

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE  
ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA, BIOTECNOLOGÍA MARINA

EVALUACIÓN DEL VALOR NUTRIMENTAL DE LA MICROALGA *Chaetoceros  
muelleri* CULTIVADA EN UN MEDIO NO CONVENCIONAL, PARA ALIMENTAR  
A LARVAS DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*).

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS presenta

Juan Manuel Pacheco Vega

Ensenada, Baja California a Agosto de 2003.

**RESUMEN** de la tesis de Juan Manuel Pacheco Vega, presentada como un requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California. Agosto de 2003.

EVALUACIÓN DEL VALOR NUTRIMENTAL DE LA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* CULTIVADA EN UN MEDIO NO CONVENCIONAL, PARA ALIMENTAR A LARVAS DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

Resumen aprobado por:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Director de Tesis.

Para el cultivo de larvas de las distintas especies de camarón en México usualmente se requiere la producción de microalgas bajo condiciones controladas. Una de las especies ampliamente utilizadas por sus características de crecimiento y composición proximal es la diatomea planctónica *Chaetoceros muelleri*. Uno de los principales factores que influyen en el mantenimiento de los cultivos masivos es la utilización del medio de cultivo adecuado, económico y de fácil preparación capaz de sustituir al medio "f/2" en laboratorios de producción masiva de microalgas .

Se realizó la selección de un medio de cultivo utilizando fertilizantes agrícolas como aporte de nitrógeno, fósforo y sílice para el cultivo de *Chaetoceros muelleri*. Como medio de cultivo control se utilizó el medio químico "f/2". En la selección del medio agrícola se consideró la adición y sustracción de las vitaminas y los metales traza utilizados en el medio control. Se realizaron cultivos a escala de matraz Erlenmeyer (250 ml) y garrafón (15 l) en donde se comparó el crecimiento de los cultivos mantenidos en el medio agrícola y en el medio control. Los mejores resultados de crecimiento de *Chaetoceros muelleri* se obtuvieron con el medio agrícola con adición de vitaminas y metales traza. Sin embargo se evaluaron diferencias significativas en el valor promedio del ancho de las células de *Chaetoceros muelleri* al ser mantenidas en el medio agrícola (5.5  $\mu\text{m}$ ) y el medio control (4.9  $\mu\text{m}$ ).

Se mantuvieron cultivos semicontínuos de *Chaetoceros muelleri* con el medio agrícola seleccionado y el medio control con una dilución del 30% por día. No se evaluó diferencia significativa en la composición bioquímica de las células cosechadas. Los valores de composición evaluados como carbohidratos para el medio agrícola fueron de 10.0 - 13.1% y en el medio químico 9.4-13.5%. Los valores de proteínas fueron de 26.0-29.5% para el medio agrícola y de 23.4-24.3% para el medio químico. La cantidad de lípidos hallados fue de 18.3-21.0% para el medio agrícola y de 24.9-27.5% para el medio químico. Las cenizas obtenidas para el medio agrícola fueron de 38.1-42.9% mientras que para el medio químico fueron de 42.9-57.7%. No se encontraron diferencias significativas en la composición bioquímica entre ambos medios de cultivo.

El perfil de aminoácidos esenciales en las microalgas cultivadas en el medio agrícola fue de 53.69% mientras para las microalgas cultivadas en el medio “f/2” fue de 54.73%, no encontrándose diferencias significativas entre tratamientos. El contenido de aminoácidos esenciales fue de un 45.03% para el medio agrícola y de un 44.82% para el medio “f/2”, no encontrando diferencias significativas. Respecto al perfil de ácidos grasos las diferencias más importantes se encontraron en la cantidad de ácidos grasos de la serie 20:5 n-3 y 22:6 n-3, en donde fue mayor en el medio agrícola con un 17.33 %, mientras que para el 22:6 n-3 fue mayor el encontrado (6.98%) en el medio “f/2”.

Para verificar la calidad de *Chaetoceros muelleri* cultivada en el medio agrícola y en el medio químico, se suministraron como alimento las microalgas cultivadas como alimento para larvas de camarón blanco.

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia obtenida en larvas de *Litopenaeus vannamei* al ser alimentadas con *Chaetoceros muelleri* cultivadas en el medio agrícola (34.64%), respecto a las larvas alimentadas con la microalga cultivada en el medio “f/2” (39.37%). La calidad de las larvas de *L. vannamei* obtenidas después de ser sometidas a una prueba de estrés resultó ser alta. Al final del experimento en el cultivo larval, se obtuvo un índice de rendimiento de 0.44 (mg/día x %sup.), para las larvas alimentadas con microalgas cultivadas en el medio “f/2” y de 0.58 (mg/día x %sup.) en las alimentadas con microalgas cultivadas en el medio agrícola.

**Palabras claves:** *Chaetoceros muelleri*, larvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*, fertilizantes agrícolas, composición bioquímica, valor nutrimental.

**ABSTRACT** of the thesis presented by Juan Manuel Pacheco Vega, as a partial fulfillment of the requirements to obtain the degree of MASTER OF SCIENCES with orientation in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California, México. August, 2003.

EVALUATION OF THE NUTRITIONAL VALUE OF THE MICROALGAE  
*Chaetoceros muelleri* CULTURED IN A NON CONVENTIONAL MEDIA TO FEED  
WHITE SHRIMP LARVAE *Litopenaeus vannamei*.

Abstract approved by:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Thesis director

The production of microalgae under controlled conditions is often required for the culture of different species of shrimp larvae in Mexico. Due to its growth characteristics and biochemical composition, one of the most widely used species is the planktonic diatom *Chaetoceros muelleri*. The selection of an adequate, economic and easy to prepare growth media that can be able to substitute the conventional “f/2” is one of the main factors involved in the maintenance of massive microalgal production laboratories. A culture medium based on agricultural fertilizers was selected as a source of nitrogen, phosphorous and silicon for the culture of *Chaetoceros muelleri*. Traditional “f/2” growth media was used as a control. The addition and subtraction of vitamins and trace metals from the control medium was considered in the selection of the agricultural medium.

Cultures in 250 ml Erlenmeyer flasks and 15 l containers were developed to compare microalgal growth in both media (agricultural and control). The best results for the growth of *Chaetoceros muelleri* were obtained with the agricultural medium with the addition of vitamins and trace metals. However, significant differences were evaluated for the average width of the cells of *Chaetoceros muelleri* grown in the agricultural medium (5.5  $\mu\text{m}$ ) and the control (4.9  $\mu\text{m}$ ).

Semi-continuous cultures of *Chaetoceros muelleri* were performed, both, in the selected agricultural medium and the control at a 30% dilution per day. No significant differences were evaluated in the composition of harvested cells. The evaluated carbohydrate values found in the agricultural medium were 10.0 – 13.1%, while in the “f/2” medium were 9.4 – 13.5%. Protein values for the agricultural medium were 26.0 – 29.5%, while the values for the “f/2” medium were 23.4 – 24.3%. Lipid composition ranged from 38.1 – 42.9% for the agricultural medium, while 42.9 – 57.7% corresponded to the “f/2” medium. No significant differences were found in the biochemical composition of cells between both culture media.

The profile of essential amino acids of microalgae cultured in the agricultural medium was of 53.69%, while the profile of the microalgae grown in “f/2” was 54.73%, thus, no significant differences were found between them. The content of essential amino acids of the agricultural medium was 45.035%, while that of the “f/2” medium was 44.82%, thus, no significant differences were found. Regarding the fatty acid profile, the most important differences were found in the amount of fatty acids of the 20:5 n-3 and 22:6 n-

3 series, where such compounds were greater in the agricultural medium (17.33%), while 22:6 n-3 was higher in the “f/2” medium (6.98%).

The quality of *Chaetoceros muelleri* grown in agricultural and “f/2” media was evaluated as they were fed to white shrimp larvae.

No significant differences in the survival of *Litopenaeus vannamei* larvae were observed while they were fed *Chaetoceros muelleri* grown in the agricultural medium (34.64%) or in the “f/2” medium (39.37%). The quality of *L. vannamei* larvae after being submitted to stressful conditions was high. At the end of the larval culture experiment, a performance index of 0.44 (mg/day x survival %) was obtained for larvae fed with microalgae grown in “f/2”, while the performance index for larvae fed with microalgae grown in the agricultural medium was 0.58 (mg/day x survival %).

**Keywords:** *Chaetoceros muelleri*, shrimp larvae, *Litopenaeus vannamei*, agricultural fertilizers, biochemical composition, food value.

## DEDICATORIA

*A mi padre por seguir con migo en cada momento, y por sus consejos que hoy empiezan a fructificar (q.e.p.d.).*

*A mi madre por ser ejemplo de vida y por ser pilar importante de mi formación humana.*

*A mi esposa Juanita por ser mi compañera y amiga, alentándome a alcanzar las metas y objetivos que me he propuesto.*

*A mis hijas Calafia Sinahí y Paola Dianey por ser el mejor estímulo de mi superación personal.*

*A mis hermanos y hermanas por su apoyo recibido en cada momento.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi esposa e hijas por estar a mi lado durante mis estudios y por motivarme a alcanzar mis objetivos.

A mi directora Dra. Ma. Del Pilar Sánchez Saavedra por guiarme de una forma acertada en la realización de mi tesis y por saber ser no solamente asesora sino una amiga.

A los miembros que forman mi comité: M. en C. Jorge Arturo Simental Trinidad, Dr. Eugenio Díaz Iglesias y al Dr. Edgardo Cañon Tapia, a todos ellos por sus comentarios y sugerencias del manuscrito.

A Liliana Salinas por su compañerismo y por la traducción del resumen.

Al Biol. Norberto Flores Acevedo por su ayuda y facilidades brindadas en la elaboración y montaje del diseño experimental.

A mis compañeros Carlos y Raúl por haber compartido grandes momentos.

A Cecilia Loera que aunque no es mi secretaria, ha estado dispuesta a ayudarme cuando lo he requerido.

Al Tec. Francisco Valenzuela por apoyarme en la elaboración del esquema del diseño experimental.

A Acuacultores de La Paz S.A. de C.V. por su donación de los nauplios utilizados.

Al químico José Luis Castañeda por la donación de los fertilizantes utilizados.

Al CONACyT. Por el apoyo económico recibido para cursar la Maestría.

## CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
I.1. Requisitos generales de nutrición del camarón blanco	1
I. 2. Características del alimento suministrado a larvas de camarón blanco	2
I. 3. Antecedentes históricos de la camaronicultura en México	8
I. 4. Antecedentes del uso de medios alternos en el cultivo de microalgas	9
I. 5. Objetivos	15
I. 5. 1. Objetivo general	15
I. 5. 2. Objetivos específicos	15
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	
II. 1. Descripción de la cepa utilizada	16
II. 2. Calidad del agua	16
II. 3. Selección y preparación del medio de cultivo	17
II. 4. Acondicionamiento de la cepa	21
II. 5. Cultivos mantenidos a escala de garrafón	21
II. 6. Comparación de cambios morfológicos	22
II. 7. Evaluación bioquímica	23
II. 7. 1. Peso seco y contenido de cenizas	23
II. 7. 2. Proteínas	24
II. 7. 3. Carbohidratos	24
II. 7. 4. Lípidos	24
II. 7. 5. Caracterización de aminoácidos	25
II. 7. 6. Caracterización de ácidos grasos	25
II. 8. Tratamiento estadístico en microalgas	25
II. 9. Obtención de nauplios	27
II. 10. Aclimatación de nauplios	28
II. 11. Mantenimiento de larvas de camarón	28
II. 12. Diseño de unidades de cultivo	29
II. 13. Control de factores abióticos	32
II. 14. Evaluación de la calidad de las larvas	32
II.14. 1. Estrés	32
II.14. 2. Supervivencia	33
II.14. 3. Tasa de crecimiento (%)	33
II.14. 4. Índice de rendimiento	34
II.15. Tratamiento estadístico en larvas de camarón	34
<b>III. RESULTADOS</b>	
III. 1. Selección del medio de cultivo	35
III. 2. Cultivos estáticos en garrafón	37
III. 3. Características morfológicas de la microalga	40
III. 4. Cultivos semicontínuos en garrafón	40
III. 5. Composición proximal y bioquímica de la microalga	41
III. 6. Contenido de proteínas	44



**CONTENIDO (continuación)**

III. 7. Contenido de carbohidratos	45
III. 8. Contenido de lípidos totales	45
III. 9. Composición de aminoácidos	46
III. 10. Perfil de ácidos grasos	49
III. 11. Cultivo larval de <i>Litopenaeus vannamei</i>	51
IV. DISCUSIÓN	
IV. 1. Selección del medio de cultivo	54
IV. 2. Composición fraccional de la diatomea <i>Chaetoceros muelleri</i>	57
IV. 3. Aminoácidos	60
IV. 4. Ácidos grasos	61
IV. 5. Cultivo larval de <i>Litopenaeus vannamei</i>	64
V. CONCLUSIONES	68
VI. RECOMENDACIONES	69
LITERATURA CITADA	70
ANEXO	82

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Diagrama de flujo para el cultivo de microalgas con fertilizantes agrícolas (Fa) y el medio químico (“f/2”) suministradas como alimento a larvas de camarón.	18
2	Esquema del diseño experimental utilizado en el mantenimiento de larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	31
3	Curva promedio del crecimiento poblacional para <i>Chaetoceros muelleri</i> mantenido en cultivos en matraz Erlenmeyer con un medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa) considerando la adición (+) y substracción (-) de vitaminas (V) y metales traza (Mt). A= Fa + Mt + V, B= Fa – Mt + V, C= Fa – Mt + V, D= Fa – Mt - V y E= “f/2”. Como medio control de estos experimentos se utilizó el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975). (A) escala normal, (B) escala logarítmica. Las barras verticales indican la desviación estándar.	36
4	Crecimiento poblacional promedio para <i>Chaetoceros muelleri</i> mantenido en cultivos en garrafones de vidrio con un medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa) considerando la adición (+) y substracción (-) de vitaminas (V) y metales traza (Mt). A= Fa + Mt + V, B= Fa + Mt - V, C= Fa – Mt + V, D= Fa – Mt - V y E= “f/2”. Como medio control de estos experimentos se utilizó el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975). (A) escala normal, (B) escala logarítmica. Las barras verticales indican la desviación estándar.	38
5	Crecimiento poblacional promedio para <i>Chaetoceros muelleri</i> en cultivos semicontínuo con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control.	41
6	Variación (%) del contenido de materia orgánica para <i>Chaetoceros muelleri</i> en tres diferentes días para cultivos semicontínuos con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio, se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control. Las barras verticales indican desviación estándar.	43

**LISTA DE FIGURAS (continuación)**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
7	Variación (%) del contenido de cenizas para <i>Chaetoceros muelleri</i> en tres diferentes días para cultivos semicontínuos con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control. Las barras verticales indican desviación estándar.	43
8	Variación (%) del contenido de proteínas para <i>Chaetoceros muelleri</i> en tres diferentes días en cultivos semicontínuos con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio control. Las barras verticales indican la desviación estándar.	44
9	Variación (%) del contenido de carbohidratos para <i>Chaetoceros muelleri</i> en tres diferentes días en cultivos semicontínuos con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control. Las barras indican la desviación estándar.	45
10	Variación (%) del contenido de lípidos totales para <i>Chaetoceros muelleri</i> en tres diferentes días en cultivos semicontínuo con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control. Las barras indican la desviación estándar.	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Composición química de los distintos medios de cultivo expresados en micromoles: Medios de cultivo formulados con fertilizantes agrícolas A (fertilizantes agrícolas + vitaminas + metales traza), B (fertilizantes agrícolas + vitaminas - metales traza), C (fertilizantes agrícolas - vitaminas + metales traza), D (fertilizantes agrícolas - vitaminas - metales traza) y el medio químico (“f/2”) utilizado como control.	19
II	Secuencia de alimentación utilizada para las larvas de camarón ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) en los sistemas de cultivo.	29
III	Valores promedio de la tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) para <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivadas en sistema estático en Erlenmeyer, con un medio con fertilizantes agrícolas (Fa) con adición y sustracción de metales traza y vitaminas (A= Fa + metales traza + vitaminas, B= Fa + metales traza - vitaminas, C= Fa - metales traza + vitaminas, D= Fa - metales traza - vitaminas), y el medio “f/2” (E) descrito por Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba <i>a posteriori</i> de “Student-Neuman Keuls”), $\alpha=0.05$ : $a < b$ .	37
IV	Valores promedio de la tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) para <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivadas en sistema semicontinuo en garrafón, con un medio con fertilizantes agrícolas (Fa) con adición y sustracción de metales traza y vitaminas (A= Fa + metales traza + vitaminas, B= Fa + metales traza - vitaminas, C= Fa - metales traza + vitaminas, D= Fa - metales traza - vitaminas), y el medio “f/2” (E) descrito por Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos y prueba <i>a posteriori</i> de “Student-Neuman Keuls”, $\alpha=0.05$ : $a < b < c$ .	39
V	Valores promedio de las mediciones de las longitudes obtenidas para la microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en un medio con fertilizantes agrícolas (“A”(Fa + V + Mt)) y en el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas $\alpha=0.05$ : $a < b < c$ .	40

### LISTA DE TABLAS (continuación)

VI	Componentes bioquímicos celulares en porcentaje de peso seco libre de cenizas de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en un sistema semicontínuo en garrafón con 10 litros, utilizado el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther y el medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa) como medio de cultivo. La desviación estándar se incluye entre paréntesis. Las letras al lado de las desviaciones indican diferencias significativas y prueba <i>a posteriori</i> de “Student-Neuman Keuls”, $\alpha=0.05$ : $a < b$ .	42
VII	Valores promedio del perfil de aminoácidos en porcentajes del total de proteínas (peso seco) para la diatomea <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en forma semicontínua en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo con fertilizante agrícolas (Fa), y como medio de cultivo control el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas $\alpha=0.05$ : $a < b$ .	48
VIII	Valores promedio del perfil de ácidos grasos expresados en porcentajes del peso seco del total de lípidos para la diatomea <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en forma semicontinua en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo con fertilizante agrícolas (Fa), y como medio de cultivo control el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas $\alpha=0.05$ : $a < b$ .	50
IX	Calidad de larvas y supervivencia para <i>Litopenaeus vannamei</i> al ser sometidas a una prueba de estrés salino y térmico, las larvas se alimentaron con microalgas cultivadas en el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) y en un medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencia significativa $\alpha=0.05$ : $a < b$ .	52

**LISTA DE TABLAS (continuación)**

- X      A= Porcentajes de ganancia en masa de *Litopenaeus vannamei*, talla del cefalotórax e índice de rendimiento obtenido durante el desarrollo larval: B= Incremento en talla (mm) del cefalotórax durante el desarrollo larval de *Litopenaeus vannamei*. Los valores fueron obtenidos después de ser alimentadas las larvas con microalgas cultivadas en el medio “f/2” (Guillard y Ryther, 1975) y en medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencia significativa  $\alpha=0.05$ : a < b.      53

# **EVALUACIÓN DEL VALOR NUTRIMENTAL DE LA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* CULTIVADA EN UN MEDIO NO CONVENCIONAL, PARA ALIMENTAR A LARVAS DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)**

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Requisitos generales de nutrición del camarón blanco.**

El camarón *Litopenaeus vannamei* es conocido comúnmente como camarón blanco del Pacífico, es una especie nativa de la costa oeste del Océano Pacífico y su distribución va desde Sonora, en el Golfo de California, México, hasta las costas del Perú. Se le puede encontrar en aguas costeras desde la superficie hasta 72 m de profundidad, sobre fondos fangosos, con preferencia por las aguas marinas durante su vida como adulto y por las aguas estuarinas desde poslarva hasta juvenil. Esta especie es muy apreciada por los acuicultores no solo por sus excelentes condiciones de crecimiento y supervivencia, sino además por su alto valor en el mercado. Otra de las ventajas del uso de esta especie es su resistencia al virus Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa (IHHN) que ha afectado las granjas de la zona noroeste del país que cultivan el camarón azul (Martínez-Córdova, 1994).

El desarrollo larval y la supervivencia del camarón blanco dependen del tipo, calidad y cantidad del alimento ingerido en esta etapa. En este sentido, algunos estudios han determinado el efecto del medio de cultivo utilizado para el cultivo de distintas especies de microalgas utilizadas como alimento (Sánchez, 1986). Actualmente se sabe que el crecimiento de los crustáceos también se ve afectado por el nivel y clases de lípidos que

contenga en su dieta (Soler-Jaramillo, 1996). Por esta razón las dietas suministradas durante el cultivo larval deben de contener una alta concentración de lípidos, los cuales les proveen de energía, además de ser acarreadores de algunas vitaminas, fosfolípidos, y otros compuestos (Villalon, 1991).

## **I.2. Características del alimento suministrado a larvas de camarón blanco.**

El camarón (hasta poslarva I) mantenido bajo condiciones de cultivo consume microalgas de diversas especies, las cuales son suministradas en forma individual o mixta. Después del estadio Mysis II el camarón se alimenta además de las microalgas, de zooplancton. Simultáneamente se suministra *Artemia* sp. hasta que las microalgas son sustituidas en su totalidad por alimento peletizado.

A partir del estadio de protozoa I y hasta poslarva I, el alimento además de satisfacer sus requerimientos nutricios, debe tener las características siguientes:

1. Ser fácilmente reconocible por la larva.
2. Ser de un tamaño que permita su deglución.
3. Pertenecer a la flora pelágica y poseer un movimiento suave.
4. Ser digerible y altamente nutritivo.
5. Ser fácil de cultivar (Báez-Dueñas *et al.*, 1994).

Una especie de microalga ampliamente utilizada en la camaronicultura para alimentación de larvas por las características antes mencionadas, es la diatomea



*Chaetoceros muelleri*. La diatomea *Chaetoceros muelleri* es una microalga que se caracteriza por ser de color café, de forma rectangular, con tamaño promedio 4 a 9  $\mu\text{m}$ , presentan cuatro flagelos en sus extremos, se desarrolla en salinidades de 35‰ y puede crecer a temperaturas de entre 15 a 30°C. Esta especie de microalga se ha caracterizado por tener un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) (Trece y Fox, 1993). Sin embargo, el cultivo de este tipo de microalga en grandes volúmenes (más de 200 litros) es realizado usualmente con métodos convencionales de cultivo como es el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975).

Básicamente pueden reconocerse dos tipos de aportes de nutrientes para la formulación de medios de cultivo no convencionales y que son utilizados en la acuicultura para la producción de microalgas: los medios orgánicos y los medios químicos o minerales. Los primeros están compuestos de desechos animales o vegetales, como lo son las excretas de animales de granja (gallinaza, borregaza, cerdaza, vacaza y otros compuestos), desechos agrícolas y macrófitas acuáticas. Este tipo de fertilizante orgánico puede ser aplicado de manera directa en forma fresca o seca, o bien fermentado como bioabono líquido o en forma de composta (Arredondo-Figueroa, 1993).

En lo que respecta a los fertilizantes químicos o minerales, estos compuestos son prácticamente los mismos que se utilizan en la agricultura y parten de la base de que sus componentes principales son el nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), componentes cuyos porcentajes del peso se indican en su presentación. Estos fertilizantes se presentan

en el mercado comercial en dos formas: granular o líquido, como es el caso de la urea, superfosfato triple, amonio líquido y los polifosfatos (Arredondo-Figueroa, 1993).

La utilización de fertilizantes líquidos como aporte de nutrientes para el cultivo de microalgas presenta algunas ventajas que deben ser consideradas: Los fertilizantes líquidos tienen una buena solubilización comparativamente a la de los fertilizantes sólidos. Los fertilizantes líquidos no producen precipitados que formen turbidez en el agua (González-Rodríguez y Maestrini, 1984, Simental-Trinidad, 1999).

Entre los elementos más importantes que constituyen las células microalgales se puede mencionar el carbono, el cual constituye el 50% de la biomasa microalgal. El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es el aporte de carbono celular durante el crecimiento fotoautotrófico característico de las microalga. Se suministra a los cultivos de microalgas generalmente mezclado con aire utilizado para la resuspensión y aireación del cultivo. Además del  $\text{CO}_2$  disuelto en el agua, hay otras sustancias que son esenciales para el crecimiento de las microalgas y son denominados nutrientes mayores, que son requeridos en grandes cantidades para el crecimiento de las microalgas. Muchas de estas sustancias son componentes menores del agua salada, entre estos componentes, los nitratos y fosfatos son de vital importancia para la producción de microalgas, principalmente cuando se mantienen en sistemas de cultivo y el propósito fundamental es producir altas densidades celulares.

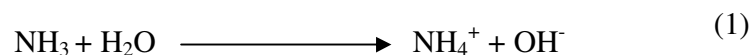
Dentro del contenido celular, el nitrógeno después del carbono, es el elemento más importante que forma la materia orgánica de las células microalgales. El aporte de nitrógeno al medio de cultivo suele ser inorgánico (nitratos, nitritos y amoníaco), aunque a veces se utiliza nitrógeno orgánico en cuyo caso el compuesto orgánico más comúnmente utilizado es la urea (Kaplan *et al.*, 1986; Martínez-Fernández, 1998).

La urea es un excelente aporte de nitrógeno para las algas en cultivo y es un elemento muy importante en el ciclo del nitrógeno en el medio marino natural (McCarthy, 1972). Se ha encontrado que el nitrógeno de la urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) debe ser asimilado en nitrógeno orgánico sin conversión a  $\text{NH}_3^+$ . La enzima que metaboliza la urea es la ureasa, sin embargo se ha determinado que existe un gran número de microalgas que no contienen esta enzima. Se ha evaluado que *Phaeodactylum* sp., es una especie que contiene ureasa, y puede metabolizar urea a bajas concentraciones (1.5  $\mu\text{M}$ ) de urea (Syrett, 1981).

Dentro de las diferentes formas de nitrógeno, el amonio es una de las formas reducidas que pueden ser incorporadas más fácilmente a las células. Sin embargo el amonio presenta inestabilidad en su forma química respecto al pH y a la temperatura y en dependencia de la magnitud de éstas el amonio puede ser convertido fácilmente a amoníaco.

El amoníaco es un subproducto del metabolismo de los animales y de la descomposición de la materia orgánica. En el agua, el nitrógeno amoniacal (amoníaco) se presenta en dos

formas, la no ionizada ( $\text{NH}_3$ ) y la ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ), las cuales están siempre en equilibrio, aunque éste depende de la temperatura y del pH del medio (ecuación 1):



Cuando el pH se incrementa, el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) que es muy tóxico, aumenta en relación con el ión amonizado. Un aumento en la temperatura del agua también causará un incremento en la producción de amonio no ionizado, pero este efecto es menor que el causado por valores de pH altos. El aumento en el pH en un medio acuático con alta cantidad de desechos orgánicos, puede determinar un incremento del amonio no ionizado. El amonio no ionizado resulta tóxico y este efecto se manifiesta en los organismos en cultivo como un aumento en el consumo de oxígeno, daño en las branquias y reducción en la habilidad de la sangre para transportar oxígeno (De Nogales-Pérez y Santos-Perea, 1995).

El fósforo es otro nutriente primordial que requieren las microalgas para poder crecer. Este nutriente está involucrado en la mayoría de los procesos celulares como la transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos. Como aporte de fósforo en los medios de cultivo para microalgas se utiliza fundamentalmente fósforo inorgánico llamado ortofosfato ( $\text{PO}_4$ ) (Kaplan *et al*, 1986; Martínez-Fernández, 1998).

Algunos nutrientes como los silicatos son para las diatomeas un requerimiento específico debido a que son el mayor componente de su pared celular. La incorporación

de estos nutrientes por las microalgas se realiza durante la división celular principalmente (Pacheco-Vega, 2001).

Existen otro tipo de nutrientes a los cuales se les denomina micronutrientes. Éstos son una mezcla de compuestos que se requieren en bajas concentraciones, en el rango de micro a miligramos por litro del medio de cultivo. La efectividad de la mezcla de estos compuestos requiere de un agente quelante (EDTA) (Kaplan *et al.*, 1986; Martínez-Fernández, 1998).

Existen muy pocos antecedentes de estudios que evalúen la composición bioquímica de las microalgas cultivadas con un medio químico y las cultivadas con medios alternativos obtenidos a partir de fertilizantes agrícolas y otros compuestos orgánicos (López-Elías y Voltolina, 1993; Simental-Trinidad, 1999; Gracida-Valdepeña, 1999). Existen aún menos antecedentes que evalúen el valor nutrimental de las microalgas producidas con medios de cultivo químicos y orgánicos.

### **I.3. Antecedentes históricos de la camaronicultura en México.**

Actualmente la camaronicultura se practica en mayor o menor medida en gran parte de los países del mundo, aunque por supuesto que algunos, por su situación geográfica, socioeconómica y política están más avanzados en esta actividad (Martínez-Cordova, 1994).

En México, a principios de la década de los 70's, el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, en colaboración con el "Environmental Research Laboratory" de la Universidad de Arizona, empezó a realizar investigaciones sobre el cultivo del camarón en ambiente controlado en unas instalaciones originalmente creadas para el cultivo hidropónico de hortalizas, en Puerto Peñasco Sonora, México (Martínez-Córdoba, 1994).

En el estado de Baja California Valenzuela-Espinoza y colaboradores (1999) evaluaron la supervivencia de larvas de camarón alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producida con fertilizantes agrícolas y las compararon con larvas alimentadas con microalgas cultivadas en el medio "f/2" de Guillard y Ryther (1975). Estos autores no encontraron diferencias en la supervivencia de larvas de camarón entre ambos tratamientos. Han habido otros autores que han trabajado en el cultivo de microalgas cultivadas con fertilizantes agrícolas y su efecto en el crecimiento y supervivencia de larvas y post larvas de mejillón (McAnally-Salas *et al.*, 1992).

#### **I. 4. Antecedentes del uso de medios alternos en el cultivo de microalgas.**

El cultivo de microalgas con medios no convencionales es una actividad que se ha desarrollado desde hace más de medio siglo (Simental-Trinidad, 1999). Actualmente existe una gran cantidad de formulaciones de medios de cultivo para las microalgas marinas, desde recetas sencillas basadas en la solución de Miquel-Matue (mencionada en Kinne, 1976), hasta mezclas complejas desarrolladas más recientemente (Ukeles, 1976; Sánchez-Saavedra, 1986). Las formulas de medios de cultivo pueden ser definidos químicamente, o estar basados en agua de mar enriquecida con productos químicos o con extractos de suelos y/o productos orgánicos (Sánchez-Saavedra, 1986).

Entre los trabajos clásicos en el tema de uso de fertilizantes agrícolas destaca el realizado por Gonzáles-Rodríguez y Maestrini (1984), quienes mantuvieron cultivos de microalgas con diferentes mezclas de fertilizantes. Encontraron que la adición de metales a los aportes de macronutrientes (nitrógeno, fósforo y sílice), no mejoró significativamente la cantidad de la biomasa de los cultivos en los cuales se emplearon nutrientes grado industrial, ya que estos últimos contienen impurezas, las cuales actúan como micronutrientes.

Como antecedentes de la utilización de medios alternativos para el cultivo de microalgas Pacheco-Vega (2001), realizó cultivos de la Prasinophyta *Tetraselmis suecica* en diferentes formulaciones químicas con base en fertilizantes agrícolas (Urea y 20:20:20) sin la adición de metales traza, vitaminas y algún agente quelante. Como medio control de éstos experimentos se utilizó el medio químico medio “f/2” de Guillard y Ryther

(1975). En éste trabajo no se encontró diferencia significativa en la concentración celular producidas en el medio experimental con fertilizantes agrícolas y el medio control. El medio de cultivo formulado con fertilizantes o medio alternativo resultó ser cien veces más económico en costo monetario que el medio control.

Estudios acerca de la fisiología de microalgas, muestran que existe una fuerte preferencia por la asimilación de formas reducidas como el amoníaco, el cual inhibe la producción de nitrato reductasa, con lo cual tiene un menor costo energético al utilizar preferencialmente el amonio al nitrato (Wheeler, 1983). También se ha visto que el modelo más aceptado que describe las rutas de incorporación de amonio al interior de la célula, es a través de la utilización de la glutamina sintetasa, quien cataliza el  $\text{NH}_4^+$  a glutamato para producir prolina. Un grupo amino es transferido a oxiglutamato para producir dos moléculas de glutamato. Una molécula es utilizada para la regeneración del ciclo de Krebs para la producción de aminoácidos vía reacciones de transaminación (South y Whittick, 1987).

Uno de los pocos antecedentes de mantenimiento de cultivos semicontinuos de microalgas es el realizado por López-Elías y Voltolina (1993), quienes mantuvieron varias especies de microalgas utilizando fertilizantes agrícolas como medios de cultivo. Estos autores encontraron que algunas especies de microalgas producen la misma calidad de biomasa, tanto con medios de cultivo tradicionales como con el medio de cultivo formulado con base en fertilizantes agrícolas. Recientemente Simental-Trinidad, (1999) y Gracida-Valdepeña, (1999) al utilizar medios no convencionales a partir de



fertilizantes líquidos como aporte de macronutrientes, encontraron que para tres especies de diatomeas bentónicas y tres planctónicas resultaron cantidades de biomasa y composición química similar a la obtenida con el medio control (medio "f/2" de Guillard y Ryther, 1975).

Se ha visto a través de estudios de nutrición para larvas de camarón, que los ácidos grasos eicosapentanoico (20:5 n-3) y decosaheptanoico (22:6 n-3) son los que ofrecen mejores índices de crecimiento y mayor frecuencia de mudas, por lo que su cantidad en las microalgas utilizadas como alimento resulta de gran importancia para las larvas de camarón (Soler-Jaramillo, 1996). Trabajos más recientes, han proporcionado resultados que indican que la presencia de un buen nivel de estos ácidos grasos en las microalgas utilizadas como alimento para larvas de camarón, permiten obtener mejores tasas de crecimiento y supervivencia (Soler-Jaramillo, 1996). Los requerimientos de ácidos grasos de las larvas de camarón varían de acuerdo al peso del organismo, debiendo mantener un 0.4% de 20:5 n-3 al igual que del 22:6 n-3, en el alimento que se suministra a las larvas (Akiyama *et al*, 1991).

Por su parte Clarke y Wickins (1980) en un estudio con juveniles de *Penaeus merguensis*, encontraron que los peneídos son incapaces de satisfacer todos sus requerimientos de ácidos grasos de 20 y 22 carbonos, a partir de precursores dietéticos como 18:2 n-6 y 18:3 n-3, respectivamente, aún por síntesis de novo. Por lo anterior los ácidos grasos 20:5 n-3 y 22: n-3 deberían estar presentes en la dieta de peneídos, con el fin de mantener una composición de ácidos grasos normal en los peneídos cultivados.

Debido a que el aporte de ácidos grasos para larvas de camarón en cultivo, proviene del contenido que sea provisto a través de las microalgas suministradas como alimento. Actualmente para la producción masiva de microalgas en la acuicultura, se busca utilizar medios de cultivo más económicos, con el propósito de disminuir los costos económicos de producción.

Respecto a la los ácidos grasos que conforman los lípidos, los de la serie 20:5 n-3 y el 22:6 n-3 son considerados como esenciales, por la incapacidad del camarón de sintetizar estos compuestos, siendo necesarios para un desarrollo normal y una buena supervivencia (Akiyama, 1992).

Los ácidos grasos, al igual que los aminoácidos, son de suma importancia en la nutrición de larvas de camarón. Los requerimientos de proteínas en la dieta de camarones peneidos es una de las consideraciones más importantes, ya que la deficiencia de proteínas es uno de los mayores limitantes para su crecimiento. Adicionalmente, el contenido de proteínas del alimento puede afectar la calidad del agua vía excreción de nitrógeno producto del alimento (Kureshy y Davis, 2002)

Respecto a los requerimientos de proteínas y específicamente del tipo de aminoácidos en estadios larvales de *L. vannamei* se sabe poco, no obstante algunos autores han determinado las cantidades de proteínas totales requeridas en peneídos con respecto a la especie y el peso del organismo. Colvin y Brand (1977) recomiendan un 30% de proteínas en la dieta de *L. vannamei* de peso de 0.03 g (peso húmedo). En cuanto al

perfil de aminoácidos se ha definido que la lisina, metionina y cisteína son considerados los más importantes en la nutrición de camarones (Kanasawa, 1989; Chuang, 1990).

Los requerimientos proteícos de los organismos pueden cambiar con respecto a los factores bióticos (especie, estado fisiológico y tamaño) y las características de la dieta (calidad de la proteína, relación energía: proteína) (Nasir y Allen, 2002). Los factores abióticos como la temperatura y salinidad pueden afectar los requerimientos de proteínas de los camarones (Guillaume, 1997; Nasir y Allen, 2001). El contenido de las proteínas en las dietas de peneidos es una de las más importantes consideraciones ya que puede llegar a ser un limitante en el crecimiento y es uno de componentes más costosos en la dieta de alimentos preparados de camarón (Nasir y Allen, 2001).

Los costos económicos asociados al cultivo de microalgas representan un alto porcentaje del costo económico de la producción de larvas de camarón. Del total del gasto de producción de microalgas, el costo por el uso del medio de cultivo ("f/2") representa alrededor del 15%, y el resto del gasto va dirigido a energía eléctrica y mano de obra (Pacheco-Vega, 2001). No obstante que el medio de cultivo representa un costo reducido, este gasto puede ser disminuido hasta 7 veces mediante el uso de fertilizantes agrícolas como aporte de nutrientes (Simental-Trinidad, 1999). Por lo anteriormente es necesario disminuir estos gastos económicos mediante el uso de nuevos medios de cultivo que sustituyan al medio "f/2" que tradicionalmente es utilizado para el cultivo de microalgas en granjas de producción acuícola. Se requiere además que las microalgas producidas tengan un perfil de ácidos grasos adecuado, para satisfacer los

requerimientos nutricios para los estadios larvales de *L. vannamei*. Con lo antes descrito, se plantea la hipótesis de que se pueden obtener larvas *Litopenaeus vannamei* con buena calidad al ser alimentadas con microalgas cultivadas con un medio formulado con fertilizantes agrícolas, con una composición bioquímica, perfiles de ácidos grasos y aminoácidos similares al obtenido en el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975).

## **I.5. Objetivos**

### **I.5.1. Objetivo general**

Evaluar la posibilidad de usar la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en un medio no convencional formulado con fertilizantes agrícolas como alimento vivo para larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

### **I.5.2. Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de los metales traza y de las vitaminas contenidos en un medio de cultivo formulado con fertilizantes agrícolas para el mantenimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri*.
  
- Evaluar la composición bioquímica de *Chaetoceros muelleri* cultivada en un medio de cultivo formulado con fertilizantes agrícolas y compararla con respecto a los cultivos obtenidos en el medio “f/2”. Evaluar la calidad de las larvas de camarón (*Litopenaeus vannamei*) alimentadas con microalgas cultivadas en un medio de cultivo formulado con fertilizantes agrícolas y los producidos en el medio “f/2”.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

La metodología seguida en la realización del trabajo experimental de esta tesis y que abarca un cultivo algal, y la alimentación de larvas de camarón, se resume en la figura 1.

### **II. 1. Descripción de la cepa utilizada**

La microalga *Chaetoceros muelleri* usada en esta tesis fue obtenida de la Colección de Cepas de Microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Esta cepa fue aislada por el Instituto Oceánico de Hawai, Estados Unidos, en 1981 y ha sido mantenida desde entonces en el medio “f/2” en el CICESE. La cepa se mantuvo en tubos de ensayo con 10 ml de medio a una temperatura de 13 °C y una iluminación continua de luz blanca con intensidad de luz de 100  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### **II. 2. Calidad de agua**

Para cultivar la microalga *C. muelleri* se utilizó agua de mar proveniente del sistema semicerrado que abastece al laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura, Biotecnología Marina del CICESE. Esta agua tuvo un proceso de sedimentación, fue pasada por una serie de filtros rápidos de arena para partículas de 40, 20 y 5  $\mu\text{m}$  y se irradió con luz ultravioleta. Posteriormente el agua fue irradiada nuevamente con luz ultravioleta y pasada por una serie de filtros de algodón de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ . Además, el agua de mar utilizada en volúmenes de hasta 2800 ml fue esterilizada en una autoclave a 121 °C y a una presión de 1.02  $\text{kg cm}^{-2}$  por un periodo de 20 minutos. Para volúmenes de 18 litros se utilizó el procedimiento de desinfección recomendado

por Preuder y Bolton (1978), el cual consiste en la adición de 8 ml de cloro comercial (6%) por cada litro de agua de mar. Para neutralizar el cloro se utilizó una concentración de 0.38 g de tiosulfato de sodio por litro de agua.

### **II. 3. Selección y preparación del medio de cultivo**

Se realizó un ensayo previo de selección del medio de cultivo experimental a escala de matraz Erlenmeyer de 250 ml. Posteriormente se hizo una nueva selección a escala de garrafón de 18 litros. Para la selección del medio de cultivo se consideraron distintas formas químicas de nitrógeno, fósforo y sílice obtenidas en base a fertilizantes agrícolas de uso comercial en la localidad de Ensenada, Baja California, tomando en consideración los resultados y recomendaciones realizadas por Gracida-Valdepeña (1999) y Simental-Trinidad (1999). Al medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa) se le realizaron algunas modificaciones, consistiendo en la adición (+) y substracción (-) de vitaminas (V) y metales traza (Mt). De este modo se inicio el proceso con cuatro variedades de medios de cultivo agrícolas: A (Fa + V + Mt), B (Fa + V - Mt), C (Fa - V +Mt), D (Fa - V - Mt). Como medio de cultivo control ("E") de estos experimentos, se utilizó el medio "f/2" descrito por Guillard y Ryther (1975) (tabla I). Debido a los resultados obtenidos en esta fase, se decidió usar únicamente el medio de cultivo formulado por Simental-Trinidad (1999) y Gracida-Valdepeña (1999) con la adición de metales traza y vitaminas, durante las fases subsecuentes de trabajo experimental.

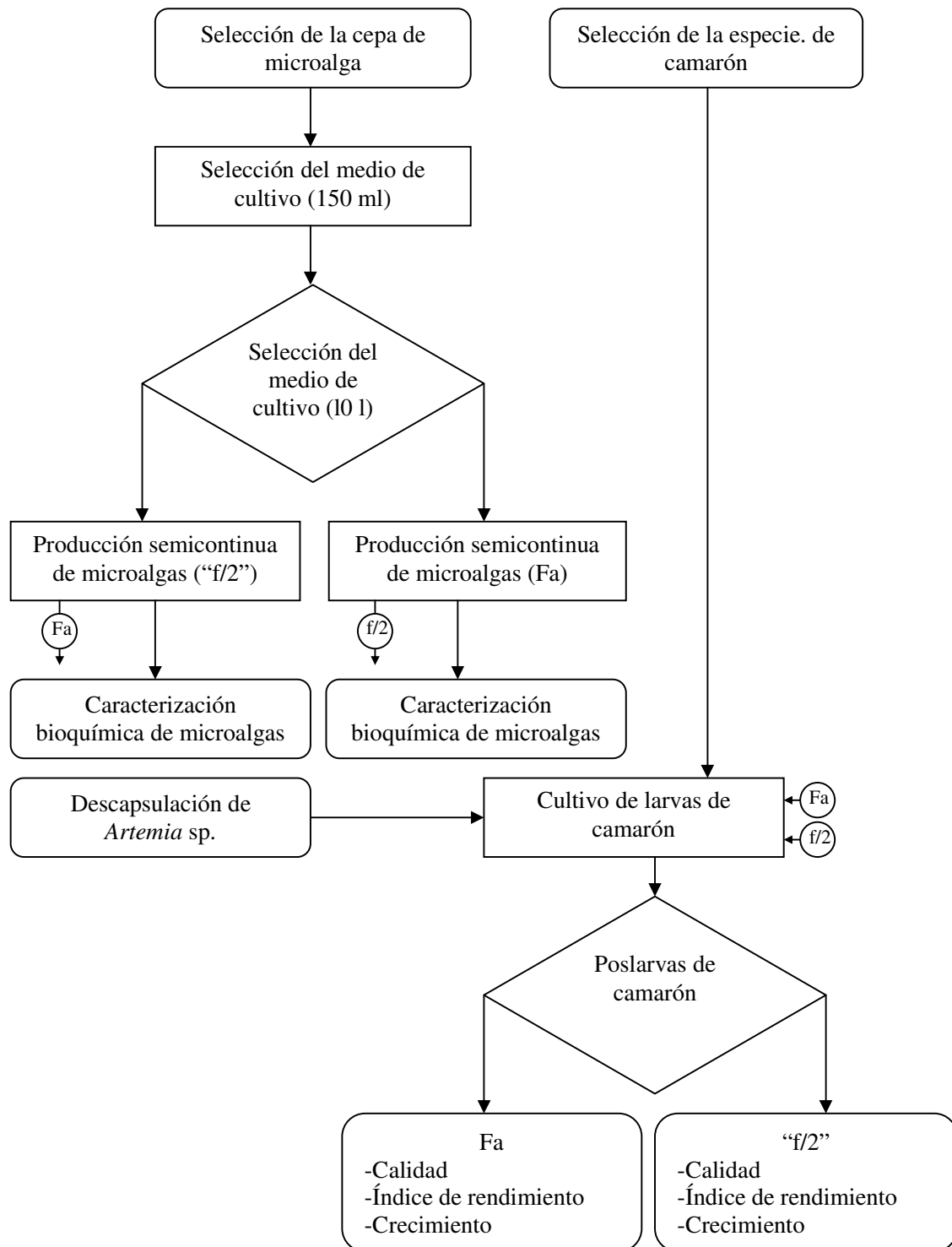


Figura 1. Diagrama de flujo para el cultivo de microalgas con fertilizantes agrícolas (Fa) y el medio químico ("f/2") suministradas como alimento a larvas de camarón.



Tabla I. Composición química de los distintos medios de cultivo expresados en micromoles: Medios de cultivo formulados con fertilizantes agrícolas A (fertilizantes agrícolas + vitaminas + metales traza), B (fertilizantes agrícolas + vitaminas - metales traza), C (fertilizantes agrícolas - vitaminas + metales traza), D (fertilizantes agrícolas - vitaminas - metales traza) y el medio químico (E) utilizado como control.

**(A)**

<b>Componente</b>	<b>Formula</b>	<b>Peso (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>μmoles l<sup>-1</sup></b>
Nitrato de sodio:	NaNO <sub>3</sub>	77.16	882.350
Nitrato	NO <sub>3</sub> 7.8 %		
Amonio	NH <sub>4</sub> 7.8 %		
Urea	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> 16.4 %		
Fósforo	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5.00	36.300
Sílice	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	10.00	107.000
EDTA férrico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> NaFeO <sub>8</sub>	5.00	11.700
Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9.80	0.039
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22.00	0.076
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10.00	0.042
Cloruro manganoso	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180.00	0.900
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6.30	0.026
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6.30	0.026
Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0.05 x 10 <sup>-8</sup>	2 x 10 <sup>-7</sup>
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> P	0.05 x 10 <sup>-8</sup>	4.42 x 10 <sup>-8</sup>
Tiamina clorhídrica (B <sub>1</sub> )	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS	0.01	0.033

**(B)**

<b>Componente</b>	<b>Formula</b>	<b>Peso (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>μmoles l<sup>-1</sup></b>
Nitrato de sodio:	NaNO <sub>3</sub>	77.16	882.350
Nitrato	NO <sub>3</sub> 7.8 %		
Amonio	NH <sub>4</sub> 7.8 %		
Urea	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> 16.4 %		
Fósforo	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5.00	36.300
Sílice	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	10.00	107.000
Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0.05 x 10 <sup>-8</sup>	2 x 10 <sup>-7</sup>
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> P	0.05 x 10 <sup>-8</sup>	4.42 x 10 <sup>-8</sup>
Tiamina clorhídrica (B <sub>1</sub> )	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS	0.01	0.033

## (C)

Componente	Formula	Peso (g l <sup>-1</sup> )	μmoles l <sup>-1</sup>
Nitrato de sodio:	NaNO <sub>3</sub>	77.16	882.350
Nitrato	NO <sub>3</sub> 7.8 %		
Amonio	NH <sub>4</sub> 7.8 %		
Urea	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> 16.4 %		
Fósforo	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5.00	36.300
Sílice	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	10.00	107.000
EDTA férrico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> NaFeO <sub>8</sub>	5.00	11.700
Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9.80	0.039
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22.00	0.076
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10.00	0.042
Cloruro manganoso	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180.00	0.900

## (D)

Componente	Formula	Peso (g l <sup>-1</sup> )	μmoles l <sup>-1</sup>
Nitrato de sodio:	NaNO <sub>3</sub>	77.16	882.35
Nitrato	NO <sub>3</sub> 7.8 %		
Amonio	NH <sub>4</sub> 7.8 %		
Urea	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> 16.4 %		
Fósforo	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5.00	36.30
Sílice	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	10.00	107.00

## (E (“f/2”))

Componente	Formula	Peso (g l <sup>-1</sup> )	μmoles l <sup>-1</sup>
Nitrato de sodio	NaNO <sub>3</sub>	75.00	883.00
Fosfato de sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5.00	36.30
Metasilicato de sodio	NaSiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	30.00	107.00
EDTA férrico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> NaFeO <sub>8</sub>	5.00	11.70
Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9.80	0.039
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22.00	0.076
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10.00	0.042
Cloruro manganoso	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180.00	0.90
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6.30	0.026
Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0.05 x 10 <sup>-8</sup>	1.336 x 10 <sup>-6</sup>
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> P	0.05 x 10 <sup>-8</sup>	0.393x 10 <sup>-6</sup>
Tiamina clorhídrica (B <sub>1</sub> )	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS	0.01	0.18726

#### **II. 4. Acondicionamiento de la cepa**

La microalga *Chaetoceros muelleri* fue acondicionada al medio agrícola y al medio “f/2” por un periodo de 8 días, con el propósito de que durante los ensayos las células no tuviesen reservas de nutrientes mayores (nitratos, fosfatos y silicatos) que pudiesen interferir en el crecimiento de las microalgas y en la selección del medio de cultivo. El acondicionamiento de los cultivos se realizó en matraces de 250 ml utilizando 125 ml de cada tipo de medio de cultivo descrito en la tabla I.

Para evaluar el crecimiento de *C. muelleri* en cada situación experimental, se realizaron diariamente conteos por triplicado por cada repetición en un hematocitómetro Neubauer y se compararon las curvas de crecimiento durante la fase exponencial para cada caso. Con los datos de los conteos diarios se evaluó la tasa de crecimiento de *C. muelleri* mantenido en cada uno de los medios de cultivo usados. Para estos cálculos se utilizó la fórmula descrita por Fogg y Thake (1987). El medio de cultivo experimental seleccionado para las siguientes fases del trabajo de esta tesis fue el medio “D”, el cual contenía nutrientes mayores en ausencia de metales traza y vitaminas.

#### **II. 5. Cultivos mantenidos a escala de garrafón**

Para comprobar los resultados obtenidos en la caracterización del crecimiento de *Chaetoceros muelleri* mantenidos en matraz Erlenmeyer con los distintos medios de cultivo (A,B,C,D y E). Los cultivos en matraz de 250 ml se escalaron y transvasaron a matraz de 2800 ml y posteriormente a un volumen de 10 litros, para lo cual se utilizaron garrafones de vidrio de 18 litros de capacidad. Los cultivos se inocularon hasta llegar a

una concentración celular de 26 000 células ml<sup>-1</sup> manteniendo cada tratamiento con dos repeticiones. Se realizaron diariamente conteos celulares en una cámara Neubauer y medición de los valores de pH.

A partir de los conteos de la densidad en los cultivos estáticos de *C. muelleri*, se determinó la tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) mediante el uso de la ecuación 2.

$$\mu = \frac{\text{Log}_2 \cdot N - \text{Log}_2 \cdot N_0}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

en donde:

$\mu$ = la tasa de crecimiento poblacional

$N$ = número de células en el tiempo  $t_2$

$N_0$ = número de células al tiempo  $t_1$

Para el cálculo de la tasa de crecimiento se utilizó la transformación del número de células a Log con base dos debido a que la forma dominante de reproducción de las células en cultivo es por división binaria (Fogg y Thake, 1987).

Una vez seleccionado el medio de cultivo con mayor crecimiento de la microalga y una vez que los cultivos entraron en la fase de lento crecimiento, se iniciaron diluciones diarias del 30% del medio seleccionado y el medio “f/2”. Una vez estabilizados los cultivos en una misma fase de crecimiento, se inició la colecta de muestras para la posterior realización de los análisis bioquímicos.

## II. 6. Comparación de cambios morfológicos

Con el propósito de evaluar posibles diferencias en el tamaño de *Chaetoceros muelleri*, se tomaron muestras al sexto día de cultivo (a escala de garrafón) del tratamiento con

mayor crecimiento y del medio “f/2”. Las dimensiones de lo largo y ancho de las células se determinaron con ayuda de una reglilla y una tabla de calibración para los distintos oculares en un microscopio compuesto marca “Olympus”.

## **II. 7. Evaluación bioquímica**

Del volumen cosechado en los cultivos semicontínuos, en tres fechas de muestreo, y en días alternos, se tomó una submuestra para analizar la composición bioquímica de la microalga. Se analizó para cada caso y por triplicado el peso seco y el contenido de las cenizas de la biomasa cosechada. Para lo anterior una submuestra con volumen de cultivo de 100 ml se suspendió en filtros de fibra de vidrio marca “Osmonics” de 4.7 cm de diámetro. Para el análisis de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos, se utilizaron filtros "Osmonics" de 2.4 cm de diámetro y para cada caso se filtró un volumen de 20 ml.

Los filtros de fibra de vidrio antes de ser utilizados fueron enjuagados con agua destilada e incinerados durante 8 horas a 480 °C en una mufla marca Lindberg-Blue.

### **II. 7. 1. *Peso seco y contenido de cenizas***

La determinación del peso seco y cenizas se realizó por triplicado, siguiendo la metodología descrita por Sorokin (1973). El peso seco se obtuvo introduciendo las muestras filtradas de los cultivos en una mufla a una temperatura de 60°C por 24 horas, posteriormente se registró el peso seco constante utilizando una balanza marca METTLER modelo AE 240. Para la determinación de cenizas, se introdujeron las

muestras a la mufla a 480°C por 8 horas, después se registró el peso y por diferencia se obtuvo el contenido de cenizas.

### **II. 7. 2. Proteínas**

Las proteínas contenidas en la microalga *Chaetoceros muelleri* fueron evaluadas por el método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Malara y Charra (1972), el cual se basa en la determinación espectrofotométrica de la intensidad de color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteau (ácido fosfomolibdotúngstico, FMT), después de un tratamiento con solución alcalina de cobre. Para su extracción se utilizó NaOH 0.1 N a una temperatura de 100°C por un periodo de 15 minutos. Para construir una curva de calibración se utilizó suero de albúmina de bovino al 98% como solución estándar.

### **II. 7. 3. Carbohidratos**

El contenido de carbohidratos se determinó con el método de fenol-ácido sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), usando glucosa (99%) como patrón, previa extracción según el método de White (1987).

### **II. 7. 4. Lípidos**

Los lípidos totales se cuantificaron siguiendo la metodología descrita por Pande *et al.*, (1963), agregando dicromato-ácido al 2 %. La extracción de lípidos se efectuó por medio de una mezcla de cloroformo, metanol y agua, siguiendo la técnica descrita por Bligh y Dyer (1959) y modificada por Chiaverini (1972). Se utilizó tripalmitina (99%) para la realización de la curva de calibración.

### **II. 7. 5. Caracterización de aminoácidos**

Los aminoácidos fueron extraídos por un proceso de hidrólisis y fueron analizados cuantitativamente según la metodología recomendada por el fabricante del autoanalizador marca Beckman modelo 118 CL. Las muestras fueron degradadas y se analizó el porcentaje de nitrógeno proteico por el método Kjeldahl.

### **II. 7. 6. Caracterización de ácidos grasos**

Los ácidos grasos fueron extraídos utilizando una mezcla cloroformo-metanol-agua (2:4:1). La identificación de los ácidos grasos se realizó por medio de un cromatógrafo de gases, para lo cual se utilizó la metodología descrita por el fabricante del equipo marca Shimadzu 9A con una columna OC1-3.

### **II. 8. Tratamiento estadístico en microalgas**

Las posibles diferencias en el crecimiento de los cultivos de *Chaetoceros muelleri* mantenidos en el medio no convencional con fertilizantes agrícolas y con el medio químico control a escala de matraz Erlenmeyer y en garrafón, fueron evaluadas para cada tipo de recipiente mediante un análisis de covarianza (ANCOVA). El análisis de covarianza utiliza un modelo de regresión lineal múltiple para comparar las pendientes de las líneas de regresión como un estimador de la velocidad de crecimiento. El intercepto de las líneas de regresión, en éste caso indicaran el grado de similitud entre la cantidad de inóculo utilizada para iniciar los cultivos. Para éste análisis se utilizaron las concentraciones celulares obtenidas durante la fase exponencial con el medio de cultivo experimental y el medio control (días: 0-4 para matraz Erlenmeyer, 3-6 para garrafón).

Previo a la realización de éste análisis estadístico se tomaron en consideración las hipótesis que sustentan esta prueba: la normalidad, linealidad de los residuos, homogeneidad de varianzas e independencia de los datos (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984) (anexo).

Para comprobar la estabilidad de los cultivos semicontínuos, se utilizó el método de mínimos cuadrados como un modelo de linealización y comparación de las pendientes de las rectas obtenidas ( $\beta=0$ ) (Zar, 1984; Mendenhall *et al*, 2001) (Anexo). Las rectas se construyeron con los valores de la concentración de células de *C. muelleri* obtenidas por día para cada tipo de medio de cultivo (Fa y “f/2”) antes de realizar la dilución diaria (30%). Para este análisis estadístico se tomaron en consideración las premisas que fundamentan dicha prueba y que son: normalidad de los residuos, linealidad y homogeneidad de varianzas.

Se aplicó un análisis de varianza de dos vías para determinar las posibles diferencias en la composición bioquímica de las microalgas cultivadas en el medio con fertilizantes agrícolas y en el medio control. Este análisis estadístico se utilizó para los valores de composición de materia orgánica, cenizas, proteínas, lípidos y carbohidratos para los tres diferentes días de muestreo (anexo). Previo a la utilización de la prueba estadística se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan éste análisis como es la normalidad y homogeneidad de varianzas. Cuando se evaluaron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba *a posteriori* de comparaciones múltiples de “Student-Newman-Keuls” (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984) (anexo).



Los valores obtenidos del perfil de aminoácidos y ácidos grasos para las microalgas cultivadas en el medio de cultivo con fertilizantes agrícolas y con el medio control fueron tratados de la misma forma que los datos de composición bioquímica (materia orgánica, cenizas, proteínas, lípidos y carbohidratos). Para conocer las posibles diferencias en los valores de los ácidos grasos eicosapentaenóico y docosahexaenóico entre ambos tratamientos, los datos se analizaron mediante una prueba “t-Student” (Anexo). En cada uno de los casos antes mencionados se tomó en consideración la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984). Los análisis estadísticos fueron realizados con un alfa de 0.05 y mediante el paquete estadístico STATISTICA para Windows.

## **II. 9. Obtención de nauplios**

Los nauplios utilizados fueron obtenidos de un desove realizado durante el mes de Febrero de 2003 en el laboratorio de producción de poslarvas de camarón blanco, Acuacultores de La Paz, S.A. de C.V. El lote de larvas utilizado fue de 15,000 nauplios de camarón blanco del pacífico (*L. vannamei*). Los organismos se transportaron en bolsas de polietileno con oxígeno a saturación, la temperatura de recepción fue de 25°C, y el transporte se realizó en una hielera de poliestireno de 5 litros de capacidad. El traslado de los nauplios fue vía aérea desde La Paz, Baja California Sur a Tijuana, Baja California. Posteriormente, los organismos fueron llevados al laboratorio de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada B. C.

## **II. 10. Aclimatación de nauplios**

Los nauplios se transfirieron a una cubeta plástica conteniendo agua de mar a la misma temperatura a la cual fueron recibidos (25°C). Se les incrementó la temperatura gradualmente, para igualar los parámetros de siembra: 27°C, amonio <0.1, pH 7.8-8.4, y salinidad 35‰. Este incremento se realizó por un periodo de 24 horas. Posteriormente fueron transferidos a cubetas de 18 litros de capacidad mediante el método volumétrico, utilizando varias alícuotas de 100 ml de manera aleatoria hasta obtener la densidad de siembra de 100 nauplios/litro.

## **II. 11. Mantenimiento de larvas de camarón**

Las evaluaciones diarias de la población de larvas de camarón y la caracterización de los estadios de desarrollo alcanzados fueron realizadas mediante la colecta aleatoria de 10 larvas y su posterior observación en un microscopio estereoscópico marca ZEISS, Stemi 2000-C. El mantenimiento de las larvas de camarón se realizó en cubetas plásticas de 18 litros, con un incremento de la alimentación de células hasta protozoa III, seguida de un cambio de dieta paulatina hasta eliminar las microalgas en su totalidad (tabla II). Los quistes de *Artemia* utilizada para la alimentación de las larvas de camarón fueron eclosionadas por medio de un proceso de eliminación del corion (oxidación) mediante el uso de Hipoclorito Sódico al 6%. La calidad de la *Artemia* fue "Premium" comercializada por el grupo "INVE", los quistes fueron originarios del Gran Lago Salado, procesados y empacados en Grantsville, Utah Estados Unidos de Norte América. Una vez eclosionados los nauplios de *Artemia sp.*, se suministraron a las larvas de

camarón y fueron almacenados a una temperatura de 2-3°C para suministrarse al día siguiente. Los nauplios de *Artemia* no fueron almacenados por más de 48 horas en refrigeración.

Tabla II. Secuencia de alimentación utilizada para las larvas de camarón (*Litopenaeus vannamei*) en los sistemas de cultivo.

Día	Estadio	<i>Chaetoceros muelleri</i> (cel ml <sup>-1</sup> )	<i>Artemia</i> ml <sup>-1</sup>
0	R – N	-	-
1	N	-	-
2	N <sub>6</sub> – Z <sub>1</sub>	70000	-
3	Z <sub>1</sub>	100000	-
4	Z <sub>1</sub> – Z <sub>2</sub>	100000	-
5	Z <sub>2</sub>	150000	-
6	Z <sub>3</sub>	150000	-
7	Z <sub>3</sub> - Z <sub>4</sub>	100000	1
8	M <sub>1</sub>	100000	1
9	M <sub>2</sub>	70000	3
10	M <sub>3</sub>	70000	6
11	M <sub>3</sub> – PL	70000	6
12	PL <sub>1</sub>	70000	6
13	PL <sub>2</sub>	-	6

R – N: Reproductores y nauplios

N : Nauplio

Z : Protozoa

M: Mysis

PL: Poslarvas

-: No administrado

## II. 12. Diseño de las unidades de cultivo

Los nauplios de camarón (*L. vannamei*) se distribuyeron a una densidad de 100 nauplios

l<sup>-1</sup> por unidad experimental, con un total de 5 repeticiones por tratamiento.

El sistema experimental (figura 2) consistió en una estructura de madera para soportar las 10 unidades experimentales y dos cubetas con agua filtrada para recambios. Las unidades experimentales se mantuvieron en baño maría, para lo cual se utilizaron dos estanques de fibra de vidrio, en los cuales se distribuyeron las unidades experimentales en forma aleatoria, las unidades experimentales consistieron en cubetas plásticas de 18 litros de capacidad provistas con una tapa de acrílico. La iluminación (provista mediante el uso de dos lámparas fluorescentes de 74 Watts cada una) se mantuvo constante a una intensidad de  $28-33 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Para mantener la temperatura adecuada de  $27 - 29^{\circ}\text{C}$  se utilizó un calentador sumergible, controlado por un sistema digital de temperatura marca “Aqua Logic Inc,” con una precisión de  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . El calentador fue colocado en un reservorio plástico con un volumen de agua de 80 litros. El reservorio contenía agua a la temperatura experimental que abastecía y mantenía en circulación por medio de bombeo el agua del baño maría.

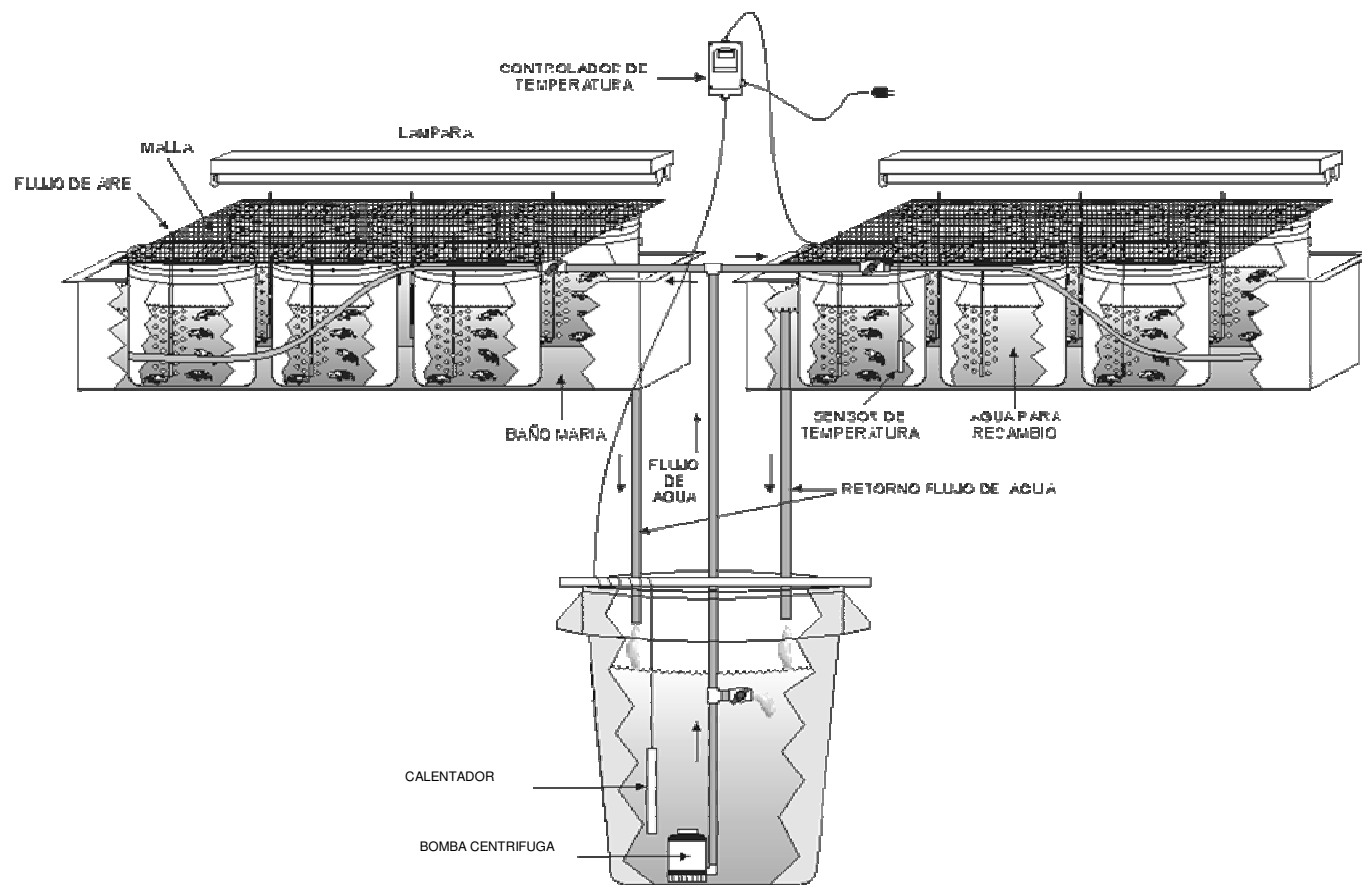


Figura 2. Esquema del diseño experimental utilizado en el mantenimiento de larvas de *Litopenaeus vannamei*.

## II. 13. Control de factores abióticos

La iluminación de los cultivos se mantuvo constante en las diferentes unidades experimentales mediante la utilización de una malla plástica. La salinidad del agua de cada una de las unidades experimentales se mantuvo entre 34 - 35‰. Para su registro se utilizó un refractómetro. El pH se mantuvo en un rango de 7.3 – 8.5, y para su registro se utilizó un potenciómetro de campo marca Corning modelo 610 A. El oxígeno disuelto en los cultivos se mantuvo entre los 6.20-8.40 mg l<sup>-1</sup>. Se tomaron lecturas de oxígeno en dos diferentes horas del día (13:00 y 18:00), para lo que se utilizó un oxímetro marca YSI, modelo 57. El amoníaco fue medido diariamente con un Espectrofotómetro Hach de la serie 2000, evitando tener concentraciones superiores de 0.1 mg l<sup>-1</sup>. Para los recambios de agua de cada unidad experimental se utilizó agua marina filtrada por una serie de filtros de algodón e irradiada por luz ultravioleta. Los recambios se iniciaron con un 10% a partir del estadio de protozoa III, incrementando a un 15% a partir de la etapa mysis III. La aireación se mantuvo moderada mediante el uso de difusores de sílica colocados en el fondo de cada unidad experimental.

## II. 14. Evaluación de la calidad de las larvas

Una vez concluido el estadio de poslarva I, se evaluó la condición de las larvas usando varios criterios.

- **II. 15.1. Estrés:** Para conocer la calidad de las poslarvas de camarón, se siguió la metodología descrita por Villalon, (1991), con la variante de que no se llegó a la salinidad y temperatura recomendada por Villalon (20‰ y 10°C) debido al

estadio de las larvas. Se redujo la salinidad y temperatura de los estanques en forma simultánea a 25‰ y 21°C, en un lapso de 1 hora y se mantuvieron en éstas condiciones por un periodo de 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se evaluó la supervivencia obtenida y categorizando de acuerdo a las recomendaciones de Villalon (1991) y Cliffor (1992):

<b>Supervivencia</b>	<b>Calidad</b>
80 – 100 %	Alta calidad
60 – 79 %	Aceptable
< 60 %	Baja calidad (rechazo)

- **II. 14.2. Supervivencia:** Es una estimación de cambio en el número de organismos con respecto al tiempo por acuario (Brock, 1992; Ochoa, 2001). La supervivencia se calculó al final del experimento mediante la evaluación del número de organismos de la población y el cálculo de su representatividad en porcentaje con relación al número inicial de larvas sembradas.
- **II. 14.3. Tasa de crecimiento (%):** la tasa de longitud del cefalotórax se calculó como un indicador de crecimiento de las larvas de acuerdo a la ecuación (3) (Guary *et al.*, 1976.; Díaz-Iglesia *et al.*, 1990):

$$Lcr = \frac{(Lc_{fin} - Lc_{ini})}{Lc_{ini}} \times 100 \quad (3)$$

En donde:  $Lcr$  = tasa de crecimiento  
 $Lc_{fin}$  = longitud promedio del cefalotórax final  
 $Lc_{ini}$  = longitud promedio del cefalotórax inicial

- **II. 14.4. Índice de rendimiento:** el índice de rendimiento o incremento relativo de la biomasa según el lapso transcurrido, se calculo de acuerdo a la ecuación 4 (Díaz-Iglesia *et al.*, 1990):

$$R = \frac{(P_{fn} \times n) - (P_{ini} \times n)}{(P_{fn} \times n)} \times 100 \times 1/T \quad (4)$$

En donde: R = rendimiento  
 T = tiempo transcurrido en días  
 n = número de supervivientes  
 P<sub>fn</sub> = peso final promedio  
 P<sub>ini</sub> = peso inicial promedio

## II. 15. Tratamiento estadístico en larvas de camarón

Para determinar posibles diferencias entre la calidad, supervivencias, incremento en masa y talla para ambos medios de cultivo (Agrícola y “f/2”) se aplicó una prueba “t-Student”, basada en la comparación de las medias entre tratamientos para cada una de las variables (anexo). Para los datos anteriores se consideró la normalidad y la homogeneidad de varianzas (Bartlett) para cada caso. Los análisis estadísticos fueron realizados con un alfa de 0.05 y mediante el paquete estadístico STATISTICA para Windows.



### III. RESULTADOS

#### III. 1. Selección del medio de cultivo

Los cultivos de *Chaetoceros muelleri* fueron mantenidos bajo condiciones ambientales de laboratorio controladas: la temperatura promedio fue de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  e intensidad lumínica de  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , el pH no se evaluó durante el transcurso del experimento en escala de matraz Erlenmeyer.

Los valores promedio de las concentraciones de células de *C. muelleri* cultivada en matraces Erlenmeyer de 250 ml en los diferentes medios de cultivo se muestran en la figura 3, en donde se observa que para todos los casos los cultivos no presentaron una fase de acondicionamiento. Por el contrario, se encuentra una clara fase exponencial desde el inicio de los cultivos, misma que tuvo una duración de 4 días, presentando una fase de declinamiento del crecimiento al quinto día y una ligera recuperación en el día 6.

Los valores máximos de las concentraciones celulares se presentaron en diferentes días. El medio A (Fertilizante agrícola + metales traza + vitaminas) presentó la mayor biomasa el día 4, el medio B (Fertilizante agrícola + metales traza – vitaminas) la alcanzó el día 5 y los medios de cultivo C, D y E alcanzaron su mayor biomasa el día 6. Al comparar los datos del crecimiento de *C. muelleri* mantenidas en los diferentes medios de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial. La prueba *a posteriori* indicó que no existen diferencias entre los medios A, B, C y D, mientras que el medio “E” tuvo diferencias significativas con respecto a todos los demás ( $\alpha=0.05$ ). Se encontró

diferencia en las tasas de crecimiento en el día 1 y en el día 4 de los diferentes medios de cultivo.

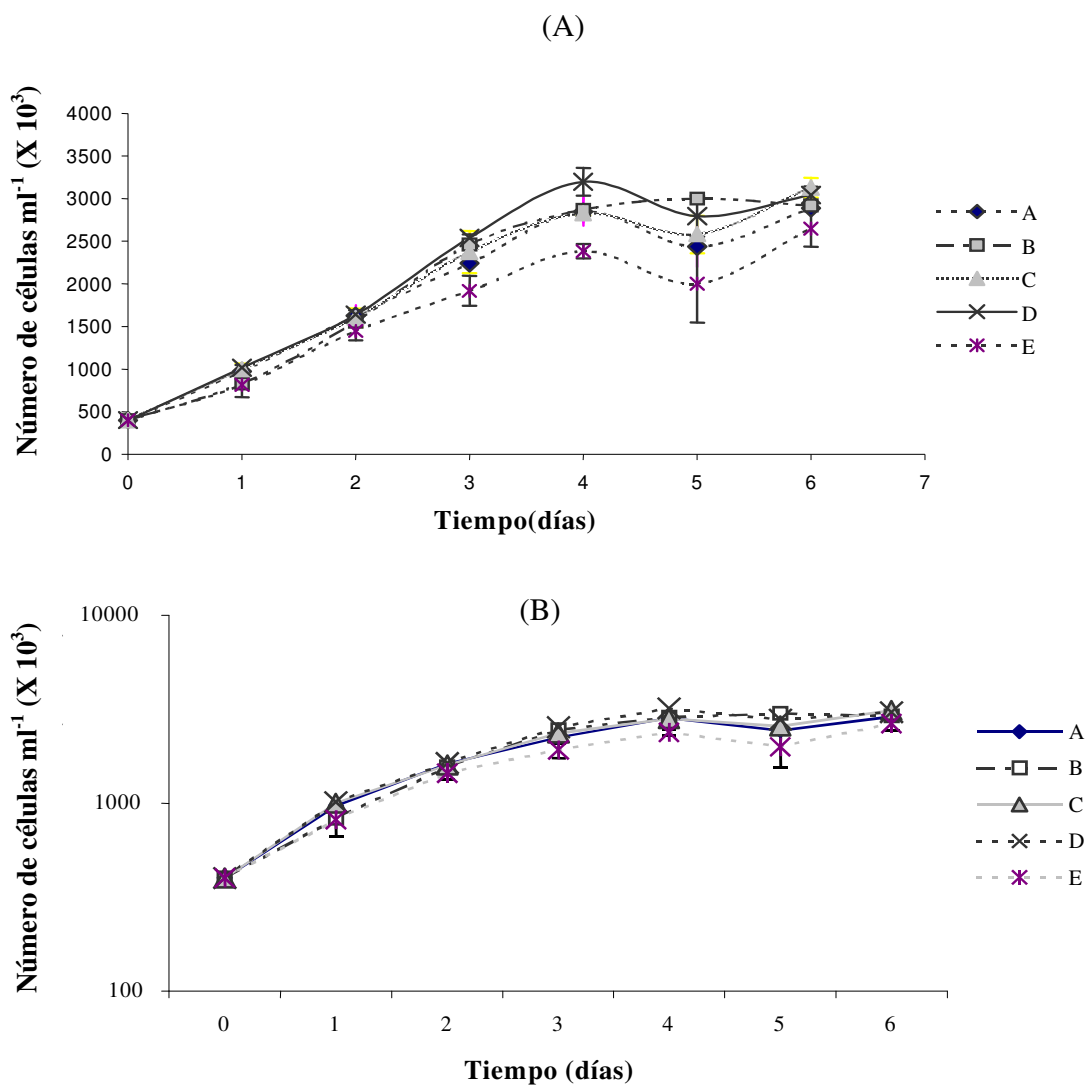


Figura 3. Curva promedio del crecimiento poblacional para *Chaetoceros muelleri* mantenido en cultivos en matraz Erlenmeyer con un medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa) considerando la adición (+) y sustracción (-) de vitaminas (V) y metales traza (Mt). A= Fa + Mt + V, B= Fa - Mt + V, C= Fa - Mt + V, D= Fa - Mt - V y E= "f/2". Como medio control de estos experimentos se utilizó el medio "f/2" descrito por Guillard y Ryther (1975). (A) escala normal, (B) escala logarítmica. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Tabla III. Valores promedio de la tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) para *Chaetoceros muelleri* cultivadas en sistema estático en Erlenmeyer, con un medio con fertilizantes agrícolas (Fa) con adición y sustracción de metales traza y vitaminas (A= Fa + metales traza + vitaminas, B= Fa + metales traza - vitaminas, C= Fa - metales traza + vitaminas, D= Fa - metales traza - vitaminas), y el medio “f/2” (E) descrito por Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba *a posteriori* de “Student-Neuman Keuls”),  $\alpha=0.05$ :  $a < b$ .

Día	Medio de cultivo				
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
1	1.283 a (0.032)	1.053 a (0.039)	1.322 a (0.094)	1.344 a (0.046)	1.028 a (0.262)
2	0.740a (0.200)	0.908 a (0.140)	0.680 a (0.193)	0.689 a (0.093)	0.828 a (0.153)
3	0.463 a (0.266)	0.659 a (0.099)	0.568 a (0.051)	0.634 a (0.023)	0.407 a (0.243)
4	0.346 a (0.022)	0.223 a (0.006)	0.252 a (0.138)	0.332 a (0.096)	0.313 a (0.184)
5	-0.224 a (0.373)	0.064 a (0.057)	-0.132 a (0.134)	-0.195 (0.050)	-0.251 a (0.380)
6	0.244 a (0.442)	-0.038 a (0.023)	0.279 a (0.176)	0.124 a (0.169)	0.404 a (0.446)

### III. 2. Cultivos estáticos en garrafón

Al comparar las densidades celulares de los cultivos mantenidos en garrafón para la microalga *C. muelleri* y durante la fase exponencial (día 2-8) con los distintos medios de cultivo (A, B, C, D y E) (figura 4), se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ( $P= 0.0000$ ). Al realizar una prueba *a posteriori*, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *C. muelleri* mantenido en los medios de cultivo A (Fa + Mt + V), C (Fa - Mt + V), y el medio E (“f/2”), sin embargo los medios de cultivo B(Fa + V - Mt) y D (Fa - Mt -V) si presentaron diferencias respecto a los

anteriormente mencionados. Al obtener las tasas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo por días, se observaron diferencias únicamente en el día 1 y 4 (tabla IV).

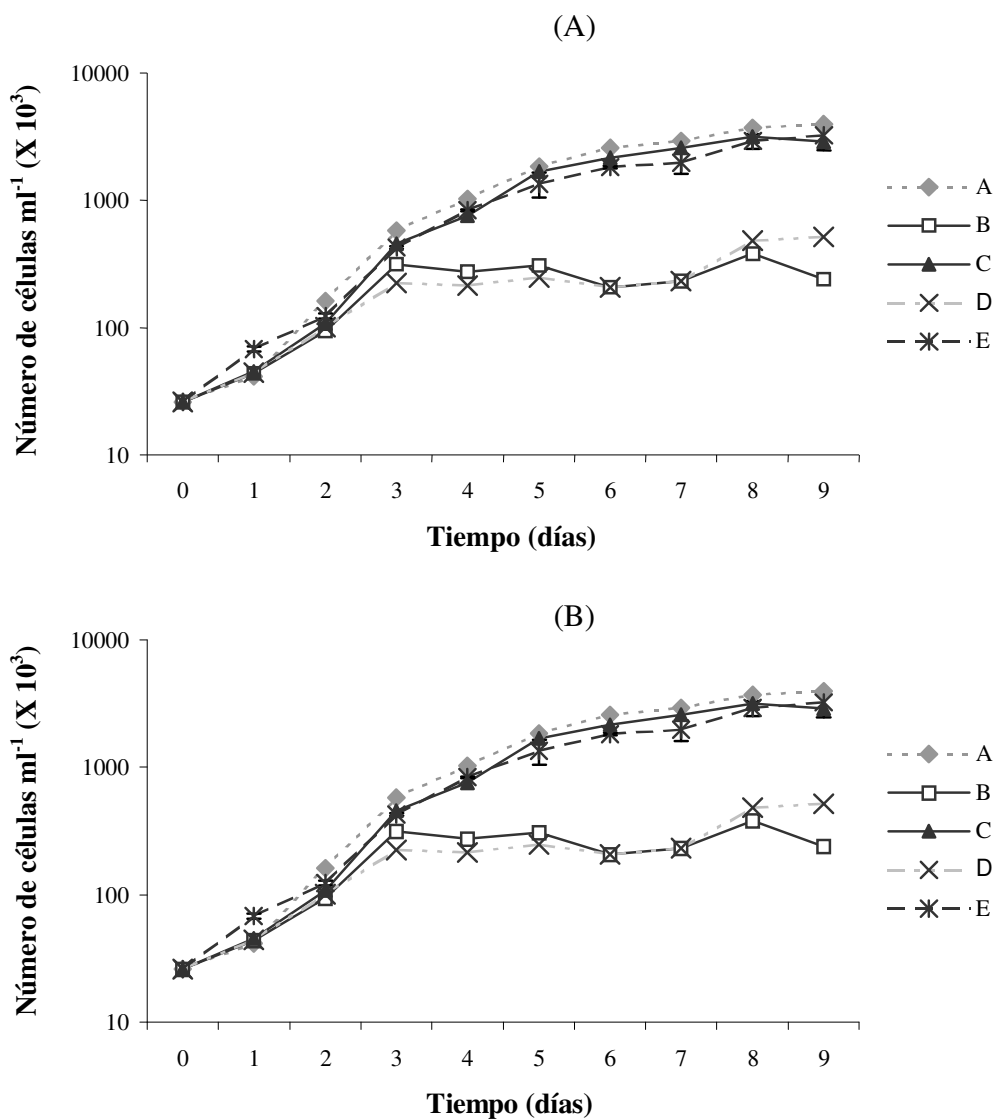


Figura 4. Crecimiento poblacional promedio para *Chaetoceros muelleri* mantenido en cultivos en garrafones de vidrio con un medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa) considerando la adición (+) y substracción (-) de vitaminas (V) y metales traza (Mt). A= Fa + Mt + V, B= Fa + Mt - V, C= Fa - Mt + V, D= Fa - Mt - V y E= "f/2". Como medio control de estos experimentos se utilizó el medio "f/2" descrito por Guillard y Ryther (1975). (A) escala normal, (B) escala logarítmica. Las barras verticales indican la desviación estándar

Tabla IV. Valores promedio de la tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) para *Chaetoceros muelleri* cultivadas en sistema semicontinuo en garrafón, con un medio con fertilizantes agrícolas (Fa) con adición y sustracción de metales traza y vitaminas (A= Fa + metales traza + vitaminas, B= Fa + metales traza - vitaminas, C= Fa - metales traza + vitaminas, D= Fa - metales traza - vitaminas), y el medio “f/2” (E) descrito por Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos y prueba *a posteriori* de “Student-Neuman Keuls”,  $\alpha=0.05$ : a < b < c.

Día	Medio de cultivo				
	A	B	C	D	E
<b>1</b>	0.666 a (0.123)	0.751 a (0.116)	0.801 a (0.070)	0.761 a (0.101)	1.383 b (0.065)
<b>2</b>	1.978 a (0.289)	1.109 a (0.022)	1.246 a (0.363)	1.187 a (0.507)	0.868 a (0.003)
<b>3</b>	1.834 a (0.073)	1.736 a (0.114)	2.089 a (0.161)	1.165 a (0.679)	1.788 a (0.026)
<b>4</b>	0.827 c (0.115)	-0.190 a (0.313)	0.727 b (0.257)	-0.074 a (0.453)	0.968 c (0.063)
<b>5</b>	0.842 a (0.003)	0.158 a (0.093)	1.155 a (0.436)	0.222 a (0.472)	0.690 a (0.292)
<b>6</b>	0.490 a (0.338)	-0.576 a (0.291)	0.356 a (0.201)	-0.261 a (0.385)	0.436 a (0.282)
<b>7</b>	0.173 a (0.209)	0.173 a (0.501)	0.259 a (0.035)	0.160 a (0.290)	0.112 a (0.226)
<b>8</b>	0.347 a (0.079)	0.718 a (0.872)	0.289 a (0.124)	1.057 a (0.400)	0.572 a (0.070)
<b>9</b>	0.105 a (0.492)	-0.672 a (0.759)	-0.129 a (0.126)	0.087 a (0.835)	0.137 a (0.144)

Basándose en estos resultados se optó por utilizar el medio “A” como el medio de cultivo elaborado con fertilizantes agrícolas, metales traza y vitaminas para cultivar las microalgas durante el resto del experimento.

### III. 3. Características morfológicas de la microalga

Las diatomeas mostraron diferencias significativas en el ancho celular al ser cultivadas en el medio químico (“f/2”) y el medio elaborado con fertilizantes agrícolas (Fa) ( $P=0.0221$ ), mientras que para el largo de la microalga no hubieron diferencias significativas ( $P=0.1725$ ) (tabla V).

Tabla V. Valores promedio de las mediciones de las longitudes obtenidas para la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en un medio con fertilizantes agrícolas (A(Fa + Mt + V)) y en el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas  $\alpha=0.05$ :  $a < b < c$ .

Medio de cultivo	Forma	Medida (micrómetros)
“f/2”	Largo	8.8 (1.15) c
	Ancho	4.9 (0.45) a
A	Largo	8.8 (0.84) c
	Ancho	5.8 (0.36) b

### III. 4. Cultivos semicontínuos en garrafón

En este volumen de cultivo la fase de crecimiento exponencial se presentó el día 2, prolongándose hasta el día 8 de cultivo. El cultivo se mantuvo en forma semicontínua a partir del día 9 (figura 5). La verificación de la estabilidad de los cultivos con el 30% de dilución diaria, se realizó con la prueba de beta ( $\beta$ ). Para la prueba estadística anterior se utilizaron los valores de la concentración celular de los cultivos antes de diluir. Los resultados muestran que no existió un cambio significativo de la pendiente a partir del día 10, con respecto a los días de cultivo tanto para los cultivos mantenidos con

fertilizantes agrícolas ( $\beta=0.48$ ) como para los cultivos mantenidos con el medio “f/2” ( $\beta= 0.43$ ). Lo anterior indica que los cultivos de *C. muelleri* mantenidos con los dos respectivos medios utilizados, son estables con la razón de dilución realizada.

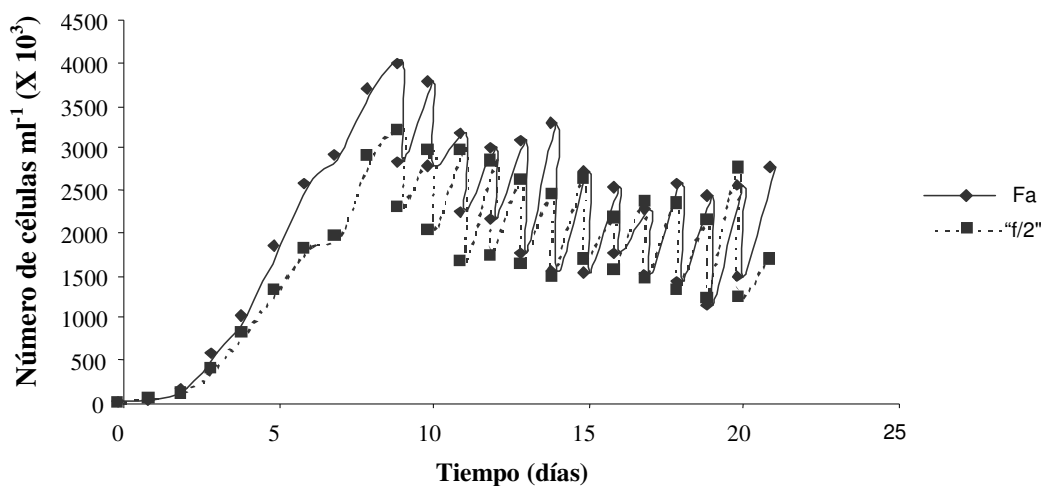


Figura 5. Crecimiento poblacional promedio para *Chaetoceros muelleri* en cultivos semicontínuo con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control.

### III. 5. Composición proximal y bioquímica de la microalga

La composición bioquímica analizada de la microalga, *C. muelleri* no presentó diferencias significativas a través de los tres diferentes días de muestreo ni con el medio “f/2” ni con el elaborado a base de fertilizantes agrícolas (tabla VI).

Tabla VI. Componentes bioquímicos celulares en porcentaje de peso seco libre de cenizas de *Chaetoceros muelleri* cultivada en un sistema semicontínuo en garrafón con 10 litros, utilizado el medio 'f/2' descrito por Guillard y Ryther y el medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa) como medio de cultivo. La desviación estándar se incluye entre paréntesis. Las letras al lado de las desviaciones indican diferencias significativas y prueba *a posteriori* de "Student-Neuman Keuls",  $\alpha=0.05$ :  $a < b$ .

Medio	Día de muestreo	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos	Cenizas
"f/2"	0	11.5 (2.93) a	29.5 (2.62) a	19.8 (1.65) a	40.2 (6.35) a
Fa	0	13.1 (5.07) a	23.4 (1.96) a	25.0 (4.23) a	48.1 (9.91) a
"f/2"	1	13.5 (1.16) a	26.0 (3.85) a	18.3 (3.64) a	42.9 (0.86) a
Fa	1	10.0 (3.57) a	24.3 (2.17) a	27.5 (2.34) a	42.9 (12.9) a
"f/2"	2	9.4 (2.44) a	26.1 (2.39) a	21.0 (0.69) a	38.1 (7.43) a
Fa	2	10.1 (3.84) a	23.7 (1.20) a	24.9 (4.66) a	57.7 (7.45) a

El porcentaje promedio de materia orgánica obtenido para los cultivos de *C. muelleri* no presentó diferencias significativas, al ser mantenidos en el medio con fertilizantes agrícolas con respecto a lo evaluado en las células cultivadas en medio "f/2". Tampoco se evaluaron diferencias en el contenido orgánico durante los diferentes días de muestreo ( $P= 0.0624$ ) (figura 6).

El porcentaje de cenizas no se modificó por efecto del medio de cultivo o a través del tiempo ( $P= 0.2162$ ) para los cultivos semicontínuos mantenidos con ambos medios de cultivo (fertilizantes agrícolas + metales traza + vitaminas y el medio "f/2") (figura 7).



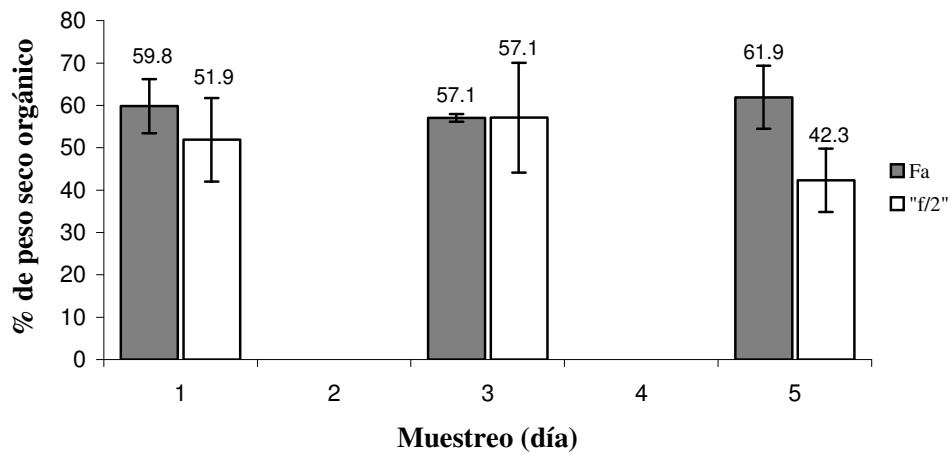


Figura 6. Variación (%) del contenido de materia orgánica para *Chaetoceros muelleri* en tres diferentes días para cultivos semicontínuos, con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio "f/2" descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control. Las barras verticales indican la desviación estándar

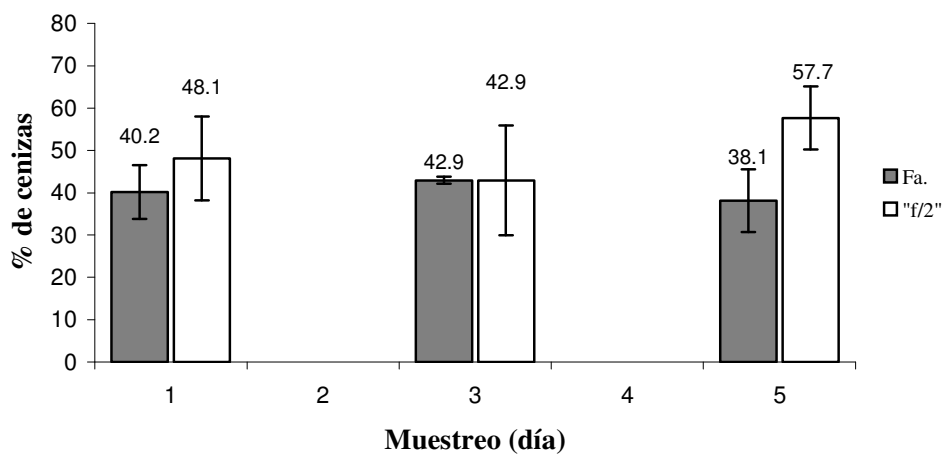


Figura 7. Variación (%) del contenido de cenizas para *Chaetoceros muelleri* en tres diferentes días para cultivos semicontínuos, con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio "f/2" descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control. Las barras verticales indican la desviación estándar

### III. 6. Contenido de proteínas

Al ser evaluado el contenido de proteínas totales de las microalgas cultivadas en cultivos semicontínuos, se obtuvo un mayor porcentaje de proteínas (29.5%) con base en el peso seco orgánico en el primer día de muestreo para el medio elaborado a base de fertilizantes agrícolas. La menor cantidad de proteínas, se obtuvieron en el día 1 con el medio "f/2" de Guillard y Ryther (23.4%). Una vez llevado acabo el análisis estadístico, no se obtuvieron diferencias significativas ( $P= 0.6364$ ) en el contenido de proteínas para las microalgas mantenidas en los dos tipos de medio de cultivo (Fa y "f/2") y tampoco se evaluaron cambios por efecto del día de muestreo (figura 8).

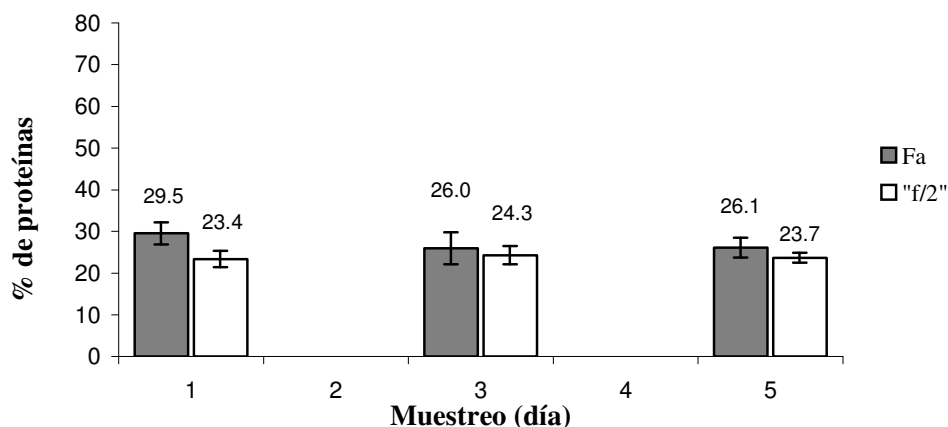


Figura 8. Variación (%) del contenido de proteínas para *Chaetoceros muelleri* en tres diferentes días en cultivos semicontínuos, con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio "f/2" descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio control. Las barras verticales indican la desviación estándar.

### III. 7. Contenido de carbohidratos

El contenido de carbohidratos de la microalga *C. muelleri* cultivada en el medio “f/2” y el medio formulado con fertilizantes agrícolas, no presentó diferencias significativas entre ambos tratamientos y tampoco se evaluaron cambios a través de los diferentes días de muestreo ( $P= 0.2471$ ). Los porcentajes de los contenidos de carbohidratos con base en el peso seco orgánico se ubicaron entre valores de 9.4 y 13.5% (figura 9).

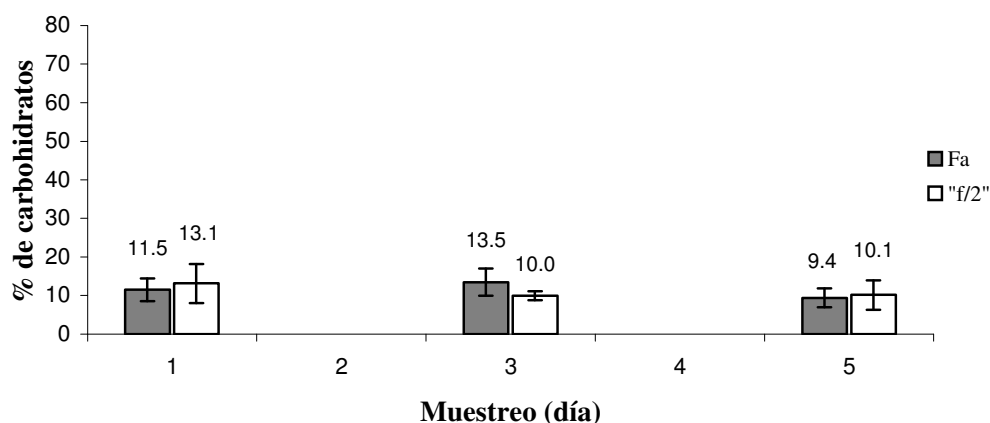


Figura 9. Variación (%) del contenido de carbohidratos para *Chaetoceros muelleri* en tres diferentes días en cultivos semicontínuos, con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control. Las barras indican la desviación estándar.

### III. 8. Contenido de lípidos totales

La composición de lípidos totales en la microalga *C. muelleri* cultivada en el medio “f/2” y el medio formulado con fertilizantes agrícolas, no presentó diferencias significativas entre los diferentes días de muestreo ( $P= 0.9499$ ). Los porcentajes de los

contenidos de lípidos con base en el peso orgánico se ubicaron en valores de 18.3 y 27.5% (figura 10).

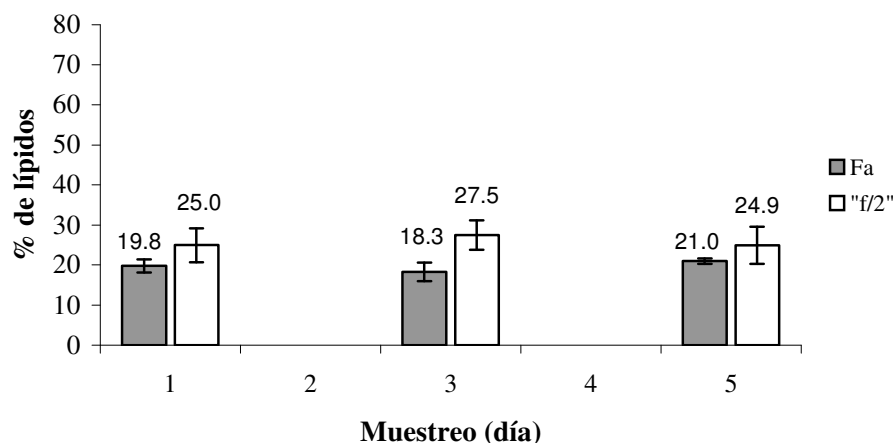


Figura 10. Variación (%) del contenido de lípidos totales para *Chaetoceros muelleri* en tres diferentes días en cultivos semicontinuos, con una dilución diaria del 30% mantenidos en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo experimental formulado con fertilizantes agrícolas (Fa + Mt + V) y el medio "f/2" descrito por Guillard y Ryther (1975) como medio de cultivo control. Las barras indican la desviación estándar.

### III. 9. Composición de aminoácidos

En las microalgas cultivadas en el medio agrícola la leucína fue el aminoácido esencial encontrado en mayor proporción (10.37%), al igual que para el medio "f/2" (9.23%). Los aminoácidos encontrados en menor proporción fueron el triptófano (2.26%) para el medio agrícola y la histidina (1.45%) para el medio "f/2" (tabla VII). La cantidad total de aminoácidos esenciales registrados para el medio agrícola (53.69%) no presentó diferencias significativas ( $P= 0.5696$ ) con respecto a la cantidad de aminoácidos

esenciales encontrados en las microalgas cultivada en el medio “f/2” (54.73%). En cuanto a la composición de aminoácidos no esenciales, el glutamato fue el que se presentó en mayor proporción (12.25%) para el medio agrícola, al igual que el medio “f/2” (13.41%), el contenido del aminoácido en menor proporción fue la glicina (4.29%) para el medio agrícola, mientras que para el medio “f/2” la cisteína fue el que se mostró en menor proporción (4.11%). La cantidad total de aminoácidos no esenciales encontrados en las microalgas cultivadas en el medio agrícola (45.03%), no mostró diferencia significativa con respecto al total de aminoácidos evaluados en las microalgas cultivadas en el medio “f/2” (44.82%) ( $P= 0.6314$ ) (tabla VII).

Tabla VII. Valores promedio del perfil de aminoácidos en porcentajes del total de proteínas (peso seco) para la diatomea *Chaetoceros muelleri* cultivada en forma semicontinua en garrafones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo con fertilizante agrícolas (Fa), y como medio de cultivo control el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas  $\alpha=0.05$ : a < b.

Aminoácido	Medio de cultivo	
	Fa	“f/2”
<i>Esenciales</i>		
<b>Leucina</b>	10.37 (0.747) b	9.23 (0.731) a
<b>Fenilalanina</b>	6.37 (0.403) a	7.58 (0.142) b
<b>Arginina</b>	5.62 (0.283) a	5.51 (0.210) a
<b>Valina</b>	5.48 (1.025) a	5.39 (0.189) a
<b>Treonina</b>	5.44 (0.635) a	5.92 (0.157) a
<b>Lisina</b>	4.44 (0.173) a	4.83 (0.239) a
<b>Metionina</b>	4.24 (0.901) a	4.43 (0.922) a
<b>Prolina</b>	3.62 (0.274) a	3.29 (0.091) a
<b>Isoleucina</b>	3.33 (0.884) a	4.66 (0.874) a
<b>Histidina</b>	2.52 (0.844) a	1.45 (0.601) a
<b>Triptófano</b>	2.26 (0.541) a	2.44 (0.333) a
<b>Subtotal</b>	53.69 (0.208)	54.73 (1.018)
<i>No esenciales</i>		
<b>Glutamato</b>	12.25 (0.190) a	13.41 (0.512) b
<b>Aspartato</b>	11.26 (0.522) a	11.41 (0.347) a
<b>Alanina</b>	6.52 (0.425) b	5.28 (0.181) a
<b>Serina</b>	6.15 (0.177) a	6.19 (0.087) a
<b>Cisteína</b>	4.56 (0.194) a	4.11 (0.484) a
<b>Glicina</b>	4.29 (0.354) a	4.46 (0.066) a
<b>Subtotal</b>	45.03 (0.217)	44.86 (1.020)
<b>TOTAL</b>	<b>98.72</b>	<b>99.59</b>
<b>Proteínas por método Kjeldahl (%)</b>	27.2 (2.0)	23.8 (0.5)

### III. 10. Perfil de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos resultó muy similar para la microalga *C. muelleri* al ser mantenida en sistemas semicontínuos con el medio formulado con fertilizantes y con el medio "f/2". El total de los ácidos grasos saturados (31.39%) fueron muy similares a las cantidades encontradas en los ácidos grasos monoinsaturados (32.79%) y polinsaturados (33.84%) para el medio agrícola (tabla VIII). Mientras que para el medio "f/2" se mantuvo la misma tendencia, obteniéndose porcentajes de ácidos grasos saturados de 31.63%, monoinsaturados de 29.84% y polinsaturados de 34.23%. No se encontraron diferencias significativas en el contenido total de ácidos grasos para *C. muelleri* por efecto del medio de cultivo utilizado ( $P= 0.4570$ ).

Al analizarse los ácidos grasos esenciales (tabla VIII) se encontró que la microalga *C. muelleri* presentó un alto porcentaje (17.33%) del ácido eicosapentanoico (20:5 n-3), al ser cultivada en el medio agrícola, y fue mayor que el porcentaje de este mismo ácido graso obtenido en la microalga al ser cultivada en el medio "f/2" (13.83%). Al realizar una prueba de comparación de medias entre las cantidades de este ácido graso obtenidas para ambos medios de cultivo, se comprobaron diferencias significativas ( $P= 0.0019$ ). Para el ácido docosahexaenoico (22:6 n-3), se evaluaron diferencias significativas ( $P= 0.0012$ ) en la cantidad obtenida para las microalgas mantenidas en el medio agrícola (3.99%) y para el medio químico "f/2" utilizado como control (6.98%). El ácido 18:5 n-3 se presentó con un 0.01% en las microalgas cultivadas en el medio agrícola, mientras que en el medio "f/2" no fue registrado, por lo que no se evaluó significancia de los valores.

Tabla VIII. Valores promedio del perfil de ácidos grasos expresados en porcentajes del peso seco del total de lípidos para la diatomea *Chaetoceros muelleri* cultivada en forma semicontinua en garrafrones de vidrio. Se utilizó un medio de cultivo con fertilizante agrícolas (Fa), y como medio de cultivo control el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencias significativas  $\alpha=0.05$ : a < b.

Ácido graso	Medio de cultivo	
	Fa	“f/2”
<i>Saturados</i>		
14:00	14.64 (0.258) a	15.64 (0.344) b
15:00	0.55 (0.168) a	0.51 (0.108) a
16:00	15.51 (0.477) a	14.73 (1.022) a
17:00	0.16 (0.068) b	0.14 (0.000) a
18:00	0.55 (0.072) a	0.61 (0.050) a
<b>Subtotal</b>	<b>31.39 (0.315)</b>	<b>31.63 (1.214)</b>
<i>Monoinsaturados</i>		
16:1(n-7)	30.37 (0.318) b	27.49 (1.611) a
18:1(n-9)	1.24 (0.240) a	1.18 (0.055) a
18:1(n-7)	0.31 (0.060) a	0.18 (0.231) a
18:1(n-5)	0.24 (0.125) a	0.35 (0.191) a
20:1(n-9)	0.14 (0.037) a	0.15 (0.000) a
22:1(n-11)	0.38 (0.038) a	0.42 (0.032) a
22:1(n-7)	0.08 (0.006) a	0.06 (0.010) a
22:1(n-9)	0.02 (0.006) a	0.01 (0.006) a
<b>Subtotal</b>	<b>32.79 (0.579)</b>	<b>29.84 (0.558)</b>
<i>Polínsaturados</i>		
16:2(n-6)	1.06 (0.055) a	1.75 (0.221) a
16:2(n-4)	2.77 (0.090) a	3.85 (0.517) b
16:3(n-3)	0.05 (0.040) a	0.02 (0.015) a
16:4(n-3)	0.24 (0.020) a	0.23 (0.214) a
16:4(n-1)	0.91 (0.056) a	0.51 (0.059) a
18:2(n-6)	0.15 (0.026) a	0.19 (0.178) a
18:3(n-6)	4.94 (0.268) b	3.35 (1.433) a
18:4(n-3)	0.32 (0.078) a	0.44 (0.266) a
18:5(n-3)	0.01 (0.006) a	Traza
20:3(n-6)	0.46 (0.020) a	0.59 (0.085) a
20:2(n-6)	0.10 (0.000) a	0.01 (0.006) a
20:4(n-6)	1.49 (0.248) a	2.08 (0.084) a
20:4(n-3)	0.01 (0.006) a	0.05 (0.000) a
20:5(n-3)	17.33 (0.520) b	13.83 (0.717) a
21:5(n-3)	0.01(0.006) a	0.30 (0.058) a
22:6(n-3)	3.99 (0.435) a	6.98 (0.505) b
<b>Subtotal</b>	<b>33.84 (0.202)</b>	<b>34.23 (0.917)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>98.02</b>	<b>95.70</b>



### III. 11. Cultivo larval de *Litopenaeus vannamei*

Las larvas de *L. vannamei* se mantuvieron en un intervalo de temperatura de 27-28.5°C, el pH fluctuó entre 7.3 y 8.5 unidades, la salinidad se ubicó entre las 34 y 35‰, el amonio en los cultivos fluctuó entre los 0.02-0.05 mg l<sup>-1</sup>, y el oxígeno disuelto se mantuvo entre 7.0-8.75 mg l<sup>-1</sup>.

La supervivencia que se obtuvo en los cultivos larvales de *L. vannamei* del estadio protozoa I hasta poslarva II, con las microalgas cultivadas en el medio de cultivo control ("f/2") fue de 39.37%, mientras que para el medio experimental con fertilizantes agrícolas (Fa) fue del 34.64%. Después de realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en las supervivencias obtenidas entre ambos tratamientos (P= 0.5720).

La calidad de las larvas determinada después de un régimen de alimentación basado *C. muelleri* cultivada en el medio agrícola, y bajo las condiciones de cultivo ya mencionadas. fue alta de acuerdo a la supervivencia y clasificación mencionada por Villalon (1991). No se presentaron diferencias significativas (P= 0.5763) en la supervivencia con respecto a las larvas alimentadas con microalgas cultivadas en el medio "f/2" (tabla IX).

Tabla IX. Calidad de larvas y supervivencia para *Litopenaeus vannamei* al ser sometidas a una prueba de estrés salino y térmico, las larvas se alimentaron con microalgas cultivadas en el medio “f/2” descrito por Guillard y Ryther (1975) y en un medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencia significativa  $\alpha=0.05$ : a < b.

Medio de cultivo	Número de organismos Inicio	Número de organismos Final	Supervivencia	Calidad
“f/2”	595.31	510.91	88.22 (28.92) a	Alta
Fa	389.78	309.04	83.18 (12.69) a	Alta

La tasa de crecimiento promedio calculada con base en el peso seco fue del 96.5% para las larvas de *L. vannamei* alimentadas con microalgas cultivadas en medio “f/2”, mientras que las larvas alimentadas con microalgas cultivadas en el medio agrícola tuvieron una ganancia en masa del 91.7%. No hubo diferencia significativa entre ambos tratamientos ( $P= 0.6354$ ). El incremento promedio en talla (cefalotórax) fue de un 89.50% para las larvas alimentadas con microalgas cultivadas en el medio “f/2”, mientras que con el medio Fa se presentó un incremento del 110.40% de la talla inicial obteniéndose diferencias significativas entre ambos tratamientos ( $\alpha= 0.05$ ,  $t= 3.63$ ,  $P= 0.0109$ ).

El rendimiento obtenido para las larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con microalgas cultivadas en el medio “f/2” fue del 0.44 ( $\text{mg}^{-1}\text{día} \times \% \text{ de supervivencia}$ ), mientras que para el medio agrícola fue de un 0.58 ( $\text{mg}^{-1}\text{día} \times \% \text{ de supervivencia}$ ). No se obtuvieron diferencias significativas en el rendimiento de las larvas alimentadas con las microalgas cultivadas en los dos tipos de medio de cultivo ( $\alpha=0.05$ ,  $t=-0.5680$ ,  $P= 0.5905$ ) (tabla X-A).

El tamaño de las larvas de *L. vannamei* registrado en las muestras de los distintos tratamientos de alimentación, no fue el mismo para ambos tratamientos (“f/2” y Fa). Al final del experimento las larvas alimentadas con microalgas cultivadas en el medio “f/2” fueron significativamente mayores ( $P= 0.0109$ ) en longitud del cefalotórax (0.6105 mm), con respecto a las alimentadas con microalgas mantenidas con fertilizantes agrícolas (Fa) (0.4938 mm) (tabla X-B).

Tabla X. A= Porcentajes de ganancia en masa de *Litopenaeus vannamei*, talla del cefalotórax e índice de rendimiento obtenido durante el desarrollo larval. B= Incremento en talla (mm) del cefalotórax durante el desarrollo larval de *Litopenaeus vannamei*. Los valores fueron obtenidos después de ser alimentadas las larvas con microalgas cultivadas en el medio “f/2” (Guillard y Ryther, 1975) y en medio formulado con fertilizantes agrícolas (Fa). El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Las letras al lado de las cantidades indican diferencia significativa  $\alpha=0.05$ :  $a < b$ .

<b>(A)</b>			
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Incremento masa (%)</b>	<b>Incremento talla (%)</b>	<b>Índice rendimiento (mg/día x % de suplemento)</b>
<b>“f/2”</b>	96.5 (0.019) b	89.50 (0.043) a	0.44 (0.107)
<b>Fa</b>	91.7 (0.062) a	110.40 (0.022) b	0.58 (0.261)

<b>(B)</b>		
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>
<b>“f/2”</b>	0.6105 (0.033)	1.1569 (0.043)
<b>Fa</b>	0.4938 (0.034)	1.0390 (0.022)

## IV. DISCUSIÓN

### IV. 1. Selección del medio de cultivo

Durante las curvas de crecimiento a escala de matraz Erlenmeyer (250 ml) no se presentó una fase de adaptación o acondicionamiento al inicio de los cultivos, lo cual se pudo deber a que el inóculo de los cultivos se encontraba en la fase exponencial. Las tasas de crecimiento registradas en los cultivos se asemejan y mantienen una tendencia similar a las obtenidas por otros autores (Medina-Reyna y Cordero-Esquivel, 1998, y Gracida-Valdepeña, 1999) en cultivos de la misma especie de microalga (*Chaetoceros muelleri*). Cultivos realizados por Gracida-Valdepeña (1999), al igual que los resultados obtenidos, tienen las mayores tasas de crecimiento en el primer día cultivo, en donde se obtuvo un máximo de 2.62 divisiones por día, (en el presente trabajo fue obtenido un máximo de 1.93 divisiones por día en el medio “D” (Fa – Mt – V) mientras que para el medio “f/2” se obtuvieron un máximo de 1.48 divisiones por día).

Los cultivos mantenidos en matraz Erlenmeyer (250 ml) en el que se utilizó el medio “f/2” mostraron un menor crecimiento durante la fase exponencial, mientras el medio agrícola con sus variantes (A= Fa + Mt + V, B= Fa– Mt + V, C= Fa – Mt + V, D= Fa – Mt - V) tuvieron un crecimiento superior al medio “f/2”. Esta diferencia pudo deberse a que las concentraciones de metales traza, al igual que las vitaminas, son nutrientes que se requieren en las microalgas en bajas cantidades. Y las concentraciones contenidas por el agua de mar utilizada en los cultivos pudieron ser suficientes para cubrir los requerimientos de las microalgas para su crecimiento óptimo.

Los fertilizantes de origen agrícola, pueden presentar variaciones en su composición química (como metales traza y quelantes), a las cuales varios autores (González-Rodríguez y Maestrini, 1984; López-Elías, 1990) atribuyen una función positiva para el crecimiento de las microalgas. La variación de la composición de los fertilizantes puede deberse de acuerdo al origen y a su proceso de producción (Gracida-Valdepeña, 1999). Lo anterior mencionado pudo influir positivamente en el crecimiento y en la mayor concentración celular observada en las microalgas cultivadas con medios agrícolas con respecto al medio “f/2”.

Ya que en este estudio fueron mantenidas constantes la temperatura e intensidad luminosa, las diferencias encontradas no pueden atribuirse a variaciones de manejo. Dado el volumen tenido en estos cultivos, la limitación o exceso por algún nutriente, puede tener un efecto sustancial sobre el crecimiento de los cultivos (Pisman *et al.*, 2001; Carbajal-Miranda, 2002), ya que es bien sabido que existe una relación inversa entre la tasa de crecimiento y el volumen de cultivo. Para evitar que las anteriores variables (volumen y nutrientes) influyesen en la disponibilidad de nutrientes, se mantuvo la misma relación atómica de la composición de nutrientes mayores manejada en el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975) y el medio experimental elaborado con fertilizantes agrícolas. El alto crecimiento microalgal obtenido ( $3.197.91 \times 10^{-3}$ ) en el medio “D” (Fertilizante agrícola) pudo tener su origen en la utilización de diferentes aportes combinados de nitrógeno ( $\text{NH}_4, \text{NO}_3$ ), donde el amonio es una de las formas reducidas de nitrógeno, y cuando éste se combina con nitrato de amonio en el medio de cultivo se inhibe la actividad de la nitrato reductasa debido a la presencia del amonio, el

cual es utilizado para la formación de aminoácidos sin gasto energético previo (Syrett, 1981; Lobban *et al.*, 1985; Valenzuela-Espinosa, 1999). Aunque Kaplan *et al.*, (1986) recomiendan evitar las sales de amonio ya que en medio alcalino, pequeñas dosis pueden ser inhibitoras o tóxicas para algas sensitivas debido a que el amonio ( $\text{NH}_4$ ) se transforma en amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) (Iriarte y Buitrago, 1990).

Los cultivos mantenidos en volúmenes de 10 litros, no tuvieron la misma respuesta en crecimiento que los cultivos en matraz Erlenmeyer de 250 ml aforado a 125 ml, el crecimiento disminuyó en los cultivos en el medio B (Fa + Mt - V) y el medio D (Fa - Mt - V), respecto al resto de los medios de cultivo. La carencia de vitaminas en los medios B y D pudieron ser el factor inhibitor del crecimiento de las mismas (Carlucci y Silbernagel, 1969). Además de la falta de vitaminas en el medio, las reservas contenidas en las células pudieron ser agotadas. Las concentraciones de vitaminas en el medio marino natural pueden tener variaciones respecto a la zona y temporada del año, lo que se pudo reflejar en el agua utilizada en los cultivos que provenía del agua costera marina. La cantidad de vitaminas en el agua de mar pudo tener variaciones, de acuerdo a la época del año en la cual se realizaron los cultivos de microalgas en Erlenmeyer y garrafón. La cantidad de inóculo utilizado, pudo jugar un rol importante ya que el volumen de cultivo inoculado pudo contener vitaminas y metales traza. La cantidad de los inóculos utilizados en los matraces Erlenmeyer, representaban con respecto al porcentaje total, el 25.3% para el medio "f/2" y el 24.6% para medio agrícola, mientras que para los cultivos en garrafón, la cantidad de inóculo representó un 3.3% para el medio "f/2" y de un 4.7% para el medio agrícola. Debido al mayor porcentaje de inóculo

utilizado a escala de matraz Erlenmeyer, se pudieron tener aportes extras de vitaminas y metales traza proveniente del cultivo madre.

Las diferencias en las características morfológicas de las microalgas cultivadas en el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1975) y el medio agrícola con la adición de metales traza y vitaminas pudieran tener dos posibles respuestas ya que se sabe que el tamaño puede variar con la concentración de luz y de fierro (Sunda y Huntsman, 1997; Timmermans *et al.*, 2001). Timmermans *et al.*, (2001) mencionan que para *Chaetoceros calcitrans* al incrementar el fierro en los cultivos se obtienen células más largas, mas no señalan el efecto en el ancho de las mismas. La luz fue una variable que se mantuvo constante, por lo que se podría rechazar la hipótesis de algún posible efecto en el crecimiento de las células mantenidas en cultivo por efecto de alguna diferencia en la intensidad de la luz. Por lo anterior el contenido de fierro en el medio pudo ser la causa de la diferencia encontrada en el tamaño de las células.

#### **IV.2. Composición proximal de la diatomea *Chaetoceros muelleri***

Los valores porcentuales de carbohidratos obtenidos en cultivos mantenidos en forma semicontínua fueron muy parecidos a los reportados por Medina-Reyna y Cordero-Esquivel (1998). En el presente trabajo se obtuvieron valores del 13.51 al 9.4%, mientras que los autores ya mencionados obtuvieron 13.5% de carbohidratos. Puesto que los cultivos se encontraban estabilizados, no hubo diferencias entre los 3 diferentes días de cultivo muestreados tanto para carbohidratos como proteínas, lípidos y cenizas. La cantidad de proteínas encontradas en las microalgas del medio “f/2” fue de 26.0 a 29.5%

y del 23.4 a 24.3% para el medio agrícola. Estos valores se encuentran por encima a los reportados por Medina-Reyna y Cordero-Esquivel (6.52%) pero muy cerca a los obtenidos por Gracida-Valdepeña, quien obtuvo un 30.74% y un 33.43%, para las microalgas cultivadas en los mismos medios de cultivo (“f/2” y Fa respectivamente). Estos porcentajes son altos debido a la fase exponencial en la que se encontraban los cultivos (exponencial o logarítmica de crecimiento), ya que es en esta etapa donde se encuentran los mayores porcentajes de proteínas, menores valores para carbohidratos y lípidos, además de ser el período en que se puede tener una mayor concentración de ácidos grasos de cadena larga. Usualmente éstos últimos se incrementan a medida que se aproxima la fase estacionaria (Cebrero-Núñez, 1994; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Lafarga-De la Cruz, 1997; Gracida-Valdepeña, 1999)

Las diferencias obtenidas en el contenido de proteínas totales en el cultivo de *C. muelleri* mantenida en el medio agrícola pudieron deberse a las diferencias del método de determinación. El método de Kjeldahl realiza la determinación del nitrógeno total de la muestra, el cual por un proceso de digestión es degradado a amonio y de esta forma determinado (Hach *et al.*, 1985). El motivo de encontrar una mayor cantidad de proteína al utilizar fertilizantes agrícolas, puede ser debido a la posibilidad de quedar residuos de amonio provenientes del medio de cultivo, el cual contenía un 7.8% de nitrógeno en forma de amonio, que pudieron ser detectados por el método de Kjeldahl, y en consecuencia evaluar una mayor cantidad de proteínas. El método de Lowry utiliza el cobre como indicador de la reacción para la tirosina y triptófano como indicador de la cantidad de proteínas y la adición de Folin para obtener un incremento en el color. Este



método puede tener interferencia por el tipo de proteínas en la muestra y en algunos casos el color de la reacción no es estrictamente proporcional a la concentración (García-Arellano y Vázquez-Duhalt, 1998).

El contenido de lípidos registrados en los cultivos de *C. muelleri* para ambos medios de cultivo fue superior a los encontrados por Gracida-Valdepeña (12.02% y 14.25%) así como a los obtenidos por Medina-Reyna y Cordero-Esquivel (8.14%) con el mismo medio de cultivo. Esta diferencia de porcentajes se pudo deber a la distinta fase de crecimiento en que se encontraban los cultivos (Parsons *et al.*, 1961; Droop, 1975; Emdadi y Berland, 1989; López-Elias y Voltolina, 1993), ya que a medida que se aproximan los cultivos a la fase estacionaria, tienden a incrementarse los lípidos aunque no se conserva la misma proporción en cada uno de los ácidos grasos.

Las concentraciones de cenizas obtenidas en los cultivos de *C. muelleri* no presentaron ninguna tendencia definida durante los diferentes días de muestreo o entre tratamientos. Durante el quinto día de muestreo se encontró una aparente diferencia en los valores promedio del porcentaje de ceniza y de materia orgánica evaluados entre tratamientos. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico entre los distintos días de muestreo se encontró que los valores promedio para los días uno y tres tienen traslape entre la desviación de los datos. Los porcentajes evaluados durante el experimento se encuentran dentro del rango de los obtenidos por Gracida-Valdepeña para el medio "f/2" y el medio agrícola, respectivamente (51.22 y 33.52%). Se encontró que los porcentajes de cenizas obtenidos representan la mayor proporción del contenido celular con respecto al resto de

los constituyentes (carbohidratos, proteínas, lípidos), lo que puede ser reflejado en la nutrición de las larvas de camarón, debido a la importancia de las proteínas y lípidos principalmente. El alto contenido de ceniza en las células es atribuible a la formación y constitución de la frústula de las diatomeas (Paasche, 1973; Medina-Reyna y Cordero-Esquivel, 1998).

Los altos porcentajes encontrados en todos los componentes de la fracción orgánica y cenizas tanto en los cultivos de *C. muelleri* en el medio “f/2” (control) y en el medio agrícola (experimental), los anteriores porcentajes se encuentran próximos al 100% sin caer en este, debido a que se manejaron promedios en su composición bioquímica. Las variaciones en los porcentajes de los constituyentes pudieron deberse a la toma de las submuestras y los compuestos utilizados (albúmina de bovino, glucosa y tripalmitina) para elaborar las curvas de calibración los cuales no tienen un 100% de pureza. Lo anterior pudo repercutir en la determinación de proteínas, carbohidratos y lípidos, ya que pueden causar una sobre o subestimación de la cantidad de estos constituyentes (López-Elías, 1990), y un suministro de microalgas con un bajo o excesiva concentración de nutrientes esenciales, puede repercutir de manera negativa en las larvas alimentadas con estas microalgas.

#### **IV. 3. Aminoácidos**

El perfil de aminoácidos esenciales en *C. muelleri* cultivada en el medio agrícola y en el medio “f/2” fueron los 11 reportados como esenciales (Brown, 1991). Respecto a la cantidad de aminoácidos, fueron similares para ambos tratamientos, no así el porcentaje

de cada uno de ellos. La cantidad de estos aminoácidos evaluados al utilizar el medio de cultivo agrícola y el “f/2” se aproximan a los obtenidos por Brown (1991) para *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros gracilis* (55.0 y 56.7% respectivamente). No se evaluaron diferencias significativas en la cantidad total de aminoácidos esenciales, debido a que la cantidad de nitrógeno presente en el medio de cultivo fue similar para ambos tratamientos. Esta similitud del perfil de aminoácidos nos hace descartar un posible efecto de estos en las larvas de camarón. Enright *et al.*, (1986) encontraron que una deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo, producía una considerable disminución de la cantidad de proteína en las células, y al mismo tiempo una disminución de los aminoácidos en la microalga *Chaetoceros gracilis*.

Dentro del grupo de aminoácidos esenciales encontrados para diversas especies de microalgas, la arginina es mencionada por Brown (1991) como uno de los más importantes para el óptimo crecimiento larval de *L. vannamei*, la cantidad de arginina reportada en el tejido muscular de larvas de *Litopenaeus japonicus* fue de 9.1% (Teshima *et al.*, 1986; Brown, 1991). Los resultados obtenidos durante este experimento muestran que la cantidad de arginina en los cultivos de *C. muelleri* cultivada en el medio agrícola presentó un 5.62% y un 5.51% en el medio “f/2”. Por lo anterior se puede suponer que el contenido de aminoácidos evaluados para *C. muelleri* cultivada con el medio con fertilizantes agrícolas se encuentra dentro del rango de valores requeridos para larvas de *L. vannamei*.

#### IV. 4. Ácidos grasos

La cantidad de ácidos grasos evaluados en la microalga *Chaetoceros muelleri* difieren con los valores encontrados por Sáenz-Gaxiola (2002) en la misma especie de microalga cultivada en un laboratorio comercial a una temperatura de 20°C, intensidad de luz de  $90\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en un sistema semicontinuo y mantenidos en garrafones plásticos de 20 litros con agua de mar enriquecida con medio “f”. Este autor encontró que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados predominaban en la composición, mientras que los ácidos grasos polinsaturados representaron únicamente el 8.8%. En el presente estudio para *C. muelleri* se obtuvieron porcentajes promedio de ácidos grasos polinsaturados de 33.8% en el medio agrícola y de 34.2% en el medio “f/2”. Estos últimos resultados concuerdan con los obtenidos por D’Souza y Loneragan (1999) con la misma especie de microalga y mantenidas en el medio “f”. Con base a lo anterior, se puede considerar que el perfil de ácidos grasos polinsaturados evaluados durante este experimento, se aproximan a los encontrados en protozoos de *L. monodon* (41.4%) alimentadas con esta misma especie de microalga, lo que nos hace pensar que el uso del medio de cultivo agrícola en el cultivo de esta especie de microalga puede incrementar y mantener un adecuado nivel de ácidos grasos polinsaturados.

Las diferencias en el contenido de ácidos grasos encontradas entre diferentes autores para una determinada especie de microalga suele ser a menudo contradictoria, pudiéndose deber a una clasificación taxonómica errónea o bien por diferencias en el mantenimiento de los cultivos y las distintas condiciones medioambientales utilizadas (Sáenz-Gaxiola, 2002). Además de las consideraciones antes mencionadas, se debe

indicar la fase de cultivo en la que se encuentra y el ciclo día:oscuridad y el tipo de nutrientes utilizados para el mantenimiento de los cultivos (Brown *et al.*, 1996).

En trabajos anteriores con la microalga *Thalassiosira pseudonana* se observó que los ácidos grasos polinsaturados disminuyen en proporción durante la fase de crecimiento estacionaria (Brown *et al.*, 1996). En este trabajo la fase en la cual se encontraban los cultivos (exponencial) durante la colecta de muestras realizada en estos experimento fue la más adecuada, ya que las microalgas se encontraban en la mejor condición fisiológica de crecimiento además de contener la mayor concentración de ácidos grasos eicosapentanóico (20:5 n-3) y docosaheptaenóico (22:6 n-3).

En el perfil de ácidos grasos de las células de *C. muelleri* se encontró que mantuvieron la tendencia de disminuir la proporción del ácido graso 22:6 n-3 respecto al 20:5 n-3, para ambos medios de cultivo utilizados (Fa y "f/2"). La respuesta mencionada con anterioridad corresponde a lo reportado por Zhukova y Aizdaicher (1995) para esta misma especie de diatomea. La proporción de los ácidos grasos polinsaturados en *C. muelleri*, y al ser utilizada como alimento para las larvas de camarón, seguramente influyó en la supervivencia, crecimiento y la calidad de las larvas, ya que los ácidos grasos polinsaturados, de cadena larga (20:5 n-3 y 22:6 n-3) son considerados esenciales en la nutrición de crustáceos y larvas de peces, por la incapacidad de estos para sintetizarlos (Akiyama, 1992).

#### **IV. 5. Cultivo larval de *Litopenaeus vannamei***

A pesar de la buena calidad de las microalgas cultivadas a lo largo de este estudio, se obtuvieron bajos valores de supervivencia para larvas de camarón con respecto a las reportadas por otros autores (Valenzuela-Espinosa *et al.*, 1999), los cuales alcanzaron valores de supervivencias del 60.1% en el estadio de poslarva I en *L. vannamei* al alimentarse con la microalga *C. muelleri* cultivada en un medio preparado con fertilizantes agrícolas. Sin embargo los valores de supervivencia conseguidos, (34.64% cuando consumieron microalgas cultivadas en el medio agrícola y del 39.37% para las microalgas mantenidas con el medio control), se aproximan a los valores obtenidos por Tobías-Quinita y Villegas (1981), quienes determinaron supervivencias del 47.1% para larvas de camarón de la misma especie alimentadas con la microalga *C. muelleri* cultivada en el medio "f" de Guillard y Ryther. La baja supervivencia de las larvas de camarón durante este experimento podría estar relacionada con el tamaño distinto de las células mantenidas en los dos diferentes medios de cultivo. El tamaño del alimento que se suministra a las larvas de camarón, puede afectar la supervivencia ya que se ha encontrado que existe un tamaño óptimo de partícula alimenticia a suministrar durante el desarrollo larval del camarón. Se ha encontrado que la larva de camarón puede hacer una selección del tamaño de las partículas que ingiere y también esta relacionado con el tamaño de la larva (De la Cruz, 1989). De la Cruz (1989) encontró que para el *L. schmitti*, el tamaño apropiado de la microalga para protozoa I es de 14.5 micrómetros y de 28.6 micrómetros de todo el alimento para poslarva I. Partículas de menor o mayor tamaño tienen un índice de selectividad negativo, es decir, son ingeridas con dificultad. No obstante el rango óptimo del tamaño de partícula puede modificarse en dependencia

de variables ambientales que influyen en la larva de camarón. Entre estas destacan la temperatura, la salinidad, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, la cantidad de la luz, el estado de saciedad de los organismos y a variaciones debido a la procedencia de las larvas (De la Cruz, 1989). En este estudio fueron controladas las variables ambientales, a excepción del tamaño celular de ambos tratamientos, no obstante se encontraron en un rango óptimo para la digestión en las larvas de camarón.

Otra razón por lo que se pudieron obtener baja supervivencia en los cultivos respecto a los reportados en granjas (70-80%), es que durante el experimento se mantuvieron estrictos procesos de filtración y esterilización del agua utilizada para los cultivos de microalgas y larvas. En los laboratorios comerciales de camarón los productores de poslarvas no siguen una estricta rutina de alta calidad de agua, por lo que existe ingreso de diferentes microalgas a los cultivos provenientes del medio natural, lo cual incrementa la diversidad de microflora y la presencia de algunas bacterias (*Rhodovulum sulfidophilum*), y materia orgánica en suspensión que pueden contribuir como aporte de alimento e incrementar la supervivencia de las larvas (Azad *et al.*, 2002).

El incremento en masa de las larvas de camarón fue similar para las larvas mantenidas en los tratamientos experimentales, estos resultados pudieron deberse a que el contenido de aminoácidos encontrados en las microalgas *C. muelleri* cultivada en el medio agrícola y el medio “f/2” fue similar. Respecto a la cantidad de proteínas recomendadas para juveniles de *L. vannamei* para obtener la mayor ganancia en masa, se aconseja utilizar un 32% de proteína en la dieta (Kureshy y Davis, 2002), mientras que Colvin y Brand

(1977) recomiendan un 30% de proteína para *L. vannamei* de 0.03 g. De acuerdo a los porcentajes suministrados en la microalgas producidas durante este experimento, el porcentaje de proteínas se ubicó entre 29.5 y 26.0% para el medio agrícola y entre 24.3 y 23.4% para el medio “f/2”, lo que resulto con valores similares a los indicados para ésta especie.

Se ha evaluado que para larvas de camarón se tienen aminoácidos esenciales que no pueden ser sintetizados por el organismo, por lo que deben ser aportados en la ración alimenticia (Soler-Jaramillo, 1996). Algunos autores (Kanasawa, 1989; Chuang, 1990; Soler-Jaramillo, 1996) definen que los aminoácidos más importantes en la nutrición de camarón son la lisina, metionina y la cisteína, no obstante Gaxiola-Cortés *et al.*, (2002) señalan al triptófano como primer limitante para el desarrollo y supervivencia en larvas de *L. vannamei*, por lo que mencionan que la arginina es considerado el segundo aminoácido limitante. El bajo porcentaje de estos dos últimos aminoácidos en los cultivos de *C. muelleri* producidos en tratamientos experimentales pudo influir en la baja supervivencia y poco desarrollo de las larvas, y por lo tanto repercutir en la ración necesaria para cubrir los requerimientos de mantenimiento y todas las funciones asociadas con el metabolismo.

El incremento en talla obtenido las larvas de camarón alimentadas con microalgas producidas en los dos tratamientos fue significativamente diferente. Estas discrepancias se pueden atribuir a la diferencia encontrada en la cantidad del ácido eicosapentanoico (20:5 n-3) y decosaheptaenoico (22:6 n-3) que aportan las microalgas al ser utilizadas



como alimento. La suma de estos ácidos grasos en las microalgas cultivadas en el medio agrícola resultó superior a los encontrados en las cultivadas en el medio “f/2”. Soler-Jaramillo (1996) afirma que los anteriores ácidos grasos son los que favorecen buena tasa de crecimiento y mayor índice de mudas en camarón, reafirmando esta aseveración González-Félix *et al.*, (2003), quienes obtuvieron un mayor peso ganado en las larvas de *L. vannamei* cuando fueron alimentadas con una dieta con alto contenido de estos ácidos grasos de cadena larga.

Cuando se consideran los índices de supervivencia, el incremento de masa e incremento de talla de larvas de camarón por separado se podría prestar a una interpretación errónea de los resultados obtenidos. Por lo anterior la utilización del índice de rendimiento resulta ser un índice más confiables para evaluar el efecto del tipo de alimento suministrado a las larvas de camarón, ya que se combina varios índices (ganancia en masa, el tiempo transcurrido y supervivencia). Los resultados de los índices de rendimiento obtenidos (0.44 y 0.58) no presentaron diferencias significativas entre el medio “f/2” y el medio agrícola, por lo que el índice de desarrollo podría incrementarse en laboratorios productores de poslarvas de camarón mediante el uso del medio agrícola. Los valores de rendimiento evaluados durante éste experimento resultaron superiores a los reportados por Palomino *et al.*, (2001), quienes encuentran valores de 0.22 ( $\text{mg}^{-1}$  día x % supervivencia) para poslarvas de *L. setiferus* mantenidas a una densidad de 50 poslarvas/ $\text{m}^2$  sin recambio de agua. Esta diferencia pueden ser atribuida a que las larvas de camarón utilizadas por esos autores y las mantenidas durante éste experimento, no se encontraban en el mismo estadio de desarrollo.

## V. CONCLUSIONES

- Se conformó que la composición de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas en células de *Chaetoceros muelleri* mantenida en cultivos semicontínuos, fue similar al mantenerse en un medio agrícola respecto a la obtenida en el medio “f/2”.
- La proporción de aminoácidos, ácidos grasos saturados, monoinsaturados y polinsaturados totales fue similar en *Chaetoceros muelleri* cultivada en el medio agrícola y el medio “f/2”.
- Aunque la proporción de ácidos grasos polinsaturados totales fue similar en ambos medios de cultivo, sin embargo, la concentración del ácido graso eicosapentanóico fue mayor para los cultivos mantenidos en el medio agrícola, mientras que para el ácido docosahexanóico fue menor en las microalgas cultivadas en el medio agrícola.
- Se confirma que es posible realizar cultivos de la microalga *Chaetoceros muelleri* mediante el uso de nutrientes mayores (nitratos, fosfatos y silicatos), obtenidos a partir de fertilizantes agrícolas.
- La calidad de las larvas al igual que su rendimiento no se vio afectada al alimentarse con la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada con fertilizante agrícola.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda llevar a cabo investigaciones encaminadas a la evaluación de variaciones del tamaño de las células, mediante modificación en la concentración de los nutrientes.
- Se recomienda evaluar los cambios en la composición de aminoácidos y ácidos grasos en *Chaetoceros muelleri* cultivada en medios agrícolas bajo diferentes intensidades de luz, temperatura, salinidad y aportes de diferentes formas químicas de nitrógeno.
- Se recomienda utilizar una misma técnica para la determinación de proteínas totales y evitar variaciones ocasionadas por la diferencia de métodos.
- Se sugiere buscar la ración óptima de ácidos grasos altamente insaturados (20:5 n-3 y 22:6 n-3) para ser suministrados en el alimento de estadios larvales de camarón.

## LITERATURA CITADA

- Akiyama, D., Dominy, W.G. y Laurence A. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. En: Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Tan (Eds.). Tailandia e Indonesia. 80-98 p.
- Akiyama, D. 1992. Future considerations for shrimp nutrition and the aquaculture feed Industry. En: Special Session on Shrimp Farming. The World Aquaculture society. Meetings. Louisiana, E.U.A. 198-211 p.
- Arredondo-Figueroa, J. L. 1993. Fertilización y fertilizantes: su uso y manejo en la acuicultura. Impresiones y Grabados M. Serna, S.A. de C.V. México. 202 p.
- Azad, S. A., Chong, V. C. y Vikineswary, S. 2002. Phototrophic bacteria as feed supplement for rearing *Penaeus monodon* larvae. Journal of the World Aquaculture Society 33(2): 158-167.
- Báez-Dueñas, M., López-Elías, J.A., Gringas-Alvarado, L. y Galaviz-Moreno, S. 1994. Nutrición. Capítulo IV. En: Camaronicultura. AGT Editor S.A. México. 119-159 p.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. Journal Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- Brock, J. 1992. Current diagnostic methods for agents and diseases of farmed marine shrimp. En: Fulks W. y Marn K.L. (Eds.). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute. Honolulu, Hawaii. 209-231 p.

- Brown, M. R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Mar. Biol. Ecol.* 145: 79-99.
- Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J. y Miller, K.A. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. of Phycol.* 32: 64-73.
- Carbajal-Miranda, M. J. 2002. Evaluación del crecimiento de postlarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*. Swaison, 1822) utilizando como alimento dietas monoespecíficas y mixta de diatomeas bentónicas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Ensenada Baja California. México. 81 p.
- Carlucci, A. F. y Silbernagel S.B. 1969. Effect of vitamin concentrations on growth and development of vitamin-requiring algae. *J. Phycol.* 5: 64-67.
- Cabrero-Nuñez, F. 1994. Efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo en la calidad celular de *Chaetoceros muelleri* (Lemmerman) Bacillariophyceae en cultivos estáticos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California. 36 p.
- Chiaverina, J. 1972. Techniques d' extraction et analyses des lipides. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-sur-Mer. Notes de Travail 12: 12 p.
- Chuang, L. J. 1990. Nutrient requirements, feeding and culturing practices of *Penaeus monodon*: a review. Roche. Switzerland. 61 p.
- Clarke, A. y Wickins, J. 1980. Lipid content and composition of cultured *Penaeus merguensis* fed white animal food. *Aquaculture* 20: 17-27.

- Clifford, H.C. 1992. Marine shrimp pond management: a review. En: Wyban, J., (Ed.). 1992. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, 110-137 p.
- Colvin, L.B. y Brand, C.W. 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life stages with compounded diets in a controlled environment system. Proc. World Maricult Soc. (8): 821-840 p.
- De la Cruz, S. A. 1989. La selección del tamaño de las partículas alimenticias por las larvas del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. En: Larvicultura de Camarones Peneidos. Comunidad Iberoamericana. 1: 151-158.
- De Nogales-Pérez, C. y Santos-Perea L. 1995. Cultivo de camarón en estanques. Vol. III. En: Fundamentos de Acuicultura Marina. Instituto Nacional de la Pesca y Acuicultura. Santa fé Bogotá. Colombia. 61-103 p.
- Díaz-Iglesias, E., Brito-Pérez, R. y Báez-Hidalgo, M. 1991. Cría de postlarvas de langosta *Panulirus argus* en condiciones de laboratorio. Memorias del Taller Internacional sobre Ecología y Pesquerías de Langosta. Revista de Investigaciones Marinas de Cuba 12(1-3): 323-331.
- Droop, M. R. 1975. The chemostat in mariculture. 10<sup>th</sup> European symposium of Marine Biology. Ostend. Belgium. Sep. 1: 71-93 p.
- D'Souza, M. L. y Lomeragan, N. R. 1999. Effects of monospecific and mixed algal diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn larvae (*Penaeus sp.*). Mar. Biol. 133(4): 621-633.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28: 350-356.
- Embadi, D. y Berland, B. R. 1989. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. *Marine Chemistry.* 26: 215-225.
- Enright, C. T., Newkirk, G. F., Craigie, J. S. y Castell, J. D. 1986, Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* schutt of varied chemical composition, *Mar. Biol. Ecol.* 96: 15-26.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, J., Planas M., Campos, M. J. y Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture.* 83: 17-37.
- Fogg, G. E. y Thake, B. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology.* University of Wisconsin Press. Madison. 269 p.
- García-Arellano, H. y R. Vázquez-Duhalt. 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. *Biotechnología* (3): 77-88.
- Gaxiola-Cortés, M. G., Gallardo, P. P., Ravallec, R., Durruty, C., García, T., Cuzon, G., Wormhoudt, A. V. y Pedroza, R. 2002. Avances en el uso de alimentos artificiales en la larvicultura del camarón. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en*

- Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Septiembre. Cancún. México. 227-242 p.
- González-Félix, M. L., Pérez-Velásquez, M. y Laurence, A. L. 2003. El valor nutricional de los ácidos grasos y su efecto en el crecimiento y sobrevivencia de *Litopenaeus vannamei*. Panorama Acuícola. 8 (3):10-11.
- González-Rodríguez, E. S. y Maestrini, S. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. Aquaculture. 36: 245-256.
- Gracida-Valdepeña, M. 1999. Producción de tres especies de diatomeas utilizando una mezcla de fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California, México. 108 p.
- Guary, M., Kanazawa, A., Tanaka, N. y Ceccaldi, H.J. 1976. Nutritional requirements of prawn. 6. Requirements for ascorbic acid. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 25. 53-57 p.
- Guillard, R.L.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. 29-60. En: M.L. Smith y M.H. Chanley (Ed.). Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum Press, New York. 338 p.
- Guillaume, J. 1997. Proteín and amino acids. En: L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.). Crustacean Nutrition. World Aquaculture Society. Baton Rouge, 26-50 p.
- Hach, C. C., Brayton, S. V. y Kopelove, A. B. 1985. A powerful Kjeldahl nitrogen method using peroxymonosulfuric acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 13(6):1117-1123.



- Iriarte, F. y Buitrago, E. 1990. Determinación de la concentración y fuentes óptimas de nitrógeno en cultivos de *Chlorella sp.* usados como inóculo de cultivos masivos. Edimar. Venezuela. 198: 39-45p.
- Kanasawa, A. 1989. Protein requirements of Penaeid shrimp. En: Advances in Tropical Aquaculture. Workshop at Tahiti. French Polynesia. Actes de Colloques # 9. 261-270 p.
- Kaplan, D., Richmond, A. Dubisky, Z. y Aronson, J. 1986. Algal nutrition. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. A.E. Richmond (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. 147-198 p.
- Kinne, O. 1976. Cultivation. John Wiley and Sons. Marine Ecology. London. 3(1): 367-465.
- Kureshy, N. y Davis, D. A. 2002, Protein requirement for maintenance and maximum weight for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 204: 125-143.
- Lafarga-De la Cruz, F. 1997. Relación entre el consumo de nutrientes y los cambios en la composición bioquímica de *Rhodomonas sp.* cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. 50 p.
- Lobban, C. S., Harrison, P. y Duncan, M. J. 1985. The Physiological Ecology of Seaweeds. Cambridge University Press. New York. 237 p.
- López-Elías, J. A. 1990. Cultivos semicontínuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados; Evaluación de técnicas analíticas y de producción. Tesis

- de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. México. 163 p.
- López-Elías, J. A. y Voltolina, D. 1993. Cultivos semicontínuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas* 19(2): 169-180.
- Lowry, O. H. Rosebrough N. J. Farr A.L. y Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Biochemistry* 193: 265-275.
- Malara, G. y Charra, R. 1972. Dosages des proteines partiulaires selon la méthode de Lowry. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail. 6: 11 p.
- Martínez-Córdova, L. R. 1994. Camaronicultura: bases técnicas y científicas para el Cultivo de Camarones Peneidos. AGT Editor S.A. México. 233 pp.
- Martínez-Fernández, E. 1998. Medios alternativos y evaluación de costos para el cultivo de la microalga *Nannochloropsis sp.* como alimento del rotífero *Brachionus plicatilis* (Muller, 1786). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 90 p.
- McAnally-Salas L. S. Ocampo-Aranda F. J. y García-Pamanes L. E. 1992. Efecto de la microalga *Pavlova lutheri* (Droop) Hibberd cultivada con fertilizantes agrícolas en el crecimiento y supervivencia de larvas y poslarvas del mejillon *Mytilus edulis* (L.). *Ciencias Marinas* 18 (4): 57-74.
- McCarthy, J.J. 1972. The uptake of urea by natural populations. *Limnol. Oceanogr.* 17:738-748.

- Medina-Reyna, C.E. y Cordero-Esquivel, B. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* Lemerman, mantenida en cultivo estático con un medio comercial. Universidad del Mar. Ciencia y Mar. 5 (2): 19-25.
- Memdenhall, W., Wackerly, D. y Scheaffer, R. 2001. Estadística matemática con aplicaciones. Segunda Edición. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V. México. 772 p.
- Nasir, K., y Allen, D. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 204:125-143.
- Ochoa-Solano, L. 2001. Utilización de fuentes no convencionales microalgas en la nutrición de etapas tempranas de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada Baja California, México. 62 p.
- Pacheco-Vega, J. M. 2001. Laboratorio de producción de microalgas: Análisis de costos de producción con variables en el medio de cultivo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 54 p.
- Palomino, G., Contreras, F., Sanchez, A. y Rosas, C. 2001. Density and water exchange-dependent growth and survival of *Litopenaeus setiferus* postlarvae. Journal of the World Aquaculture Society 32 (2): 167-176.
- Pande, S. V., Khan, R. P. y Venkitasubramanian, T. A. 1963. Microdeterminations of lipids and serum total acids. Analyt Biochem. 6: 415-423.

- Parsons, T. R., Stephens, K. y Strickland, D.H. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada. 18:1001-1016.
- Paasche, E. 1973. Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. II. Silicate-uptake kinetics in five diatom species. Mar. Biol. 19: 262-269.
- Pisman, T. I., Pechurkin, N. S. y Somova, L. A. 2001. Competition between links in “producer-consumer” trophic chain in aquatic closed system with spatially separated components. Advances in Space Research 27 (9): 159-1603.
- Preuder, G. y Bolton, E. 1978. System configuration an performance: Bivalve molluscan maricultura, Proc. Ann. Meeting World Maric. Soc. 9: 747-759 p.
- Sáenz-Gaxiola, L. M. 2002. Efecto de la temperatura e intensidad de la luz sobre la composición de ácidos grasos de tres microalgas marinas utilizadas comúnmente para la alimentación de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Ensenada Baja California, México. 92 p.
- Sánchez-Saavedra, M. P. 1986. Diseño de un biodigestor aeróbico de alimentación periódica y utilización de los nutrientes producidos para el cultivo de microalgas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Ensenada Baja California, México. 120 p.
- Sánchez, R., 1986. Rearing of mysis stages of *Penaeus vannamei* feed cultured algae of three species. Aquaculture 58: 139-144.

- Santos-Perea, L. 1995, Cultivo de camarones en estanques. En: Fundamentos de Acuicultura Marina. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Colombia. 2:62-104 p.
- Simental-Trinidad, J. A. 1999. Producción masiva de diatomeas bentónicas empleando fertilizantes agrícolas y su efecto en la calidad de biomasa y en la composición proximal. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Ensenada Baja California. México. 115 p.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343 pp. En: J.R. Stein (Ed.). Handbook of Phycological Methods. Culture methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp.
- Soler-Jaramillo, M. P. 1996. Nutrientes esenciales. Capítulo III. En: Fundamentos de nutrición y alimentación en acuicultura. Serie Fundamentos. Colombia. 3: 53-116.
- South, G.R. y A. Whittick. 1987. Introduction to Phycology. Blackwell Scientific Publications, London. 341 pp.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. Biometria. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica. H. Blume Ediciones, Madrid. 832 p.
- Sunda, W. G. y Hunstman, S. A. 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. Nature. 390: 398-392.
- Syrett, P. J. 1981. Nitrogen Metabolism of Microalgae. En: Platt, T. (Ed.). Physiological Bases of Phytoplankton Ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 210: 182-210 p.

- Teshima, S. A. y Kanazawa, A. 1986, Dietary value of several proteins and supplemental amino acids for larvae of the prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 51: 225-235.
- Tobias-Quinitio, E. y Villegas, C. T. 1982. Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon* Fabricius larvae feed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture* 29: 253-260.
- Timmermans K. R., Davey M. S., Wagt B. V., Snoek J., Geider R., Veldhuis M. J., Gerringa L. J. y Baar H. J. 2001. Co-limitation by iron and light of *Chaetoceros brevis*, *C. dictyota* and *C. calcitrans* (Bacillariophyceae). *Marine Ecology* 217: 287-297.
- Trecece, G. y Fox, J. 1993. Design Operation and Training Manual for an Intensive Culture Shrimp Hatchery (With Emphasis on *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei*). Texas A & M University Sea Grant College. Program. Bryan. Texas, E.U.A. Pub. 93-505. 187 p.
- Ukeles, R. 1976. Cultivation of Plants; Unicellular Plants. En Kinne O. (Ed.), *Marine Ecology. Cultivation*. John Wiley and Sons. London. 3(1): 367-466 p.
- Valenzuela-Espinoza, E., Gendrop-Funes, V., Pérez-Castañeda, R. y Wilburn-González J. G. 1999. Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone) Alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas* 25(3): 423-437.
- Villalón, J.R. 1991. Practical Manual for Semi-intensive Commercial Production of Marine Shrimp. Texas A & M University Sea Grant College Program, College Station, Texas. TAMU-SG-91-SOL. 104 p.

- Wheeler, P.A. 1983. Phytoplankton Nitrogen Metabolism. En: E.J. Carpenter y D.G. Capone (Ed.). Nitrogen in the Marine Environment. Academic Press, New York. 309-346 p.
- White, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231-241.
- Zar, J.H. 1984. *Bioestatistical Analysis*. Prentice-Hall International, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, USA. 718 p.
- Zhukova N.V. y Aizdaicher, N.A. 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39(2): 351–356.

## ANEXO

### PRUEBAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS

#### A) Análisis de covarianza

Modelo I de regresión lineal simple:

$$Y_i = \alpha + \beta x_i + \varepsilon_i$$

$$\varepsilon_i \approx N\left(0, \sigma_{xy}^2\right)$$

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

$$F = \frac{\left(\frac{SS_c - SS_p}{K - 1}\right)}{\left(\frac{SS_p}{DF_p}\right)}$$

$$SS_c = C_c - \frac{B_c^2}{A_c}$$

$$A_c = \sum_{i=1}^k A_i$$

$$B_c = \sum_{i=1}^k B_i$$

$$C_c = \sum_{i=1}^k C_i$$

$$SS_p = \sum_{i=1}^k SS_i$$

$$SS_i = C_i - \frac{B_i^2}{A_i}$$

En donde:

$i = 1 \dots n$ .

$n$  = Número de observaciones.

$\varepsilon$  = Error aleatorio.

$\alpha$  = Ordenada al origen o intercepto.

$\beta$  = Pendiente de la recta.

$y_i$  = Respuesta o variable dependiente.

$x_i$  = Predictor o variable independiente.

$SS_c$  = Suma de cuadrados de los residuales acumulados.

$SS_p$  = Suma de cuadrados de los residuales acumulados.

$K-1$  = Grados de libertad.

$DF_p$  = Grados de libertad de la regresión común.



$$A_1 = \sum x^2 (\text{regresión1})$$

$$B_1 = \sum xy (\text{regresión1})$$

$$C_1 = \sum y^2 (\text{regresión1})$$

### B) Prueba de significancia beta ( $\beta$ )

$$H_0 = \beta = 0$$

$$S_b = \sqrt{\frac{S^2_{Y \cdot X}}{\sum x^2}}$$

$$S^2_{Y \cdot X} = \frac{SS_{\text{residual}}}{DF_{\text{residual}}}$$

$$SS_{\text{residual}} = SS_{\text{total}} - SS_{\text{regresión}}$$

$$SS_{\text{total}} = \sum y^2$$

$$SS_{\text{regresión}} = \frac{(\sum xy)^2}{\sum x^2}$$

En donde:

$\beta$  = Pendiente o inclinación de la recta.

SS = Suma de cuadrados totales.

DF = Grados de libertad.

$\sum x^2$  = Suma de cuadrados.

### B) Análisis de varianza de dos vías (ANOVA).

Modelo I para efectos entre ambos tratamientos:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$H_0 = \mu_{11} - \mu_{12} = \mu_{21} - \mu_{22}$$

$$F = \frac{A \times Bms}{Error(ms)}$$

En donde:

$\mu$  = Media paramétrica de la población.

$\alpha_i$  = Efecto del tratamiento fijado del  $i$ -ésimo grupo de tratamiento A.

$\beta_j$  = Efecto del tratamiento fijado del  $j$ -ésimo grupo de tratamiento B.

$$A \times ms = \frac{SS}{DF}$$

$$\frac{SS}{DF} = \frac{cellSS - FactorA(SS) - FactorB(SS)}{(a-1)(b-1)}$$

$$cellSS = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \left( \sum_{t=1}^n X_{ijt} \right)^2 - C}{n}$$

$$N = abn$$

$$FactorA(SS) = \frac{\sum_{i=1}^a \left( \sum_{j=1}^b \sum_{t=1}^n X_{ijt} \right)^2 - C}{bn}$$

$$FactorB(SS) = \frac{\sum_{j=1}^b \left( \sum_{i=1}^a \sum_{t=1}^n X_{ijt} \right)^2 - C}{an}$$

$$SS_{total} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{t=1}^n X_{ijt}^2 - C$$

$$Error(ms) = \frac{SS}{DF}$$

$$\frac{SS}{DF} = \frac{SS_{total} - cellSS}{ab(n-1)}$$

#### D) Prueba *a posteriori* Studen-Newman Keuls.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 \dots \mu_k$$

$$q = \frac{\bar{X}_B - \bar{X}_A}{SE}$$

$$SE = \sqrt{\frac{S^2}{n}}$$

En donde:

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Es el efecto de interacción en el subgrupo que representa el  $i$ -ésimo grupo de factor  $A$  y el  $j$ -ésimo grupo del factor  $B$ , y  $\varepsilon_{ijk}$  es el termino de error.

$a$  = Número de niveles en factor  $A$ .

$b$  = Número de niveles en factor  $B$ .

$c$  = Número de niveles en factor  $C$ .

$ms$  = Cuadrados de medios.

$SS$  = Suma de cuadrados totales.

$DF$  = Grados de libertad.

$\Sigma x^2$  = Suma de cuadrados.

En donde:

$\bar{X}_A$  = Media de la muestra  $A$ .

$\bar{X}_B$  = Media de la muestra  $B$ .

$S^2$  = Desviación estándar al cuadrado.

$SE$  = Error estándar.

**E) Prueba t-student.**

$$H_0 = \mu_0 = \mu_1$$

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{S / \sqrt{n}}$$

En donde:

$\mu$  = Media de la muestra.

$S$  = Desviación estándar.

$\bar{x}$  = Promedio de las  $n$  observaciones.

$n$  = Número de observaciones.