^{hi} ± 0.110
150	2.259 ^b ± 0.141	2.821 ^{de} ± 0.331	2.842 ^{de} ± 0.159	2.689 ^{de} ± 0.095	2.783 ^{de} ± 0.119
200	1.879 ^a ± 0.192	2.537 ^c ± 0.095	2.681 ^d ± 0.082	2.818 ^{de} ± 0.092	2.962 ^e ± 0.143
40 horas					
50	4.206 ⁱ ± 0.117	4.709 ^l ± 0.164	5.187 ⁿ ± 0.144	5.829 ⁿ ± 0.159	6.102 ^o ± 0.160
100	3.042 ^d ± 0.159	3.775 ^g ± 0.108	4.367 ^j ± 0.178	5.044 ^m ± 0.128	5.253 ⁿ ± 0.169
150	2.387 ^b ± 0.162	3.256 ^e ± 0.142	3.595 ^f ± 0.115	4.068 ^h ± 0.095	4.497 ^k ± 0.139
200	1.951 ^a ± 0.220	2.818 ^c ± 0.090	3.295 ^e ± 0.105	3.867 ^g ± 0.131	4.312 ^{ij} ± 0.172

define más claramente el uso potencial como inóculos para el escalamiento de estos cultivos, sin necesidad, incluso, de agregar nutrientes a los volúmenes de cultivo subsecuentes. Por otra parte, en función de la densidad de inóculo con los diferentes medios a las 24 horas, se aprecia que aumenta la concentración celular al compararlo con el inóculo más bajo.

A las 48 horas, se aplicó un ANOVA de dos factores no paramétrico que detectó un efecto altamente significativo de ambos factores ($p < 0.001$) sobre la densidad celular. En la tabla antes mencionada, se observa que el efecto de la concentración de nutrientes sobre la densidad celular es más importante, debido a que siempre aumentó de manera significativa en todos los niveles de inóculo experimentados, donde los tratamientos con el medio f/2 fueron siempre más bajos con respecto al resto de los tratamientos, con valores de 0.782 a 0.926 $\times 10^6$ cel·mL⁻¹ en los inóculos de 200 y

50 $\times 10^3$ cel·mL⁻¹, respectivamente. Dada la tendencia que siguieron los cultivos, los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos con el medio 8f y los inóculos de 100 y 200 $\times 10^3$ cel·mL⁻¹, con valores de 3.839 y de 3.998 $\times 10^6$ cel·mL⁻¹.

Tasa de división

La tasa de duplicación celular (μ) a las 24 horas varió de 1.879 a 3.916 correspondientes a los tratamientos f/2-200 y f-50 $\times 10^3$ cel·mL⁻¹, con diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2). La tendencia de μ fue la de aumentar entre el medio f/2 y f; posteriormente, para niveles superiores, la tasa de división promedio registró fluctuaciones para los tratamientos con inóculo de 50, 100 y 150 $\times 10^3$ cel·mL⁻¹. En los tratamientos con inóculo de 200 $\times 10^3$ cel·mL⁻¹, μ fue aumentando conforme se incrementó la concentración de nutrientes.

Tomando en cuenta la concentración de nutrientes, se puede observar que la mayoría de los mejores valores de la tasa de división se registraron en el inóculo de 50×10^3 cél·mL⁻¹, con valores que fluctuaron entre 3.706 y 3.916 div·día⁻¹, los cuales, con excepción del valor más bajo registrado en este nivel de inóculo, no resultaron significativamente diferentes. Se infiere que la concentración de nutrientes, en este caso, no afectó la tasa de división celular.

No se presentaron diferencias marcadas entre los tratamientos con inóculos de 150 y 200 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹, pero éstos a su vez si fueron notablemente inferiores a los de inóculos de 50 y 100 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹; mientras que en los tratamientos con inóculo de 200 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹, μ presentó una tendencia a aumentar desde 1.879 a 2.962 div·día⁻¹ conforme se incrementó la concentración de nutrientes, pero ésta no siempre fue significativa.

En el inóculo de 100 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹, μ aumentó significativamente con el medio f y se mantuvo sin diferencia con el medio 2f, posteriormente los aumentos fueron significativos con 3.566 div·día⁻¹ con el medio 4f y 3.830 div·día⁻¹ con el medio 8f. Por otra parte, cuando el inóculo fue de 150 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹, nuevamente de 2.259 div·día⁻¹ registradas con el medio f/2, μ aumentó significativamente hasta un valor promedio de 2.821 div·día⁻¹ con el medio f. A partir de este nivel de concentración de nutrientes no se encontraron diferencias significativas, al grado de que la tasa de división celular promedio se mantuvo fluctuando entre 2.689 y 2.842 div·día⁻¹, valores que corresponden a los medio 4f y 2f, respectivamente.

En relación al factor densidad del inóculo, se observa en los tratamientos con el medio f/2 y f que μ disminuyó significativamente conforme aumentó la densidad del inóculo. En los tratamientos con el medio 2f, también se observó la misma tendencia, sólo que ésta no siempre fue significativa, debido a que los tratamientos 2f-150 y 2f-200 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹, resultaron ser estadísticamente similares.

Los niveles de concentración de nutrientes correspondientes a los medios 4f y 8f también disminuyeron significativamente conforme aumentó la densidad del inóculo y, a diferencia de los primeros tres niveles del medio f, μ disminuyó significativamente en ambos casos, con el inóculo de 150 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹ hasta 2.689 div·día⁻¹ con el medio 4f y 2.783 div·día⁻¹ con el medio 8f respec-

tivamente. A partir de estos tratamientos μ tuvo un ligero aumento pero no fue significativo.

A las 48 horas, tiempo promedio que rutinariamente es considerado apropiado para escalar estos cultivos a volúmenes mayores, el número de divisiones totales ($\Sigma\mu$) aumentó conforme se incrementó la concentración de nutrientes del medio, con valores que fluctuaron entre 1.951 y 6.102 divisiones, pertenecientes a los tratamientos f/2-200 y 8f-50. $\times 10^3$ cél·mL⁻¹, respectivamente. En todos los casos, los valores máximos y mínimos se obtuvieron siempre en los tratamientos con los inóculos de 50 y 200 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹ respectivamente.

En relación al factor densidad del inóculo, se observa una disminución de $\Sigma\mu$ conforme aumenta la densidad del inóculo, en donde las diferencias más notables se presentaron entre las concentraciones de nutrientes definidas como medios f/2 y 8f; el resto de los tratamientos se ubican entre los dos antes mencionados.

Los resultados de las pruebas estadísticas correspondientes se presentan en la tabla antes referida. El ANOVA de dos factores aplicado a esta variable de respuesta indicó que hay, en primer lugar, un efecto positivo y altamente significativo de la concentración de nutrientes, seguido de un efecto negativo de la densidad del inóculo, además de un efecto interactivo de ambos factores. En todos los casos, el número de divisiones aumentó significativamente conforme se incrementó la concentración de nutrientes, no resultando así cuando se aumentó la densidad del inóculo.

Finalmente, el efecto de la disminución del número de divisiones totales en función de la densidad del inóculo obtenidas a las 48 horas es contundente; siendo aún más notable la superioridad de esta variable, cuando se comparan los valores promedio de los niveles extremos de concentración de nutrientes (f/2 y 8f) para un mismo inóculo. Por ejemplo, en 50 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹ el medio 8f supera al f/2 en un 45% más de divisiones totales y en el de 200 $\times 10^3$ cél·mL⁻¹ el medio 8f superó al f/2 en un 121%.

Biomasa

Al término de los cultivos se observó una tendencia fluctuante de la biomasa lograda en términos de PS conforme se incrementó la concentración de nutrientes. Los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos con el medio 8f, aunque es

notable también un alto nivel de variabilidad de la desviación estándar y los traslapes detectados en el medio f y los diferentes tamaños de inóculos y el inóculo de 200×10^3 cel·mL⁻¹ con las variaciones de las concentraciones de nutrientes de los medios (Tabla 3).

En relación al incremento de la densidad del inóculo, también se observa una tendencia fluctuante del PS obtenido a las 48 horas, donde los tratamientos con el medio 8f son aparentemente superiores al resto de los tratamientos. Por debajo de éstos no se observan tendencias claras de que haya un efecto manifiesto debido al aumento de la densidad del inóculo.

Cuando aplicamos las pruebas estadísticas se observa que, en función del aumento de la concentración de nutrientes y de la densidad del inóculo, el PS presentó una tendencia fluctuante, sin embargo, analizando el PS en relación con el aumento de nutrientes, es en los tratamientos con el medio 8f y 100×10^3 cel·mL⁻¹ donde se obtuvieron biomásas mayores con respecto al resto de los tratamientos, con un valor máximo de 607.540 mg·L⁻¹ (que equivaldría a 160.277 pg·cel⁻¹).

Las menores concentraciones de biomasa se obtuvieron en los tratamientos con medio f/2, pues los valores estimados con este nivel de nutrientes y los diferentes inóculos utilizados no mostraron diferencias estadísticas. En función de la densidad del inóculo, no se observa una tendencia clara del aumento de la biomasa conforme se incrementa la densidad del inóculo, motivo por el cual se puede afirmar que esta variable es independiente de este factor.

En esta misma tabla observamos que el PO aumenta en la misma medida que aumentamos la concentración de nutrientes y el tamaño del inóculo excepto en los tratamientos 4f y 8f a 100×10^3 cel·mL⁻¹ que ofrecieron los mayores pesos (185.060 y 241.550 mg·L⁻¹ respectivamente), aunque los abundantes traslapes en los tratamientos f, 2f y 4f apuntan a que la cantidad promedio de sustancia orgánica es independiente de la concentración de nutrientes. Las pruebas estadísticas demostraron que, independientemente de los traslapes encontrados, no existen diferencias marcadas si analizamos los diferentes tamaños de inóculos para cada concentración de nutrientes, no resultando así cuando vemos el marcado aumento del PO en cada uno de los

tamaños de inóculos cuando aumentamos la concentración de nutrientes.

En la Tabla 4 se observa una tendencia al aumento de los componentes orgánicos mayoritarios estudiados a medida que se incrementa la concentración de nutrientes y el tamaño del inóculo, registrándose los mayores valores de proteínas con el medio 8f en los inóculos de 100 y 200×10^3 cel·mL⁻¹ (93.52 y 88.33 µg·mL⁻¹ respectivamente). Igual resultó con los lípidos (70.10 y 66.16 µg·mL⁻¹ respectivamente) y con los carbohidratos (57.71 y 54.51 µg·mL⁻¹ respectivamente). Los valores más bajos siempre se hallaron con el medio f/2 que no difirieron con los del medio f a inóculos de 50 y 100×10^3 cel·mL⁻¹.

DISCUSIÓN

A nivel mundial existen muchas investigaciones acerca de las diferentes estrategias utilizadas con el fin de optimizar la productividad de las microalgas para su uso como alimento vivo en organismos acuáticos en cultivo. Sin embargo, este trabajo resulta novedoso debido a que no se encontró ningún antecedente de la utilización de niveles progresivos del medio f combinado con diferentes densidades de inóculo. El único trabajo donde refieren dos niveles del medio f (f/2 y f) y dos concentraciones de inóculo (200 y 400×10^3 cel·mL⁻¹) es el de López-Eliás *et al.* (2008) que prueban estos tratamientos en dos tiempos de inoculación, a las 06:00 y a las 12:00 horas, en cultivos masivos utilizando recipientes de 250 litros.

Cuando se comparan las concentraciones de *C. muelleri* registradas en los niveles progresivos del medio f y las densidades de inóculo utilizados, se logró determinar que sólo hasta las 48 horas de haber iniciado los cultivos, la densidad celular aumentó de manera significativa únicamente cuando se incrementó la concentración de nutrientes y cuando se aumentó el tamaño de inóculo para los medios 4f y 8f. Los autores mencionados anteriormente no encontraron diferencias significativas entre las concentraciones registradas a las 48 horas con los diferentes medios de cultivo que emplearon (f/2 y f), excepto cuando aumentaron el inóculo a 400×10^3 cel·mL⁻¹, donde si las encontraron a los dos tiempos de inoculación que ensayaron (06:00 y 12:00). Cuando inocularon con 200×10^3 cel·mL⁻¹ a las 06:00 obtuvieron concentraciones de 0.750 y 0.820×10^6 cel·mL⁻¹ para los medios f/2 y f; mientras que con cultivos inoculados a las 12:00

Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar de los pesos seco y orgánico en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de *Chaetoceros muelleri* cultivada con diferentes niveles del medio f y densidades de inóculo ($\times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$). Letras diferentes indican que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

INÓCULO	MEDIOS DE CULTIVO (Tratamientos)				
	f/2	f	2f	4f	8f
Peso seco					
50	87.185 ^a ± 13.169	120.097 ^{abc} ± 12.223	219.594 ^d ± 34.839	330.655 ^e ± 41.497	510.170 ^g ± 46.435
100	88.004 ^a ± 12.288	114.897 ^{abc} ± 16.237	244.286 ^d ± 20.402	384.017 ^f ± 52.901	607.540 ^h ± 45.755
150	91.132 ^a ± 16.402	144.447 ^c ± 10.467	245.606 ^d ± 23.567	332.684 ^e ± 26.405	520.607 ^g ± 52.182
200	93.672 ^{ab} ± 13.167	138.029 ^{bc} ± 20.505	228.590 ^d ± 20.262	350.942 ^{ef} ± 18.019	523.021 ^g ± 24.969
Peso orgánico					
50	57.644 ^a ± 7.972	69.103 ^{ab} ± 2.961	116.830 ^c ± 16.276	143.710 ^{de} ± 11.579	187.560 ^g ± 15.107
100	58.84 ^a ± 6.115	69.492 ^{ab} ± 10.169	134.800 ^{cd} ± 7.154	185.060 ^{fg} ± 22.838	241.550 ⁱ ± 13.657
150	61.854 ^a ± 6.362	89.525 ^b ± 6.898	142.820 ^{de} ± 13.740	162.470 ^{ef} ± 27.725	211.590 ^h ± 19.740
200	66.921 ^{ab} ± 11.301	89.460 ^b ± 14.167	136.640 ^{cd} ± 11.680	183.220 ^{fg} ± 11.902	221.920 ^{hi} ± 10.487

Tabla 4. Composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y desviación estándar de *Chaetoceros muelleri* en cultivos a diferentes concentraciones de inóculo ($\times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) y distintos niveles del medio de cultivo f. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

INOCULO	MEDIOS DE CULTIVO (Tratamientos)				
	f/2	f	2f	4f	8f
Proteínas					
50	24.347 ^a ± 4.184	29.751 ^{ab} ± 3.303	44.170 ^{cd} ± 6.739	55.023 ^f ± 5.375	75.217 ^{gh} ± 6.058
100	24.168 ^a ± 2.423	28.952 ^{ab} ± 6.211	49.208 ^{ef} ± 5.173	75.949 ^{gh} ± 9.807	93.522 ⁱ ± 8.115
150	24.410 ^a ± 4.553	36.118 ^{bc} ± 7.164	54.148 ^{def} ± 7.402	68.319 ^g ± 13.646	83.981 ^{hi} ± 8.219
200	24.713 ^a ± 7.649	35.388 ^{bc} ± 6.016	54.744 ^f ± 5.601	76.725 ^{gh} ± 5.373	88.334 ⁱ ± 4.343
Lípidos					
50	17.391 ^a ± 3.489	20.380 ^{ab} ± 3.927	29.506 ^b ^{cd} ± 7.608	42.330 ^e ± 9.599	56.339 ^{gh} ± 4.538
100	20.717 ^{ab} ± 4.649	23.356 ^{ab} ± 5.425	38.753 ^{de} ± 4.507	52.024 ^{fg} ± 11.785	70.050 ⁱ ± 6.078
150	20.506 ^{ab} ± 3.350	26.834 ^{ab} ± 3.205	43.210 ^{ef} ± 10.117	42.643 ^{ef} ± 8.645	62.903 ^{hi} ± 6.156
200	22.615 ^{ab} ± 4.189	28.410 ^{bc} ± 4.464	36.922 ^{cde} ± 6.451	42.725 ^{ef} ± 9.160	66.164 ⁱ ± 3.253
Carbohidratos					
50	14.667 ^a ± 1.954	20.179 ^{abc} ± 1.991	28.205 ^{def} ± 4.637	30.073 ^{ef} ± 7.616	46.416 ^{ij} ± 3.739
100	15.477 ^{ab} ± 2.229	19.713 ^{abc} ± 5.442	31.529 ^f ± 4.175	43.555 ^{hi} ± 8.907	57.713 ^k ± 5.008
150	15.257 ^{ab} ± 2.277	22.989 ^{cde} ± 3.480	40.811 ^{ghi} ± 8.273	35.100 ^{fg} ± 6.308	51.825 ^{jk} ± 5.072
200	16.042 ^{abc} ± 2.529	21.967 ^{bcd} ± 5.407	33.749 ^{fg} ± 2.781	38.689 ^{gh} ± 5.155	54.511 ^k ± 2.680

horas la densidad celular producida fue de 0.730 y 0.920×10^6 cel·mL⁻¹ para los mismos medios f/2 y f.

Las concentraciones obtenidas en este trabajo fueron semejantes o superiores a las halladas por López-Elías *et al.* (2008) a las 48 horas. En este caso se registraron valores de 0.782 y 1.413×10^6 cel·mL⁻¹ con los medios f/2 y f, respectivamente, y tamaño de inóculo de 200×10^3 cel·mL⁻¹. Aquí se tuvieron diferencias significativas en cuanto al medio de cultivo, efecto que se atribuye a las diferentes condiciones en que se desarrollaron los cultivos ya que las condiciones controladas (temperatura e iluminación) y los volúmenes más pequeños inciden en la obtención de concentraciones celulares mayores.

Se logró determinar también que el número de divisiones totales, al igual que la densidad celular, aumentó significativamente cuando se incrementó la concentración de nutrientes y por el contrario disminuyó conforme se incrementó la densidad del inóculo, resultados que coinciden con los encontrados por López-Elías *et al.* (2008) cuando inoculan a las 06:00. A la inversa de nuestros resultados, ellos obtienen la mayor tasa de división con el medio f/2 (1.24 div·día⁻¹) y en este trabajo fue de 2.58 div·día⁻¹ con el medio f, a las 24 horas. Los valores de la tasa de división acumulada son similares pero no comparables ya que ellos lo hallan a las 72 horas y en este trabajo a las 48. En estos factores siguen incidiendo las condiciones de cultivos que en este trabajo facilitaron que tuvieran una mayor μ y $\Sigma\mu$.

Lo anterior indica, que si se desea producir altas densidades de *Chaetoceros muelleri* en un sistema de cultivo bajo las mismas condiciones, no es recomendable utilizar altas densidades de inóculo inicial, debido a que las producciones obtenidas no son proporcionales al tamaño del inóculo. Por el contrario, conforme se incrementa la densidad del inóculo disminuye el número de divisiones celulares y por ende la densidad celular. Esto pudiera ser una consecuencia de la competencia por luz y espacio que se presenta entre las células cuando existen altas densidades, afectando con ello su tasa de división y por consiguiente la densidad celular producida.

La biomasa final en términos de peso seco es una de las características principales que debe tomar en cuenta el acuicultor a la hora de alimentar a los organismos en cultivo, debido a que representa la

cantidad de alimento realmente disponible y con su determinación se puede estimar la cantidad de microalgas necesaria que deberá ser suministrada en la dieta, de tal manera, que sea la más adecuada para garantizar el buen desarrollo y supervivencia de los mismos.

Se comprobó que aunque la biomasa de la especie estudiada, en términos de peso seco, no aumentó siempre de manera significativa conforme se incrementó la concentración de nutrientes, esta microalga tiende a aumentar de tamaño en altas concentraciones de nutrientes. Lo anterior se puede constatar con las densidades celulares y las biomásas mostradas para los diferentes tratamientos. En función del incremento de la densidad del inóculo inicial la tendencia fue muy fluctuante por lo que no es posible confirmar un aumento o una disminución del tamaño de las células, por lo que se determinó que el peso seco celular unitario es independiente de la densidad del inóculo inicial que se utilice.

En el trabajo de López-Elías *et al.* (2008) se obtienen resultados similares a los del presente trabajo cuando inoculan a las 06:00, con una evidente diferencia en los pesos secos de acuerdo al medio de cultivo, siendo significativo el tamaño del inóculo sólo para el medio f.

Por otra parte, en relación a la biomasa final en términos de peso orgánico, el cual expresa la cantidad total de energía disponible para los organismos, se determinó que existe una tendencia a aumentar conforme se incrementó la concentración de nutrientes del medio, y aunque los mejores resultados se obtuvieron con el medio 8f el aumento no corresponde de manera progresiva a la concentración de nutrientes. En función del incremento de la densidad del inóculo, solamente los tratamientos con medio f/2 y f presentaron una tendencia al aumento del peso orgánico, pero este no fue significativo, mientras que en el resto el peso seco y la sustancia orgánica se mantuvieron fluctuando. Por tal motivo, no podemos asegurar que a mayor densidad del inóculo, se incrementa significativamente la producción de biomasa.

Si llevamos nuestros datos a peso seco celular unitario, los valores obtenidos en este trabajo son, en muchos de los casos, superiores a los valores reportados por Cordero (1994), Sánchez (1994) y López-Elías *et al.* (2003), de acuerdo a los cuales el peso seco para esta especie puede variar 50 y 100 pg·cél⁻¹ y el orgánico entre 25 y 60 pg·cél⁻¹.

En el trabajo de Piña *et al.* (2007), que utilizan condiciones de cultivo similares a las referidas en el presente trabajo en cuanto a recipientes, iluminación, temperatura y salinidad, se encuentran concentraciones para esta especie, con medio f e inóculo de 100×10^3 cel.mL⁻¹, superiores a las encontradas aquí a las 48 horas. Lo mismo sucedió con la tasa de división acumulada que, aunque no parezca ser significativamente superior, ellos obtuvieron 4.028 div·día⁻¹ y aquí 3.775 div·día⁻¹. Con respecto al peso seco y orgánico si se encontraron diferencias muy marcadas ya que en ese trabajo obtuvieron 311.74 y 205.22 mg.L⁻¹, respectivamente; mientras en este trabajo se obtuvieron valores de 114.897 y 69.492. Consideramos que esto se debe a que la medida de estos parámetros fueron tomados en tiempos diferentes, en el primer caso a las 96 horas y en el nuestro a las 48. Por otra parte, en ese trabajo, donde el medio f es utilizado como patrón, se le adicionó doble cantidad de silicatos, nutriente que tuvo que haber incidido significativamente en que los valores hallados hayan estado por encima de los encontrados aquí.

En lo que se refiere a las características dietéticas de *C. muelleri* se demostró, mediante los análisis bioquímicos realizados, que el contenido proteico resultó el más alto, seguido por los lípidos y los carbohidratos, lo cual coincide con la mayor parte de la literatura. Se señala que en condiciones normales las diatomeas tienden a almacenar lípidos con preferencia a los carbohidratos, ya que estos compuestos facilitan la flotación y tienen un mayor contenido energético como reservas. Además, se sintetizan como una desviación de la ruta metabólica implicada en el ciclo de Krebs y la síntesis de proteínas (Sánchez-Saavedra, 1994), en lugar de integrarse en una ruta diversa, necesaria para que los productos fotosintéticos se almacenen como reserva energética en forma de carbohidratos.

Las microalgas representan una fuente proteínica con posibles aplicaciones en la nutrición humana y como complemento de piensos animales, debido básicamente a sus elevados contenidos proteicos, potenciados por el hecho de poseer un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteína unicelular (Abalde *et al.*, 1995).

Si comparamos los resultados obtenidos en este trabajo con los de Piña *et al.* (2007) vemos que los valores encontrados aquí con el medio f están por debajo de los obtenidos por dichos autores, para la

misma especie. Eso puede deberse a que en este trabajo la composición proximal se determinó a las 48 horas y en el mencionado, a los 4 días. En este caso, la fase de crecimiento influyó en la composición bioquímica de la microalga, aspecto este ampliamente comprobado por muchos autores. Sin embargo, si los datos los comparamos en función del peso de la célula los resultados son similares ya que ellos obtienen 24.97, 16.47 y 11.14 pg.cel⁻¹ de proteínas, lípidos y carbohidratos respectivamente, mientras que en este trabajo son de 21.10, 17.02 y 14.36 pg.cel⁻¹, respectivamente. Fidalgo (1995) prueba como *Chaetoceros calcitrans* alcanzó los valores más altos de proteínas con diferentes fuentes de nitrógeno al inicio de la fase estacionaria. En el presente trabajo, el efecto análogo causado por la edad del cultivo se logra con el aumento de la concentración de nutrientes ya que los valores alcanzados por Piña *et al.* (2007) aquí se obtienen a los 2 días con el medio 4f, para un tamaño de inóculo de 150×10^3 cel.mL⁻¹.

CONCLUSIONES

- El cultivo de *Chaetoceros muelleri* en cinco niveles del medio f de Guillard y cuatro densidades de inóculo, evidenció una tendencia al aumento de la densidad celular promedio conforme aumentan los niveles del medio, menos significativa con relación a los incrementos en la densidad del inóculo.
- El número total de divisiones celulares en *Chaetoceros muelleri* aumentó significativamente conforme se incrementaron los niveles del medio f y disminuyó aparejado al aumento en la densidad del inóculo.
- La densidad celular y el peso seco de *Chaetoceros muelleri* manifestaron una tendencia a ser independientes de la densidad del inóculo, no así de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. En cambio, el peso orgánico presentó una tendencia a ser independiente de ambos factores.
- A las 24 horas de cultivo, cualquier combinación de los medios f, 2f, 4f y 8f, con los inóculos de 100, 150 y 200 x 10³ cél·mL⁻¹, es adecuada para escalar a mayores volúmenes sin necesidad de agregar nutrientes, reduciendo de esta manera la rutina de producción de *Chaetoceros muelleri*.
- El contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en la biomasa de *Chaetoceros*

muelleri aumentó en la medida que se incrementaron las concentraciones de los nutrientes y el tamaño del inóculo; los mayores valores se obtuvieron con el medio 8f y los inóculos de 100 y 200 x 10³ cel·mL⁻¹.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial por los apoyos económicos de una beca tesis para un estudiante de licenciatura y para la adquisición de los materiales diversos y consumibles, que fueron proporcionados a través de los proyectos PROFAPI-06-155-2006 del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación y del Cuerpo Académico "Ecofisiología y Cultivo de Organismos Acuáticos" (UAS-CA-162) del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

REFERENCIAS

- Abalde, J., A. Cid, J.P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero (1995): *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. España, La Coruña, Servicio de Publicaciones, 210 pp.
- Apt, K.E. and P.W. Behrens (1999): Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology* 35: 215-226.
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- Box, G.E.P., W.G. Hunter and J.S. Hunter (1978): *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. Ed. John Wiley & Sons., New York, 653 pp.
- Conover, W.J. (1980): *Practical nonparametric statistics*. 2^a ed., John Wiley & Sons, New Cork, 493 pp.
- Cordero Esquivel, B. (1994): Evaluación de diferentes métodos de preservación de dietas de microalgas y su efecto sobre el crecimiento de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. México, Baja California, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, *Tesis Doctoral*, 104 pp.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers andy F. Smith (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
- Farias-Molina, A. (2001): *Nutrición de moluscos pectínidos*. En: Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura (A.N. Maeda-Martínez, *ed.*), Cap. 5, pp: 89-104.
- Fidalgo, J.P. (1995): Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. España, La Coruña, Resumos de Teses de Doutoramento, 20 pp. (disponible en Internet <http://www.google.com>).
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther (1962): Studies of marine planktonic diatoms, I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian J. Microbiol.* 8: 229-325.
- López Elias, J.A., D. Voltolina, C.O. Chavira Ortega, B.B. Rodríguez Rodríguez, L.M. Sáenz Gaxiola, B. Cordero Esquivel y M. Nieves (2003): Mass production of microalgae in six commercial hatcheries of the Mexican northwest. *Aquacultural Engineering*. 29: 155-164.
- López-Eliás, J.A. I. Cortés-González, M. Nieves-Soto, F. Enríquez-Ocaña, P. Piña-Valdés, D. Voltolina y N.M. Pablos-Mitre (2005): Seguimiento de cultivos masivos de microalgas en siete laboratorios productores de larvas de camarón. *Biotecnia* 7(3):36-43.
- López-Eliás, J.A., Enríquez-Ocaña, M.N. Pablos-Mitre, N. Huerta-Aldaz, S. Leal, A. Miranda-Baeza, M. Nieves-Soto and I. Vásquez-Salgado (2008): Growth and biomasa production of *Chaetoceros muelleri* in mass outdoor cultures: effect of the tour of the inoculation, size of the inoculum and cultura médium. *Rev. Invest. Mar.* 29 (en prensa).
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Nieves, M., D. Voltolina and A. Barreras (1998): A new parameter for comparison of microalgae growth. *Riv. Ital. Acquacolt.* 33:177-184.
- Pande, S.V., R.P. Khan and T.A. Venkatasubramanian (1963): Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Analytical Biochemistry*. 6: 415-423.

- Piña, P., M.A. Medina, M. Nieves, S. Leal, J.A. López-Eliás y M.A. Guerrero (2007): Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Rev. Invest. Mar.* 28(3):225-236.
- Sánchez-Saavedra, M.P. (1994): Efecto de la luz sobre el crecimiento, la composición bioquímica y el valor alimenticio de *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae). México, Baja California, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 90 pp.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran (1980): Statistical methods. (7^a ed.) Iowa State University Press, Ames. 507 pp.
- Sokal, R. and F. Rohlf (2000): Biometry. 3^a Ed. Freeman. San Francisco. 880 pp.
- Sorokin, C. (1973): Dry weight, packed cell volume and optical density. In: *Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measurement* (J. Stein, ed.), Cambridge University Press, pp: 321-343.
- Voltolina, D. y J.A. López-Eliás (2002): *Cultivos de apoyo para la acuicultura: Tendencias e innovaciones*. En: Camaronicultura. Avances y tendencias (L.R. Martínez- Córdova, ed.) México, AGT Editor S.A., pp:23-41.
- Whyte, J.N.C. (1987): Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231-241.
- Wilson, K.V. (1956): A distribution-free test of analysis of variance hypothesis. *Psychol. Bull.* 53:96-101.
- Zar, J.H. (1999): Biostatistical analysis. 4^a ed. Prentice-Hall. New Jersey, 663 pp.

Aceptado: 20 de marzo del 2009