

## CULTIVO DE CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS CON DIFERENTES FERTILIZANTES UTILIZADOS EN ACUICULTURA.

Pablo Piña <sup>1</sup> \*, M. Alejandra Medina <sup>1</sup>, Mario Nieves <sup>1</sup>, Sylvia Leal <sup>2</sup>, José Antonio López-Elías <sup>3</sup> y Martín A. Guerrero <sup>1</sup>

(1) Laboratorio de Ecofisiología y Cultivo de Organismos Acuáticos, Facultad de Ciencias de Mar, Universidad de Sinaloa, Paseo Claussen s/n, CP 82000, Mazatlán, Sinaloa, México.

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

(3) Dpto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), Rosales y Niños Héros s/n, Col. Centro, Hermosillo, Sonora, México.

(\*) Autor correspondiente: Email: [papiva@mzt.megared.net.mx](mailto:papiva@mzt.megared.net.mx)

### RESUMEN

El Nutrilake y la urea se utilizaron como aporte de nitratos, en cultivos de cuatro especies de microalgas (*Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii*, *Isochrysis* sp y *Tetraselmis suecica*), determinando su efecto y comparándolo con el obtenido usando el medio f. Los cultivos se repitieron tres veces utilizando cuatro réplicas por tratamiento y por especie. En cada experimento se determinó la concentración celular diaria por conteo directo al microscopio, las tasas de división acumulada y estandarizada, los pesos secos total y orgánico y la composición proximal de las microalgas. *C. muelleri* ofrece las mayores concentraciones celulares con urea y *T. weissflogii* con Nutrilake. Las tasas de división celular acumulada y estandarizada fueron mayores al final de los cuatro días en *C. muelleri* con urea y Nutrilake, en *T. weissflogii* con el medio f, en *T. suecica* con urea al tercer día y en *Isochrysis* sp. sólo con la tasa estandarizada al segundo día con Nutrilake. *C. muelleri* con urea e *Isochrysis* sp. con Nutrilake mostraron los mayores valores de biomasa seca total. El peso libre de cenizas para *C. muelleri* fue mayor con urea, para *T. weissflogii* lo fue con Nutrilake y con el medio f y urea para *T. suecica*. Los pesos unitarios solo fueron diferentes en *T. suecica* entre el Nutrilake y urea. La urea produce la mayor concentración proteica en *T. weissflogii*, *Isochrysis* sp. y *T. suecica*, ésta última también con el medio f. Para los carbohidratos *T. weissflogii* dio significativamente más alto con Nutrilake y el medio f. Los lípidos resultaron ser mayores para *T. weissflogii* y *T. suecica* con urea, y para esta última especie también con el medio f.

Palabras clave: microalgas; medios de cultivo; *Chaetoceros muelleri*; *Thalassiosira weissflogii*; *Isochrysis* sp.; *Tetraselmis suecica*

### ABSTRACT

Nutrilake and Urea were proven like sources of nitrates, in cultivations of four microalgae species (*Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii*, *Isochrysis* sp. and *Tetraselmis suecica*), determining their effect and they were compared with the medium f. The cultivations repeated three times using four replicas for treatment and for species. In each experiment the daily cellular concentration was determined by direct count to the microscope, the rates of accumulated division and standardized, the total and organic dry pesos and the composition proximal of the microalgae. *C. muelleri* offers the biggest cellular concentrations with urea and *T. weissflogii* with Nutrilake. The rates of accumulated cellular division and standardized they went bigger at the end of the four days in *C. muelleri* with urea and Nutrilake, in *T. weissflogii* with the means f, in *T. suecica* with urea to the third day and in *Isochrysis* sp. only with the rate standardized to the second day with Nutrilake. *C. muelleri* with urea and *Isochrysis* sp. with Nutrilake they showed the biggest values of total dry biomass. The weight free of ashes for *C. muelleri* was bigger with urea, for *T. weissflogii* it was it with Nutrilake and with the means f and urea for *T. suecica*. The alone unitary pesos were different in *T. suecica* between the Nutrilake and urea. The urea produces the biggest concentration proteica in *T. weissflogii*, *Isochrysis* sp. and *T. suecica*, this last also with the means f. For the carbohydrates *T. weissflogii* gave significantly higher with Nutrilake and the means f. The lipids turned out to be bigger for *T. weissflogii* and *T. suecica* with urea, and for this last species also with the medium f.

Key words: microalgae; culture media; *Chaetoceros muelleri*; *Thalassiosira weissflogii*; *Isochrysis* sp.; *Tetraselmis suecica*

La producción de microalgas de buena calidad en grandes cantidades para alimentar diferentes organismos de importancia en la acuicultura, ha traído como consecuencia la aplicación de diferentes métodos para su cultivo así como diversas técnicas que disminuyan el costo de

producción masiva de las mismas (Nieves *et al.*, 1996; Voltolina *et al.*, 1999).

Alfonso *et al.* (1993) recomiendan para los géneros *Chaetoceros* y *Tetraselmis* el medio A-M (Alfonso y Martínez, 1988), que sin ser tan completo como el

Walne (1970) y el Guillard f (Guillard, 1975) ofrece buenos resultados en el crecimiento y en la calidad celular y es además de menor costo que los anteriores.

Actualmente, hay un grupo en España que se ha dedicado a obtener medios de cultivo optimizados y así consiguieron un medio en el que la carga bacteriana era menor y además producía 100 g de biomasa por cada 100 g de medio de cultivo y otro donde además de eliminar el crecimiento de las bacterias no será necesaria la aireación y no producirá modificaciones al pH (Fábregas, 2005).

El medio de cultivo f de Guillard y el f/2 que reduce a la mitad las proporciones del original, son los más ampliamente usados para el cultivo de microalgas ya que contiene todos los elementos necesarios para el crecimiento de estos microorganismos, aunque existen otras formulaciones para condiciones de laboratorio como describe Vonshak (1986). Estos medios utilizan reactivos de grado analítico, lo cual encarece su uso cuando se quieren obtener cultivos masivos de especies utilizadas a escala comercial, por lo que se ha hecho habitual y necesario utilizar fertilizantes agrícolas a esos volúmenes (González-Rodríguez y Maestrini, 1984; Simental-Trinidad *et al.*, 2001)

La utilización de fertilizantes agrícolas se ha considerado como una alternativa económica para reducir los altos costos en la producción de microalgas en laboratorios comerciales, sin embargo, para volúmenes iniciales, hasta 15 ó 20 litros, es recomendable utilizar el medio F antes mencionado, con el fin de obtener una microalga de buena calidad, ya que el uso de medios simplificados (basados en compuestos no tradicionales) y de menor costo, puede afectar el crecimiento y por consiguiente la composición de las microalgas en lo que se refiere a su contenido de las varias fracciones orgánicas (Peraza-Díaz, 1997).

Diversos investigadores han demostrado que el fitoplancton producido con fertilizantes agrícolas es adecuado para la alimentación de larvas. Algunos resultados indican que fertilizantes como la urea y el sulfato de amonio pueden ser buenos sustitutos en laboratorios de producción y que con su uso se reducen notablemente los costos económicos de producción con respecto al medio Guillard f/2, que es el medio más utilizado en estos laboratorios y cuyo costo varía, según el

grado de los productos químicos que se emplean (Iriarte y Buitrago, 1992; López-Elías y Voltolina, 1993).

Varios autores han señalado que el uso de algunos fertilizantes comerciales para la agricultura, como aporte de nutrientes en el cultivo de microalgas marinas, ha dado buenos resultados en la obtención de densidades óptimas para suministrar en la larvicultura de los camarones, así como un alto contenido proteínico y la disminución en los costos para su producción (Martínez-Córdova, 1993; Nieves y Vega, 1994; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999). En investigaciones realizadas con microalgas marinas bentónicas se ha encontrado que con el uso de fertilizantes agrícolas se tiene crecimientos, biomasa y composición química igual que con un medio completo (f/2) y a un costo de producción más bajo (Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Simental y Sánchez-Saaverda, 2003).

Nutrilake es el primer y único fertilizante desarrollado en forma exclusiva para la industria acuícola, que se fabrica a base de nitrato natural obtenido de yacimientos en Atacama, Chile y está compuesto de nitrógeno nítrico natural, silicato de sodio 100% soluble y elementos traza necesarios para la producción de microalgas. Sus acciones como fertilizante inciden fundamentalmente en: la asimilación inmediata del nitrógeno 100% nítrico, favorece el crecimiento de las microalgas, del camarón y de otras especies por su contenido de microelementos esenciales y responde a las 24 horas de su aplicación como productor de alimento natural en los estanques para camarones y otras especies. Se usa para favorecer el crecimiento de algas bentónicas en estanques de cultivo y hay trabajos muy recientes que refieren su aplicación en cultivos masivos, hasta 10 m<sup>3</sup>, para *C. muelleri* y *Tetraselmis tetrathele* (Torres *et al.*, 2005) y como sustituto del NaNO<sub>3</sub> en cultivos de *C. muelleri* y *Thalassiosira weissflogii* en ambientes controlados (Leal *et al.*, 2007).

Este trabajo tiene como objetivo probar el Nutrilake y la urea como aporte de nitratos, en cultivos de cuatro especies de microalgas ampliamente utilizadas en acuicultura (*C. muelleri*, *T. weissflogii*, *Isochrysis* sp. y *Tetraselmis suecica*), determinando su efecto a través de la concentración celular, la tasa de división acumulada y estandarizada, la obtención de biomasa y el contenido orgánico de cada especie. Además se compararán con el medio F,

tradicionalmente usado para volúmenes de hasta 20 litros.

## MATERIALES Y METODOS

Las cuatro especies de microalgas que se utilizaron para este trabajo fueron las diatomeas *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii*, y las flageladas *Isochrysis* sp. y *Tetraselmis suecica*, con claves CH-M-1, TH-W-1, IS-X-1 y TE-S-1, respectivamente, obtenidas de la Colección de Microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., México, y se mantienen con la misma clave en el cepario del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo para la Acuicultura, en la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

Las microalgas se cultivaron con tres medios de cultivos, el medio f de Guillard (1975) con el doble de la concentración de metasilicatos para el caso de las diatomeas y que sirvió como control, los fertilizantes Nutrilake Std (cuya composición química es: 15% de nitrógeno en forma de nitratos, 3.5% de silicatos, 0.03% de boro y 25% de sodio) y urea, éstos tomados como sustitutos del nitrato de amonio. Las concentraciones del nitrógeno fueron equivalentes en los tres medios de cultivo, tomando en cuenta para su ajuste las relaciones iónicas. Sin embargo, los componentes de estos fertilizantes fueron considerados para hacer el complemento de los demás constituyentes del medio f.

Para preparar el medio de cultivo se utilizó agua de mar filtrada por cartuchos dispuestos en serie, con capacidad de retención de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ , más dos filtros de carbón activado para eliminar la materia orgánica. El agua se desinfectó con hipoclorito de sodio comercial (5%) a razón de 1  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de agua de mar, la que después de 24 horas o hasta el momento de su uso se eliminaron los residuos de cloro con tiosulfato de sodio (0.056  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y aireación profusa.

Para los cultivos la salinidad del agua se ajustó a 35 ups, la temperatura se mantuvo en 25°C y la iluminación fue constante proveniente de 6 lámparas fluorescentes de luz blanca fría colocadas horizontalmente las cuales proporcionaron un flujo de fotones de aproximadamente 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en estantes preparados para este tipo de actividad. Con

anticipación se prepararon y se aclimataron los cultivos que sirvieron de inóculos en los experimentos.

Las muestras para pH se tomaron cada 24 horas y se midieron utilizando un potenciómetro marca Corning. La concentración celular se calculó obteniendo muestras diarias de cada uno de los recipientes de 3 litros que sirvieron como unidades experimentales, las que se fijaron con lugol y posteriormente se procedió a contarlas en un microscopio compuesto y con un hematocitómetro equipado con cuadrulado de Neubauer. Cada experimento se cerró al cuarto día teniendo en cuenta que la fase exponencial de estas especies están entre los días dos y tres, lo que se pudo comprobar con la tasa de división celular acumulada.

La tasa de división celular de cada una de las repeticiones en los diferentes tratamientos se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Nieves *et al.*, 1998):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{C_{t+1}}{C_t}\right)}{\ln 2}$$

donde:

$C_{t+1}$  = Concentración celular al tiempo t+1

$C_t$  = Concentración celular al tiempo t.

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  $\mu$ . 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 tasa de división acumulada estandarizada se obtiene con el cociente de la tasa de división acumulada del tratamiento y la tasa de división acumulada promedio del control (medio f). Su interpretación más directa es que los valores que no son diferentes de uno significan que no se encontraron diferencias entre tratamientos y control, mientras que si se desvían significativamente de este valor significan efectos positivos (>1) o negativos (<1) del tratamiento aplicado (Nieves *et al.*, 1998).

El peso seco total se determinó mediante la filtración de muestras, de volúmenes y concentra-

ciones celulares conocidos, en discos de fibra de vidrio Whatman GF-C de 47 mm de diámetro prelavados con agua destilada y calibrados en una balanza analítica marca Denver Instruments con precisión de 0.01 mg, las muestras se lavaron con formiato de amonio al 4% para eliminar las sales y se secaron a 60°C y luego fueron llevadas a peso constante. Después fueron calcinados a 450°C y el peso orgánico se estimó por diferencia del peso seco total y el de cenizas.

Para la composición proximal se usaron filtros del mismo tipo de 25 mm de diámetro prelavados. Las proteínas se determinaron con el método de Lowry *et al.* (1951), previa extracción con hidróxido de sodio 0.1 N. Los carbohidratos se extrajeron con ácido sulfúrico 1 M sugerido por Whyte (1987) y cuantificados según Dubois *et al.* (1956), la extracción de los lípidos se llevó a cabo con una mezcla cloroformo:metanol:agua (Bligh y Dyer, 1959), para proceder a analizarlos con el método de Pande *et al.* (1963). Los estándares usados en las curvas de calibración fueron albúmina de bovino, glucosa anhidra y tripalmitina para proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente.

#### Diseño experimental y análisis de datos.

Se realizaron tres experimentos, con tres tratamientos (el medio f (MF), Nutrilake (NL) y urea (UR) para cada microalga) y cada uno constó de cuatro repeticiones por tratamiento para un total de 48 unidades experimentales. Cada ensayo duró cuatro días y al final de cada uno de ellos se cosecharon y se mezclaron las repeticiones de cada tratamiento, en cada especie, con el fin de tomar las muestras para la determinación de la cantidad de biomasa en términos de peso seco total y orgánico y de su composición proximal. Estas mezclas también se contaron y sirvieron de inóculo para el montaje del experimento siguiente.

Cada unidad experimental constó de 3 litros de volumen útil para cultivo y fueron distribuidas de manera aleatoria. Los inóculos en los tratamientos se ajustaron a las siguientes densidades celulares de acuerdo al tamaño de las células:  $100 \times 10^3$  cel·mL<sup>-1</sup> para las especies de *C. muelleri* e *Isochrysis* sp. y para *T. suecica* y *T. weissflogii* a  $50$  y  $25 \times 10^3$  cel·mL<sup>-1</sup> respectivamente.

El análisis estadístico partió de comprobar la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos con las pruebas de Bartlett y de Lilliefors,

respectivamente. Si los datos eran normales y homoscedásticos, para un nivel de significación de 0.05, se procedió a comparar las medias con ANOVA paramétrico, en caso contrario se aplicó la prueba de Kruskal Wallis con el mismo nivel de significación. Cuando el ANOVA produjo diferencias significativas se aplicaba la prueba de comparaciones múltiples correspondiente (Zar, 1999). Los datos fueron procesados con el paquete de programas SigmaStat, versión 2.0 (1997).

#### RESULTADOS

Los valores de pH se mantuvieron entre 7.5 y 9.5 para estos cultivos, con valores promedio que iban aumentando en la medida que transcurrían los días. Para *C. muelleri* fue entre  $8.2133 \pm 0.08$  y  $9.7267 \pm 0.34$ ; para *T. weissflogii* entre  $8.2033 \pm 0.30$  y  $9.3500 \pm 0.14$ ; para *Isochrysis* sp. entre  $7.6200 \pm 0.15$  y  $9.4300 \pm 0.14$  y para *T. suecica* entre  $7.7500 \pm 0.07$  y  $9.4775 \pm 0.11$ . Estos valores se consideran adecuados, coincidiendo con lo planteado por Treece y Yates (1988) y Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) para *C. muelleri*.

La concentración celular al 4to día de cultivo presentó diferencias significativas en el caso de las diatomeas (Tabla 1). *C. muelleri* ofrece las concentraciones mayores con los fertilizantes comerciales, específicamente la urea ( $3.3981 \pm 0.75 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>), mientras que *T. weissflogii* obtiene la mayor con Nutrilake ( $0.2934 \pm 0.03 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>). Para *Isochrysis* sp. y *T. suecica* no hubo diferencias entre los tratamientos utilizados.

En general, las especies de *C. muelleri* y las dos flageladas exhibieron en los cultivos una tendencia a seguir creciendo aún al cuarto día (Fig. 1); pero en el caso de *T. weissflogii* su máximo crecimiento fue al segundo día (experimentos 1 y 3) o al tercer día (experimento 2).

Las tasas de división celular acumulada y estandarizada se muestran en las Tablas 2 y 3. Puede observarse que para *C. muelleri* y *T. weissflogii* no hubo diferencias ni para el segundo ni tercer día de cultivo, sin embargo al cuarto día para *C. muelleri* los valores mayores se hallaron con los fertilizantes urea y Nutrilake que fueron diferentes al medio F; pero *T. weissflogii* mostró diferencias del medio f con respecto a los otros fertilizantes en las divisiones acumuladas. En las divisiones estandarizadas las diferencias fueron con Nutrilake.

Tabla 1. Valores promedios y desviación estándar de la concentración celular ( $\times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>) de *C. muelleri*, *T. weissflogii*, *Isochrysis* sp. y *T. suecica* cultivadas con el Medio F (MF), Nutrilake (NL) y Urea (UR) al 4to día de cultivo. El asterisco indica que los resultados fueron comparados mediante pruebas no paramétricas. Letras iguales representan que no hay diferencias significativas.

TRATAMIENTOS	ESPECIES			
	<i>C. muelleri</i>	<i>T. weissflogii</i>	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>T. suecica</i>
MF	2.7143 a ± 0.7151	0.2663 a ± 0.0264	*4.2568 a ± 1.9187	1.7473 a ± 0.4818
NL	3.2454 ab ± 0.3518	0.2934 ab ± 0.0320	*4.8538 a ± 1.2057	1.5761 a ± 0.2757
UR	3.3981 b ± 0.7581	0.2665 a ± 0.0287	*4.6724 a ± 1.7092	1.8040 a ± 0.4002

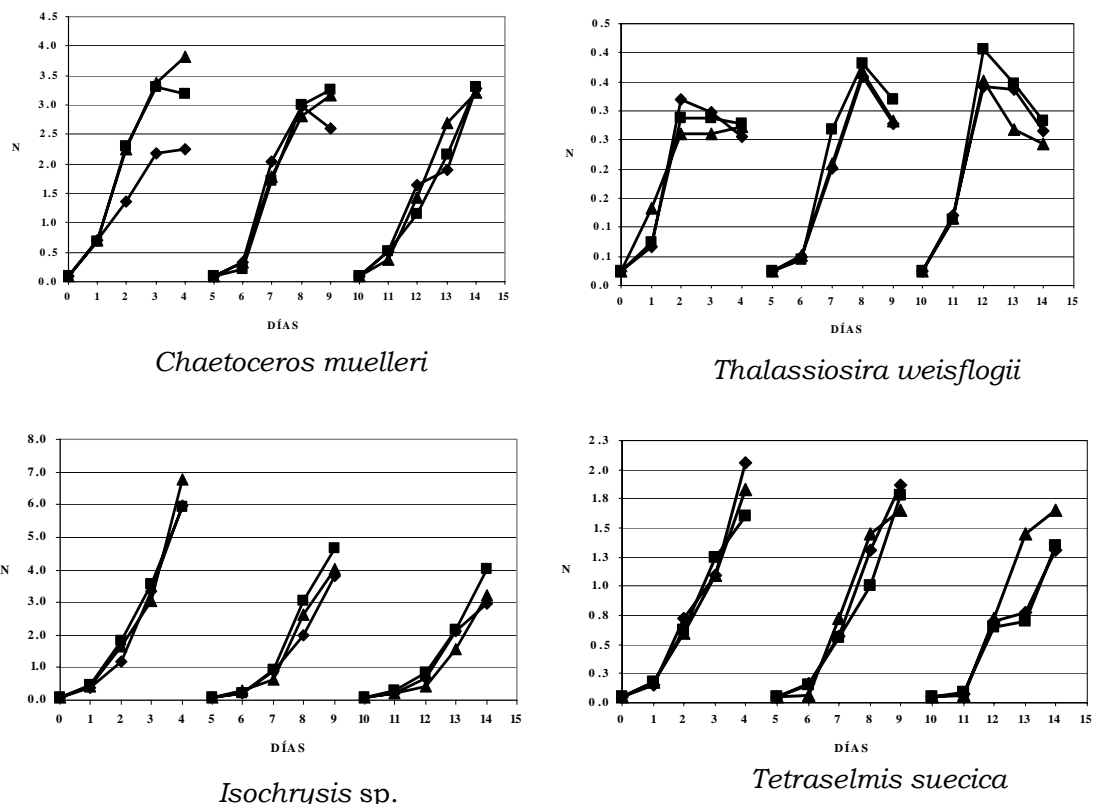


Fig. 1. Concentraciones celulares alcanzadas para cada día de cultivo, en cada una de las especies. N: No. de células  $\times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> ▲ Nutrilake, ■ Urea, ◆ medio F.

Para *Isochrysis* sp. no hubo diferencias significativas entre los tratamientos empleados, a excepción del segundo día de la división estandarizada que con Nutrilake fue superior a urea y el medio f. En *T. suecica* la diferencia estuvo dada al tercer día donde el tratamiento con urea difirió del de Nutrilake, aunque no del medio f.

En términos de obtención de biomasa (Tabla 4), el contenido del peso seco (PS) no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos para *T. weissflogii* y *T. suecica*. En *C. muelleri* se obtuvieron los mayores valores con los fertilizantes comerciales urea ( $371.77 \pm 47.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y Nutrilake ( $355.31 \pm 68.86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) aunque este último no difirió significativamente del tratamiento

Tabla 2. Valores promedios y desviación estándar de la división celular acumulada de las especies cultivadas con el Medio F (MF), Nutrilake (NL) y Urea (UR). El asterisco indica que los resultados fueron comparados mediante pruebas no paramétricas. Letras iguales representan que no hay diferencias significativas. Letras iguales representan que no hay diferencias significativas.

	Día	MF	NL	UR
<b><i>Chaetoceros muelleri</i></b>	2	4.0278 a ± 0.3549	4.0198 a ± 0.5257	4.1249 a ± 0.4743
	3	4.5142 a ± .3682	4.7751 a ± 0.3778	4.8570 a ± 0.3543
	4	4.7226 a ± 0.3452	5.0129 b ± 0.1516	5.0527 b ± 0.3306
<b><i>Thalassiosira weissflogii</i></b>	2	3.4712 a ± 0.4080	3.6443 a ± 0.3374	3.4196 a ± 0.3430
	3	3.7129 a ± 0.2308	3.7379 a ± 0.2598	3.5398 a ± 0.3492
	4	*5.2724 b ± 0.6834	*3.5454 a ± 0.1546	*3.4060 a ± 0.1586
<b><i>Isochrysis sp.</i></b>	2	3.1346 a ± 0.4063	3.4752 a ± 0.5794	2.8998 a ± 0.9303
	3	4.5586 a ± 0.4855	4.7866 a ± 0.5135	4.5049 a ± 0.5199
	4	5.2724 a ± 0.6834	5.5678 a ± 0.3080	5.4627 a ± 0.5052
<b><i>Tetraselmis suecica</i></b>	2	3.7102 a ± 0.3139	3.5709 a ± 0.3378	3.7368 a ± 0.3217
	3	*4.3370 ab ± 0.4807	*4.2037 a ± 0.5949	*4.7482 b ± 0.2698
	4	*5.0425 a ± 0.5986	*4.9619 a ± 0.2625	*5.1345 a ± 0.3649

empleando el medio f. *Isochrysis sp.* obtuvo el mayor peso seco en el tratamiento con Nutrilake ( $247.59 \pm 27.40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) difiriendo significativamente del resto de los tratamientos.

Con respecto al peso orgánico (PO) solamente *Isochrysis sp.* fue la que obtuvo valores sin diferencias entre los tratamientos. *C. muelleri* y *T. suecica* arrojaron los mayores valores con el empleo de la urea ( $245.80 \pm 29.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $157.85 \pm 5.69 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente) aunque en el caso de la primera no difirió significativamente del tratamiento con Nutrilake y en la segunda con el del medio f. Para *T. weissflogii* el mayor contenido de peso orgánico se obtuvo con Nutrilake ( $147.70 \pm 10.34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) aunque sin diferencias significativas con el medio f.

La relación PO:PS (Tabla 4) nos indica que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en el caso de *C. muelleri* e *Isochrysis sp.* Para *T. weissflogii* el mayor porcentaje fue con Nutrilake ( $67.14 \pm 2.24$ ) que difirió del resto. *T. suecica*

obtuvo sus mayores valores porcentuales con el medio F y la urea ( $75.09 \pm 1.91$  y  $74.41 \pm 1.59$  respectivamente) que difirieron significativamente del tratamiento con Nutrilake.

Los pesos seco y orgánico unitarios (PSU y POU) no arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos para las especies *C. muelleri*, *T. weissflogii* e *Isochrysis sp.* *T. suecica* mostró un comportamiento similar en ambos parámetros obteniendo los mayores valores con urea, sin diferencias significativas con el medio F aunque si con Nutrilake.

Con relación al contenido de los compuestos orgánicos podemos observar en la [Tabla 5](#) que el contenido proteico, de carbohidratos y de lípidos no varió significativamente para el caso de *C. muelleri*, sin embargo, en el caso de las proteínas si hubo diferencias para las otras tres microalgas ensayadas. En *T. weissflogii* la mayor cantidad de

Tabla 3. Valores promedios y desviación estándar de la división celular estandarizada de las diferentes especies, cultivadas con el Medio F (MF), Nutrilake (NL) y Urea (UR). Letras iguales representan que no hay diferencias significativas.

ESPECIE	Día	MF	NL	UR
<b><i>Chaetoceros muelleri</i></b>	2	1.0000 a ± 0.0626	1.0044 a ± 0.1677	1.0300 a ± 0.1535
	3	1.0000 a ± 0.0515	1.0595 a ± 0.0811	1.0797 a ± 0.1023
	4	1.0000 a ± 0.0541	1.0636 b ± 0.0569	1.0734 b ± 0.1016
<b><i>Thalassiosira weissflogii</i></b>	2	1.0000 a ± 0.0584	1.0551 a ± 0.0966	0.9872 a ± 0.0590
	3	1.0000 a ± 0.0538	1.0063 a ± 0.0536	0.9527 a ± 0.0803
	4	1.0000 a ± 0.0383	1.0406 b ± 0.0395	0.9999 a ± 0.0459
<b><i>Isochrysis sp.</i></b>	2	1.0000 a ± 0.0708	1.1058 b ± 0.1069	0.9078 a ± 0.2029
	3	1.0000 a ± 0.0740	1.0530 a ± 0.1130	0.9899 a ± 0.1057
	4	1.0000 a ± 0.1016	1.0595 a ± 0.0589	1.0360 a ± 0.0385
<b><i>Tetraselmis suecica</i></b>	2	1.0000 a ± 0.0719	0.9634 a ± 0.0902	1.0103 a ± 0.1108
	3	1.0000 ab ± 0.0805	0.9693 a ± 0.1213	1.1016 b ± 0.1128
	4	1.0000 a ± 0.1028	0.9859 a ± 0.0603	1.0225 a ± 0.0940

este compuesto se obtuvo con la urea ( $279.75 \pm 48.99 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) al igual que para *Isochrysis sp.* ( $8.43 \pm 0.82 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ). *T. suecica* también ofreció su mayor contenido proteico con la urea ( $74.67 \pm 11.33 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) pero ésta no difirió del medio f de Guillard.

Para los carbohidratos, la única especie de microalga que mostró diferencias entre los tratamientos fue *T. weissflogii* con valores más altos para Nutrilake y el medio f ( $142.57 \pm 6.20 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$  y  $127.15 \pm 43.24 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ , respectivamente), el resto de las especies produjo cantidades iguales independiente-mente del tipo de tratamiento. Los lípidos, al igual que en *C. muelleri*, no variaron significativamente para *Isochrysis sp.* resultando ser mayores para *T. weissflogii* ( $137.24 \pm 16.17 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) y *T. suecica* ( $25.95 \pm 4.31 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) con urea, que no difirieron del tratamiento con el medio f.

## DISCUSION

El uso de fertilizantes como alternativa para el cultivo de microalgas es ampliamente usado,

experimentándose, fundamentalmente, los utilizados para la agricultura. El uso de Nutrilake es un tema nuevo por lo que sólo hay referencias al mismo en dos trabajos donde se experimenta con *C. muelleri*, *T. tetrathele* y *T. weissflogii* (Torres *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2007). Estos trabajos proponen el uso del Nutrilake a una concentración de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para *C. muelleri* y *T. weissflogii* y  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para el flagelado *T. tetrathele*, sugiriendo que en el caso de las diatomeas hay que suministrar silicatos, adicionalmente, debido a que la cantidad que aporta el Nutrilake no es suficiente para los requerimientos de estas algas.

Torres *et al.* (2005), cuando probaron diferentes concentraciones de Nutrilake ( $200$ ,  $300$  y  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , incorporando adicionalmente metasilicato de sodio, para cultivos de *C. muelleri* en 3 litros, encontraron concentraciones de  $5\ 900 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  cuando fertilizaron con  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , que no diferían de las otras concentraciones probadas del producto y si de la fertilización con urea tomada como control. Estas concentraciones estuvieron por encima de las encontradas en el presente

Tabla 4. Contenidos de peso seco (PS), peso orgánico (PO), relación PO:PS (%), peso seco unitario (PSU) y peso orgánico unitario (POU) de las diferentes microalgas en cada uno de los tratamientos de fertilización: medio F (MF), Nutrilake (NL) y Urea (UR). El asterisco indica que los resultados fueron comparados mediante pruebas no paramétricas. Letras iguales representan que no hay diferencias significativas.

		<i>C. muelleri</i>	<i>T. weissflogii</i>	<i>Isochrysis sp.</i>	<i>T. suecica</i>
<b>PS</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	<b>MF</b>	311.74 a ± 30.63	225.15 a ± 6.96	*225.03 a ±42.65	*203.17 a ±17.06
	<b>NL</b>	355.31 ab ± 68.86	217.52 a ± 21.25	*247.59 b ±27.40	*192.09 a ±17.20
	<b>UR</b>	371.77 b ± 47.80	215.03 a ± 15.38	*223.06 a ±31.38	*208.12 a ±3.65
<b>PO</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	<b>MF</b>	*205.22 a ±19.89	143.63 ab ±3.25	140.09 a ±25.54	152.61 b ±13.87
	<b>NL</b>	*231.35 ab ± 43.83	147.70 b ± 10.34	155.03 a ± 6.93	126.61 a ± 39.15
	<b>UR</b>	*245.80 b ± 29.08	137.67 a ± 8.23	143.29 a ± 22.31	157.85 b ± 5.69
<b>PO:PS<sup>-1</sup></b> (%)	<b>MF</b>	65.88 a ± 2.47	64.07 a ± 1.07	62.43 a ± 4.95	*75.09 b ± 1.91
	<b>NL</b>	65.24 a ± 2.84	67.14 b ± 2.24	62.68 a ± 2.60	*70.17 a ± 3.09
	<b>UR</b>	66.23 a ± 2.10	64.15 a ± 3.45	64.27 a ± 5.37	*74.41 b ± 1.59
<b>PSU</b> ( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ )	<b>MF</b>	*103.54 a ± 40.36	791.50 a ± 103.58	33.22 a ± 3.01	*112.11 ab ± 23.70
	<b>NL</b>	*98.76 a ± 28.65	778.11 a ± 79.64	34.45 a ±5.35	*104.90 a ± 9.97
	<b>UR</b>	*99.76 a ± 21.41	862.58 a ± 94.35	35.17 a ± 1.73	*124.14 b ± 9.50
<b>POU</b> ( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ )	<b>MF</b>	*68.17 a ± 26.54	559.92 a ± 80.15	20.72 a ± 2.23	84.13 ab ± 17.89
	<b>NL</b>	*64.32 a ± 18.54	527.00 a ± 37.22	21.64 a ± 3.79	68.15 a ± 21.32
	<b>UR</b>	*66.10 a ±14.36	552.36 a ± 55.75	22.53 a ± 1.02	84.82 b ± 13.10

trabajo que pueden deberse a que el tamaño de inóculo empleado en nuestro caso fue menor que el utilizado por los autores citados.

Por otra parte Leal *et al.* (2007) encontraron para *T. tetrahele*, cultivada a la intemperie en bolsas de 30 litros, concentraciones por debajo de las obtenidas en el presente trabajo ya que obtienen con Nutrilake, utilizado a  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e inóculos de  $75 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $810 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en contraste con lo obtenido aquí que fue de  $1\,576 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  utilizando  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e inóculo de  $50 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esto puede deberse a que las condiciones a la intemperie son muy diferentes a las controladas, principalmente en lo referido al aprovechamiento de la intensidad luminosa para la

función fotosintética, además de que, aunque son del mismo género, se trata de especies especies.

Estos mismos autores refieren, para el caso de *T. weissflogii*, concentraciones hasta cuatro veces mayores cuando cultivan esta especie con Nutrilake en bolsas de 15 litros en condiciones controladas. Ellos probaron el cultivo de esta especie sustituyendo el nitrato de sodio que compone el medio Guillard h por Nutrilake, en la misma proporción. Consideramos que el tamaño del inóculo de los cultivos es una de las causas de esta gran diferencia ya que ellos utilizaron  $110 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  para esta especie y en este trabajo se utilizó  $25 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  lo que hace que al 4to día obtengan concentraciones muy por encima inducidas por una mayor velocidad de crecimiento

Tabla 5. Contenido medio y desviación estándar de los componentes orgánicos (en  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) de las cuatro especies de microalgas cultivadas con tres medios de cultivo. MF: medio F, NL: Nutrilake y UR: urea. El asterisco indica que los resultados fueron comparados mediante pruebas no paramétricas. Letras iguales representan que no hay diferencias significativas.

		<i>C. muelleri</i>	<i>T. weissflogii</i>	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>T. suecica</i>
		( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ )	( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ )	( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ )	( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ )
Proteínas	<b>MF</b>	*24.97 a ± 4.08	185.08 a ± 28.28	6.90 a ± 1.39	72.68 b ± 15.79
	<b>NL</b>	*25.00 a ± 3.58	183.93 a ± 36.50	7.36 a ± 1.03	57.85 a ± 6.45
	<b>UR</b>	*25.85 a ± 1.18	279.75 b ± 48.99	8.43 b ± 0.82	74.67 b ± 11.33
Carbohidratos	<b>MF</b>	11.14 a ± 3.27	*127.15 b ± 43.24	*2.87 a ± 0.30	*16.22 a ± 2.89
	<b>NL</b>	9.90 a ± 2.58	*142.57 b ± 6.20	*2.75 a ± 0.21	*16.38 a ± 2.64
	<b>UR</b>	10.71 a ± 2.09	*71.18 a ± 4.82	*2.54 a ± 0.50	*14.60 a ± 3.72
Lípidos	<b>MF</b>	*16.47 a ± 4.47	122.09 ab ± 17.53	5.51 a ± 0.88	*23.96 b ± 4.33
	<b>NL</b>	*14.16 a ± 2.00	121.43 a ± 18.52	6.34 a ± 1.26	*19.52 a ± 2.96
	<b>UR</b>	*15.08 a ± 3.15	137.24 b ± 16.17	6.14 a ± 0.77	*25.95 b ± 4.31

Una influencia que también consideramos significativa es que en el presente trabajo se utilizó el medio Guillard f, que carece de cloruro de amonio y es evidente que una fuente adicional de nitrógeno favorece las concentraciones celulares.

En la literatura científica existen trabajos relacionados al uso de los fertilizantes agrícolas en la producción de microalgas para la acuicultura. González *et al.* (1999) estudiaron el crecimiento de las microalgas *Isochrysis* aff. *galbana* var *tahitiana*, *Chaetoceros gracilis* y *Chaetoceros* sp. en cuatro medios nutritivos: Algal, Guillard f/2, Fertilizante Agrícola (FA) y Walne. Obtuvieron que la máxima concentración celular para el fitoflagelado fue obtenida en los cultivos con FA, encontrándose que fue 45.4% más alta que la del medio f/2, 41.6% mayor que la del medio Walne y 7.9% más alta que la obtenida con el medio Algal. En el caso de las diatomeas, la máxima concentración celular de *C. gracilis* se obtuvo con el medio Walne en el cual se alcanzó una densidad celular 40.8% mayor que la obtenida en los otros medios de cultivo usados. En este trabajo las mayores concentraciones siempre se obtuvieron con los fertilizantes comerciales. Para *C. muelleri* y *T. suecica* la urea resultó mejor que el medio f y para

*T. weissflogii* e *Isochrysis* sp., el Nutrilake. En todos los casos las concentraciones con estos fertilizantes no aumentaron más del 13% la concentración celular con respecto al f, excepto en *C. muelleri* que con urea la densidad celular se incrementó en un 20.12%.

Oliva-Chan (1995) reporta concentraciones celulares de *Chaetoceros* sp. muy por debajo de las obtenidas en este trabajo para el medio f, al cuarto día de cultivo, aspecto este que pudo deberse al tamaño de los inóculos empleados que en su caso fue de  $2 \text{ a } 50 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y el empleado en este trabajo fue de  $100 \times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El uso de los fertilizantes agrícolas que probó (Bayfolan, Boni y Gro Green) no favoreció este parámetro, resultados que se contradicen con los obtenidos aquí, en que el uso de los fertilizantes urea y Nutrilake fueron muy buenos para las concentraciones celulares alcanzadas en *C. muelleri*. Esta misma autora muestra resultados similares con otra diatomea, *P. tricornutum* donde el medio f resultó mejor que los fertilizantes agrícolas probados.

De forma análoga a lo obtenido en el presente trabajo, Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) encontraron la mayor densidad celular en cultivos

de *C. muelleri* los días 2, 3 y 4 cuando utilizaban fertilizantes (36.8 mg.L<sup>-1</sup> de nitrato de amonio y 3.5 mg.L<sup>-1</sup> de pentóxido de sodio), diferente significativamente del medio f/2 utilizado como control. Asimismo, obtienen valores de peso seco y orgánico significativamente superiores cuando emplea el medio f/2, resultado que se contrapone con los nuestros debido a que la urea fue la que mayor biomasa aportó, no difiriendo significativamente del Nutrilake y sí del medio f. Esto puede deberse a que la urea tiene un alto contenido en carbono que favorece la función fotosintética de las microalgas.

Es importante señalar que aún cuando los cultivos de microalgas se hacen en volúmenes y condiciones similares, la producción de biomasa cambia con la concentración inicial utilizada. Así en este trabajo las densidades celulares de *C. muelleri*, *Isochrysis* sp. y *T. suecica* obtenidas con el medio f fueron superiores a las alcanzadas por Nieves *et al.* (2000, 2002, 2005), quienes usaron concentraciones iniciales menores a las de este estudio.

Aunque no se encontró en la literatura con que comparar las tasas de división acumulada y estandarizada obtenidas con estas especies, es significativo mencionar que los fertilizantes Nutrilake y urea respecto al medio f, tuvieron al final de los experimentos un efecto positivo sobre la tasa de división acumulada en *C. muelleri*, negativo en *T. weissflogii* y ningún efecto en las otras dos microalgas. Así también, la tasa de división acumulada estandarizada al final de los ensayos mostró una tendencia positiva con los fertilizantes en las diatomeas, a excepción de *T. weissflogii* con urea: los fertilizantes no manifestaron efecto alguno en el resto de las microalgas con respecto al medio f. Esto permite aseverar que, al menos, con estos fertilizantes, las diatomeas responden mejor en los cultivos que las otras microalgas.

Respecto a la composición proximal de las diferentes especies, en este trabajo, *T. suecica* mantiene alto nivel proteico cuando se utiliza Nutrilake, sin embargo bajo en lípidos. Esto coincide con lo planteado por Fábregas *et al.* (1987) para esta misma especie y donde plantean que la composición bioquímica le varía de acuerdo al medio de cultivo, fundamentalmente en proteínas, clorofila a y contenido de RNA. López-Eliás y Voltolina (1993), estudiando la composición bioquímica de cuatro especies de microalgas (*Chaetoceros* sp., *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum*

*tricornutum* y *Tetraselmis* sp.) cultivadas con medio f y un fertilizante comercial (Tan Line Citrus and Avocado Food) obtuvieron que no había diferencias importantes en la composición bioquímica de las especies al usar uno u otro medio de cultivo, aspecto este bastante raro ya que hay muchos trabajos que refieren los cambios en la composición proximal de las microalgas cuando se varían las condiciones de cultivo, entre ellas el medio.

Estos últimos autores obtienen para *Chaetoceros* sp. los mayores pesos seco y orgánico con el fertilizante empleado, coincidiendo con lo encontrado en el presente trabajo, no resultando así para el caso de *Tetraselmis* sp. El peso seco obtenido en *Tetraselmis suecica* aquí fue mayor con la urea no difiriendo de los demás medios, sin embargo el peso orgánico con Nutrilake resultó significativamente menor en esta especie.

Cuando nos referimos al aporte económico que pueda tener el uso de fertilizantes comerciales para la producción de microalgas a escala masiva, nos encontramos con que muchos investigadores lo recomiendan, no sólo por las densidades que alcanzan, sino por su valor nutritivo. En investigaciones realizadas con microalgas marinas bentónicas se ha encontrado que con el uso de fertilizantes agrícolas se tiene crecimientos, biomasa y composición química igual que con un medio completo (f/2) y a un costo de producción más bajo (Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Simental y Sánchez-Saavedra, 2003). Por otra parte, McAnally *et al.* (1990) indicaron que el uso de fertilizantes agrícolas como la urea y el sulfato de amonio pueden ser buenos sustitutos en laboratorios productores de microalgas cuyos costos de producción se reducen con respecto al medio f/2 de hasta en un 87.9%.

Valenzuela-Espinoza *et al.* (2005) utilizando la criptoficea *Rhodomonas* sp., proponen la factibilidad del uso de fertilizantes agrícolas para la producción de microalgas con buenos resultados en su concentración celular y en su composición proximal. Asimismo, Simental y Sánchez-Saavedra (2003) utilizan con éxito un fertilizante agrícola como medio de cultivo para la obtención de biomasa en tres especies de diatomeas bentónicas, dos del género *Nitzschia* y una del género *Navicula*.

Los resultados que se obtienen en este trabajo permiten corroborar que el Nutrilake puede ser usado como fertilizante, ya que ofrece

concentraciones celulares adecuadas para el fin que persiguen estos cultivos y similares a las obtenidas con el medio f, los componentes orgánicos o resultaron más altos o que no diferían de ese medio, excepto para dos especies que el contenido de lípidos resultó significativamente menor que los demás. En términos de biomasa también resultó adecuada para las cuatro especies y da tasas de división, generalmente, por encima del medio utilizado como testigo. *T. suecica* requiere un análisis aparte debido a que si bien es cierto que se obtienen concentraciones adecuadas con una alta tasa de división, su contenido nutricional (en proteínas y lípidos) está por debajo cuando lo comparamos con el uso de otros medios.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen los apoyos económicos que fueron proporcionados a través de los proyectos, PI-PROFAPI-06-155 (2006) del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación y "Ecofisiología de Organismos Acuáticos de Importancia en Acuicultura" apoyado por el PROMEP, a través del cuerpo Académico "Ecofisiología y Cultivo de Organismos Acuáticos" (UAS-CA-162) adscrito a la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

### REFERENCIAS

Alfonso, E., L. Ramos, E. Díaz-Iglesia, T. García y C. Rosas (1993): Manual del II curso internacional de producción de postlarvas de camarones peneidos del Atlántico de América. Campeche, México, 133 pp.

Alfonso, E. y L. Martínez (1988): Medio de cultivo para microalgas marinas. *Rev. Invest. Mar.* 9:39-46.

Bligh, E. y W. Dyer (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.

Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, y F. Smith (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28:350-356 p.

Fábregas, J., L. Toribio, J. Abalde, B. Cabezas y C. Herrero (1987): Approach to biomass production of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kyllin)

Butch using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient suppli in batch cultures. *Aquacult. Eng.* 6:141-150.

Fábregas, J. (2005): La creatividad para la innovación es lo más importante, pero no se financia. <http://www.ipacuicultura.com> [consultado en septiembre del 2007].

González, B., E. Buitrago y K. Frontado (1999): Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. *Memorias de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales*, Tomo LVIX, No. 151, pp:75-84.

González-Rodríguez, E. y S. Maestrini (1984): The use of some agricultural fertilizer for the mass production of marine algae. *Aquaculture.* 36: 245-256.

Guillard, R.R.L. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture marine invertebrate animals* (L. Smith and M.H. Chanley, eds.), New York, pp: 29-59.

Iriarte, F. y E. Buitrago (1992): Determinación de la concentración y fuentes óptimas de nitrógeno en cultivos de *Chlorella* sp. usados como inóculos masivos. Larvicultura de camarones peneidos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma II, Acuicultura CYTED-D.

Leal, S., R. Curbelo, B.M. Torres, N. Núñez, B. García, D. Muñoz y A. Pacheco (2007): Nutrilake, fertilizante utilizado para el cultivo de microalgas marinas en sistemas controlados. Cuba, *Pesca 2007*, Resúmenes.

López Elías, J.A. y D. Voltolina (1993): Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas* 19 (2): 169-180.

Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr y R. Randall (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265- 275.

Martínez-Córdova, L.R. (1993): *Camaronicultura. Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos*. México, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (CICTUS), AGT Editor S.A., 233 pp.

- McAnally, S.L., A.F.J. Ocampo y P.L. García (1990): Efecto de la microalga *Monochrysis lutheri* cultivada con fertilizantes agrícolas en el crecimiento y sobrevivencia de larvas y postlarvas del mejillón *Mytilus edulis* (L.). México, VII Congreso Nacional de Oceanografía, Mazatlán, Sinaloa, Resúmenes.
- Nieves S., M. y C. Vega P. (1994): Tasa de crecimiento, biomasa y costo de producción de *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae) y *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) cultivadas con el medio f y tres medios alternativos. *Revista Ciencias del Mar UAS*, Epoca I, 13: 39-53.
- Nieves, M., D. Voltolina, M.T. Sapién, H. Gerhardus, A.L. Robles y M.L. Villa (1996): Culturing microalgae with agricultural fertilizers. *Rivista Italiana di Acquacoltura* 31: 81-84.
- Nieves, M., D. Voltolina y A. Barreras (1998): A new parameter for comparison of microalgae growth. *Riv. Ital. Acquacolt.* 33:177-184.
- Nieves, M., D. Voltolina, J. López Ruíz, M.A. Cisneros y P. Piña (2000): Cultivo de microalgas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica. *Hidrobiológica* 10:1-6.
- Nieves, M., D. Voltolina, A. Medina, P. Piña y J. López Ruíz (2002): Zeolites and diatom growth. *Aquac. Res.* 33:75-79.
- Nieves, M., D. Voltolina y P. Piña (2005): Growth and biomass production of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in a standard medium added with three products of zeolitic nature. *Aquacultural Engineering*. 32: 403-410.
- Oliva-Chan, T. (1995): Crecimiento y composición de las microalgas *Chaetoceros* sp. Y *Phaeodac-tylum tricornutum* Bohlin con diferentes medios de cultivos. México, Universidad Autónoma de Sinaloa, *Tesis Profesional*, 64 pp.
- Pande, S., R. Khan y T. Venkatasubramanian (1963): Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Anal. Biochem.* 6:415-423.
- Peraza-Díaz, D.M. (1997): Cultivo de la diatomea *Chaetoceros* sp. con tres fertilizantes agrícolas. México, Universidad Autónoma de Sinaloa, *Tesis de Técnico en Acuicultura*, 24 pp.
- Simental-Trinidad, J.A., M.P. Sánchez-Saavedra y J.G. Correa-Reyes (2001): Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. *Journal of Shellfish Research* 20(2): 611-617.
- Simental, J.A. and M.P. Sánchez-Saavedra (2003): The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering* 27:265-272.
- Torres, B., S. Leal, B. García, A. Pacheco y M. Mojena (2005): Utilización de un nuevo fertilizante para la acuicultura en cultivos de microalgas. Cuba, VII Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ficología, Ficología 2005, Resúmenes.
- Treece, G.D. and M.E. Yates (1988): Laboratory manual for the culture of penaeid shrimp larvae. Marine Advisory Service, Sea Grant College Program, Texas A & M Univ., 95 pp.
- Valenzuela, E.E., G.G.J. Wilborn y S.L.S. MacAnally (1990): Cultivo de *Pavlova lutheri* (Droop) Green con fertilizantes agrícolas como fuente de nitrógeno y adiciones de bióxido de carbono. México, Mazatlán, *Memorias del VII Congreso Nacional de Oceanografía*.
- Valenzuela-Espinoza, E., V. Gendrop-Funes, R. Pérez-Castañeda y J.G. Wilburn-González (1999): Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone) alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas* 25(3): 423-437.
- Valenzuela-Espinoza, E., F. Lafarga-De la Cruz, R. Millán-Núñez y F. Núñez-Cabrero (2005): Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio F/2 y fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas* 31(1A):79-89.
- Voltolina, D., M. Nieves and P. Piña: (1999): Fertilizers as cheap growth media for microalgae production: a Mexican point of view. *Rivista Italiana di Acquacoltura*. 34: 43-45.
- Vonshak, A. (1986): Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: *Handbook of Microalgal Mass culture*, CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, pp:117-145.
- Walne, P.R. (1970): Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest. London, Serie 2*, 24(5): 1-2.
- Whyte, J. (1987): Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60:231-241.
- Zar, J.H. (1999): *Biostatistical analysis*. EU, New Jersey, 4ta. ed. Prentice Hall, 663 pp.

Aceptado: 27 de septiembre de 2007