

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO, CONSUMO DE NUTRIENTES Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DE *Porphyridium
cruentum* (Rhodophyceae) CULTIVADA CON MEDIO F/2 Y FERTILIZANTES AGRÍCOLAS.**

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

GONZÁLEZ MUÑOZ JAIME ALBERTO

Ensenada, Baja California, México, Febrero del 2006.

Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente las microalgas marinas han adquirido gran importancia por su utilización en la acuicultura ya que son parte fundamental en la alimentación de larvas, juveniles y adultos de moluscos bivalvos así como en los primeros estadios de peces y crustáceos (Reitan *et al.*, 1997; Brown, 1997); sin embargo sus aplicaciones son más extensas ya que bajo ciertas condiciones de cultivo pueden acumular altas concentraciones de compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, vitaminas, polisacáridos, enzimas y pigmentos (Arredondo-Vega y Vázquez-Duhalt, 1991). Se ha reportado además que, las microalgas son fuente natural de varios productos con aplicaciones en el área de la medicina, incluyendo sustancias que inhiben la infección y/o replicación viral (Damonte *et al.*, 1990).

Porphyridium cruentum es una de las microalgas que actualmente ha despertado un gran interés por su característica de producir compuestos bioactivos. Es unicelular, carece de pared celular, la membrana está rodeada de una cápsula de polisacáridos (el cual es utilizado comercialmente), sus células son esféricas, presentan un tamaño de 10 micras de diámetro, puede presentarse solitaria o en colonias irregulares, esta microalga contiene pigmentos accesorios (el de mayor importancia la ficoeritrina), que le da su color rojo característico, además acumula ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el ácido araquidónico (C20:4n-6) y el ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3), el contenido de estos

llega a ocupar el 36% del total de los ácidos grasos (Servel *et al.*, 1994), su concentración de proteínas varia del 38 al 39%, su nivel de carbohidratos se ubica en el intervalo del 40 al 57% y el contenido de lípidos totales está cerca del 14% del peso seco (Becker, 1994), además contiene enzimas como la oxido dismutasa y lipasas con aplicación terapéutica (Sada *et al.*, 1989), vitamina K y una gran cantidad de carotenoides (Antia *et al.*, 1970).

Esta especie es considerada el género más primitivo de las Rhodophytas, fue nombrada así por su color púrpura, los primeros estudios relacionados con la morfología, taxonomía y citología de esta especie fueron realizados por Kylin en 1937. Esta microalga se le puede encontrar en forma natural sobre rocas y suelos de áreas húmedas. Pringsheim (1949) observó que al crecerla en un medio de cultivo líquido elaborado a base de agua de mar, obtenía un crecimiento bueno lo que le llevó a sugerir el origen marino de esta especie. Sin embargo, no fue hasta 1960 que Starr logró aislarla de ambientes marinos. Debido a la capacidad que presenta esta microalga de crecer en un amplio intervalo de salinidad y pH, se ha demostrado su gran tolerancia y adaptación para crecer y sobrevivir en ambientes diversos. Se han realizado trabajos enfocados al conocimiento de esta especie, encontrándose que es capaz de crecer en medios de cultivo elaborados a base de agua de mar artificial (Jones *et al.*, 1963).

La ubicación taxonómica de *P. cruentum* ha presentado varias inconsistencias, a través de los años se le ha situado en siete familias: Palmellaceae, Porphyraceae, Protococcaceae, Chroococcaceae, Scenedesmaceae, Cyanophyceae y Bangiaceae, actualmente se ubica en la división Rhodophyta, clase Rhodophyceae.

En 1962, Golueke y Oswald puntualizaron la importancia de *P. cruentum* de ser producida a gran escala, por su capacidad para producir polisacáridos de naturaleza sulfatada; otros intentos para producirla masivamente fueron desarrollados por Gudin *et al.* (1984), quienes usaron diferentes reactores tubulares de vidrio de 64 mm de diámetro con un volumen de 600 litros de cultivo con un área total de 10 m². Estimaron que el reactor podría producir hasta 42 toneladas por año de biomasa. El Instituto de Investigaciones del Desierto con sede en Israel empezó a cultivar *Porphyridium* en estanques exteriores y sus resultados indican que esta especie puede ser cultivada por largos periodos sin tener una contaminación significativa por otros organismos (Vonshak *et al.*, 1985). Reboloso *et al.* (2000) realizaron un estudio detallado de la composición proximal de *P. cruentum* cultivaron esta especie en reactores tubulares exteriores de 0.220 m³, controlando la temperatura así como el pH mediante la inyección de CO₂, obteniendo como resultado un 32 % de carbohidratos, 35 % de proteínas, así como un contenido de lípidos totales del 14% en peso seco. Concluyen que el crecimiento y la composición proximal están influenciados por el tiempo de residencia en el reactor, así como por la irradiancia externa. Bermejo *et al.* (2002) compararon cultivos masivos en reactores tubulares exteriores e interiores de 0.220 m³ con el objetivo de simplificar y economizar la extracción la ficoeritrina. Concluyen que la composición proximal y el contenido de ficoeritrina fue mayor en los cultivos que permanecieron al interior del laboratorio, así mismo el método que proponen para la extracción de ficoeritrina tiene un costo del 28% menor al de la metodología convencional.

Debido a que esta especie produce y acumula metabolitos de interés, se han desarrollado diversos trabajos que estudian variables en el cultivo como son la calidad y cantidad de luz (Vonshak *et al.*, 1985; Arad, 1987; Sada *et al.*, 1989; Lee y Bazin, 1991; Friedman *et al.*, 1991), encontraron que al aumentar la irradiancia en un intervalo de 60 a 180 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la tasa de crecimiento se incrementa sin afectar la producción del ácido araquidónico (C20:4), además un incremento en la irradiancia induce un incremento en la producción del exopolisacarido sulfatado (EPS). La temperatura es otra variable que afecta la producción de metabolitos en *P. cruentum*. Estudios realizados (Vonshak *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1985 y Dermoun *et al.*, 1992), encuentran que un aumento de 18 °C a 32 °C afecta de forma negativa la producción del ácido araquidónico (C20:4), aunque tiene un efecto positivo en la tasa de crecimiento.

En las últimas décadas, *P. cruentum* ha atraído la atención de distintos grupos de investigación, principalmente por la obtención de bioproductos tales como polisacáridos, el ácido araquidónico y ficoeritrina (Arredondo-Vega y Vazquez-Duhalt, 1991). Estudios realizados por Talyshinky *et al.* (2000), muestran que los polisacáridos extraídos de *P. cruentum* tienen una acción inhibitoria viral efectiva en la replicación celular del virus (MuLV) y la transformación celular del virus sarcoma (MuSV) de las células en cultivo al añadirse 2 horas antes de infección, además la adición del polisacárido después de la infección redujo el número de células infectadas y concluyen que la adición del polisacárido puede afectar estadios tempranos en la replicación del ciclo del virus. Por otra parte Guzman-Murillo y Ascencio (2000), indican que los polisacáridos extraídos de esta especie han sido considerados como una alternativa para prevenir infecciones microbianas

en animales producidos por *Vibrio campbellii*, *Vibrio ordalii*, *Streptococcus saprophyticus* y *Aeromonas veronii* y en humanos por *Helicobacter pylori*.

En las microalgas una fracción funcionalmente importante de la composición proximal esta constituida por sus pigmentos fotosintéticos, los cuales se dividen en tres grupos principales; las clorofilas, los carotenoides y las ficobilinas (Tabla I), entre estos los más importantes son las clorofilas, cuya acumulación, activación y funcionalidad están coordinadas en los tilacoides para la actividad fotosintética, considerándolas conjuntamente con los carotenoides, estos pigmentos pueden representar entre el 0.5 y el 3.5% del peso seco de las células (Becker, 1994).

Los estudios mencionados en la Tabla 1 han encontrado que tanto la luz como la temperatura modifican la composición pigmentaria de las distintas especies de microalgas y aunque los diversos autores no encontraron diferencias significativas en la mayoría de los casos, es importante señalar que este resultado puede estar relacionado estrechamente con las características propias de cada especie, así como a la capacidad de captación de energía en un determinado intervalo de longitudes de onda. Por lo cual se debe tener en cuenta que la respuesta fisiológica de una misma especie puede ser modificada por la composición química del medio y el nivel de irradiancia.

Tabla I. Estudios sobre pigmentos realizados en diferentes especies de fitoplancton

Especie	Medio de cultivo	Condiciones de cultivo	Pigmento	Dif	Referencia
<i>Porphyridium</i> sp. <i>Porphyridium aerugineum</i> .	Jones <i>et al.</i> (1963)	Temperatura: 24 °C Irradiancia: 75, 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Clorofila <i>a</i>	NS	Friedman <i>et al.</i> (1991)
<i>Tetraselmis suecica</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Isochrysis</i> .	Fabregas <i>et al.</i> (1985).	Temperatura: 16 y 20 °C. Irradiancia: 40 y 80 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH 7.6	Clorofila <i>a, b y c.</i>	NS	López-Muñoz <i>et al.</i> (1992)
<i>Chaetoceros</i> sp.	F Guillard y Ryther. (1962)	Temperatura: 23 °C Irradiancia: 199 y 565 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH 7.5	Clorofila <i>a</i>	NS	Sanchez-Saavedra y Voltolina (1994)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Hemericks (1973)	Temperatura: 20 °C Irradiancia: 101 y 89 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH 7.6	Clorofila <i>a y b.</i>	DS	Reboloso-Fuentes <i>et al.</i> (2000)
<i>Rhodomonas</i> sp.	F/2 Guillard (1975)	Temperatura: 20 °C Irradiancia: 52, 68, 103, 142 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. pH 7.6.	Clorofila <i>a y c.</i>	DS	Lafarga-de la Cruz (2000)
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Morel <i>et al.</i> (1979)	Temperatura: 20 °C Irradiancia: 6, 14, 20, 37, 108 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Clorofila <i>a</i>	NS	Strzepek y Price (2000)

DS= Diferencia Significativa. NS= Diferencia No Significativa.

Aunque los estudios antes mencionados han descrito que tanto la luz como la temperatura modifican los componentes celulares, es importante continuar con las investigaciones en el campo de *P. cruentum*, sobre todo acerca del uso de fuentes alternativas de nutrientes económicos tales como fertilizantes agrícolas, para el mantenimiento de cultivos masivos de microalgas.

El cultivo de microalgas con medios alternos es una actividad que se ha desarrollado desde hace más de medio siglo, la mejora de técnicas y medios de cultivo es uno de los objetivos primordiales en la acuicultura, por lo que controlar la composición del medio empleado en la producción de microalgas es determinante (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1994).

Actualmente existen formulaciones de medios de cultivo para microalgas marinas, que van desde mezclas sencillas basadas en la solución de Miquel-Matute (Kinne, 1976), la cual solo incluye algunos nutrientes mayores, hasta mezclas complejas (López-Elías y Voltolina, 1993; Valenzuela *et al.*, 1999; Pacheco-Vega, 2001).

En cultivos de microalgas a gran escala, el costo de elaboración del medio de cultivo es uno de los principales limitantes debido a que en general los reactivos que se utilizan se obtienen a precios elevados y en ocasiones es necesario importarlos. Por lo tanto, se ha recomendado el uso de medios preparados con fertilizantes agrícolas que se consideran más económicos. Se han realizado diferentes investigaciones con medios preparados con fertilizantes agrícolas (Tabla II), con los cuales se obtienen tasas de crecimiento y una composición bioquímica similar a la obtenida con el medio tradicional f/2 de Guillard (1975). Además, estos autores indican que el uso de fertilizantes agrícolas tiene un costo de elaboración menor (30%), que aquellas cultivadas en medio f/2.

Tabla II. Estudios de composición proximal con fertilizantes agrícolas en distintas especies de fitoplancton

Especie	Medio de cultivo	Nutriente mayor	Conc. (μM)	Condición de cultivo	Dif .	Ref.
<i>Chaetoceros</i> sp. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Tetraselmis</i> sp. <i>Pavlova lutheri</i>	f Guillard y Ryther.	NaNO_3	1760	Temp: 24 °C Irradiancia: 340 μmol quanta $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH 7.2	NS	López-Elías y Voltolina (1993)
		NaH_2PO_4	72			
		Na_2SiO_3	107			
	Fert. agrícola	NH_4SO_4	1000			
		NaH_2PO_4	360			
	Na_2SiO_3	53.50				
<i>Chaetoceros muelleri</i>	f/2 Guillard	NaNO_3	883	Temp: 22-24 °C Irradiancia: 100 μmol quanta $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	NS	Valenzuela- Espinoza <i>et al.</i> (1999)
		NaH_2PO_4	36.30			
		Na_2SiO_3	107			
	Fert. agrícola	NH_4NO_3	882			
		P_2O_5	39.45			
	Na_2SiO_3	114				
<i>Thalassiosira weissflogii</i> y <i>Chaetoceros muelleri</i> .	f/2 Guillard	NaNO_3	883	Temp: 24 °C Irradiancia: 100 μmol quanta $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH 7.0	NS	Gracida- Valdepeña (1999)
		NaH_2PO_4	36.30			
		Na_2SiO_3	107			
	Fert. agrícola	NH_4NO_3	882			
		$\text{CO}(\text{NH}_2)$				
	H_3PO_4	36.20				
	Na_2SiO_3	114.90				
<i>Navicula incerta</i> , <i>Nitzschia therrimalis</i> y <i>Nitzschia lavis</i> .	f/2 Guillard	NaNO_3	883	Temp: 21 °C Irradiancia: 150 μmol quanta $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH 8.7	NS	Simental- Trinidad <i>et al.</i> (2001)
		NaH_2PO_4	36.30			
		Na_2SiO_3	107			
	Fert. agrícola	NH_4NO_3	882			
		$\text{CO}(\text{NH}_2)$				
	H_3PO_4	36.20				
	Na_2SiO_3	114.90				
<i>Navicula incerta</i> , <i>Nitzschia commutata</i> y <i>Tetraselmis gracilis</i> .	f/2 Guillard	NaNO_3	883	Temp: 19°C Irradiancia: 108 μmol quanta $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH 7.4	NS	Montes- Macias (2004)
		NaH_2PO_4	36.30			
		Na_2SiO_3	107			
		P_2O_5	39.45			
		Na_2SiO_3	114.90			

NS= Diferencia No significativa

La concentración de los macro y micro nutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro, principalmente) son factores que afectan el crecimiento, las funciones metabólicas y la composición proximal microalgal. Usualmente los fertilizantes agrícolas contienen diversas formas de nitrógeno (amonio, urea, nitratos) que pueden ser accesibles para las microalgas, además, algunas impurezas provenientes de los fertilizantes, ya sea en forma de minerales, metales traza y quelantes pueden actuar como micronutrientes, complementando la composición del medio.

De los elementos esenciales aportados por los fertilizantes agrícolas se encuentran el nitrógeno y el fósforo, dichos elementos desempeñan un papel importante en varios procesos fisiológicos del fitoplancton. Debido a que las microalgas solo consumen el nitrógeno y el fósforo en una relación N:P que va de 10:1 a 16:1 átomos (González-Rodríguez y Maestrini, 1984), a los fertilizantes que no tengan esta relación de compuestos se les puede añadir el nutriente faltante hasta alcanzar la proporción adecuada, existen fertilizantes agrícolas que no contienen los elementos necesarios pero pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno y fósforo (Fabregas *et al.*, 1985).

Las investigaciones realizadas sobre la asimilación de nitrógeno en las microalgas han demostrado que estas tienen preferencia después del amonio por los nitratos y en última instancia por la urea (Levasseur *et al.*, 1993). La proporción de los iones nitrato, nitrito y amonio dentro de las células y sus concentraciones varían durante las fases del crecimiento microalgal, siendo mayores los valores de nitrógeno intracelular inorgánico en la fase de crecimiento logarítmico y en la fase estacionaria (Lourenco *et al.*, 1998). Por lo tanto conociendo, la composición bioquímica microalgal cultivada en un medio no limitado y la proporción de sus elementos en el medio de cultivo, se puede determinar cual elemento

limitará el crecimiento y que compuesto producirá la célula cuando haya una limitación de nutrientes (Harrison *et al.*, 1990).

Últimamente se han realizado estudios que analizan la respuesta a la limitación de nitrógeno, fósforo y hierro, entre otros y han obtenido respuestas adaptativas en el aparato fotosintético (Turpin, 1991; Geider *et al.*, 1993; Graziano *et al.*, 1996). Dichos estudios coinciden en que la limitación por nitrógeno trae una disminución drástica en el contenido de proteína y de pigmentos funcionales en la fotosíntesis

Dada la importancia que representa el proporcionar a las microalgas los nutrientes necesarios para su desarrollo y en vista del elevado costo que esto implica, en el presente trabajo se tiene como objetivo el promover el uso de un medio de cultivo con fertilizantes agrícolas que proporcione una alternativa viable en el cultivo de *P. cruentum* en las áreas de la acuicultura y la biotecnología marina.

II. OBJETIVO

II.1. Objetivo general

- Comparar el crecimiento y la composición proximal de *Porphyridium cruentum* en un medio alterno al f/2

II.1.2. Objetivos particulares

- Conocer el crecimiento de *P. cruentum* en cultivos estáticos con medio f/2 y fertilizantes agrícolas.
- Conocer el consumo de nutrientes por *P. cruentum* cultivado en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.
- Evaluar la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) en *P. cruentum* cultivado en medio f/2 y fertilizantes agrícolas
- Evaluar en el contenido de pigmentos (Clorofila a y ficoeritrina) de *P. cruentum* cultivado en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

III. METODOLOGÍA.

III.1. Cultivo de microalgas

La microalga marina *P. cruentum*, que se utilizó para este estudio fue adquirida de la colección de cultivos unialgales que se encuentran en el cepario de microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, la cual fue donada por la Dra. Bertha O. Arredondo Vega (CIBNOR).

Los cultivos experimentales se realizaron en un laboratorio con temperatura controlada a 19 ± 1 °C, mediante un sistema de aire acondicionado. El agua de mar utilizada para la preparación de los medios se paso a través de filtros de $1\mu\text{m}$ y se irradió con lámparas de luz ultravioleta de 25 W (con un flujo de 1 L min^{-1}). El pH se controló mediante la adición diaria de CO_2 .

Los nutrientes se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por Guillard (1975) para el medio f/2 y la preparación de los fertilizantes se realizó en base a la formulación descrita por Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) (Anexo A).

El cultivo de *P. cruentum* se efectuó a través de inóculos sucesivos partiendo de 100 ml (Erlenmeyer), 2 L (Fernbach), 18 L (garrafón), hasta columna de 400 L . Los niveles de Erlenmeyer y Fernbach se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1.05 kg cm^{-2} de presión durante 15 minutos.

En el primer nivel de cultivo (Erlenmeyer $n = 3$), se uso un inóculo de 10 ml que en promedio contenía 19×10^5 células ml^{-1} , en el segundo nivel (Fernbach $n = 3$) se uso un inóculo de 100 ml que en promedio contenía 24 y 23×10^5 células ml^{-1} para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente. Estos cultivos fueron expuestos a iluminación

continua proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 watts), suministrando una irradiancia de 151 y 132 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente

El siguiente nivel de cultivo (garrafón con 18 L), se realizó por triplicado, el agua de mar se trató con una solución previamente preparada de hipoclorito de sodio al 6% de la cual se agrego a razón de 0.25 ml L⁻¹ y se dejo reposar por 24 horas, posteriormente se utilizó una solución previamente preparada de tiosulfato de sodio de la cual se agrego a razón de 0.1 ml L⁻¹. Se suministró aireación por 2 horas para completar la reacción (Pruder y Bolton, 1978).

Posteriormente cada una de las unidades de evaluación recibió un inóculo de 2 litros que en promedio contenían 42 y 37 $\times 10^5$ células ml⁻¹ para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente. Se suministró aireación (4 L min⁻¹) e iluminación continua proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 watts), suministrando una irradiancia de 262 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El siguiente nivel de cultivo se llevó a cabo en columnas de fibra de vidrio con una capacidad de 400 L. Estas se prepararon por triplicado, el agua de mar se trató de la misma manera que los garrafones de 18 L. Para inocular la columna se utilizó un inóculo de 18 litros con una concentración de 44 y 40 $\times 10^5$ células ml⁻¹ para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente. Los cultivos permanecieron con iluminación continua proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 watts) e incandescentes suministrando una irradiancia de 1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La irradiancia en todos los niveles de cultivo se midió con un irradiómetro PAR modelo QSL-100 Biospherical Instruments Inc. 4 π .

A nivel de columna (en cada una de las unidades de evaluación) se tomaron muestras diarias durante siete días para determinar la densidad celular, consumo de nutrientes (nitratos y fosfatos), concentración de clorofila *a*, carotenoides totales, contenido de ficoeritrina, y composición proximal (proteínas lípidos y carbohidratos).

III.1.2 Cuantificación de la densidad celular.

La densidad celular se cuantificó con cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad y bajo observación directa en un microscopio compuesto Bausch & Lomb. La tasa de crecimiento específica (μ) y el número de divisiones por día (*D*), se obtuvo a partir de las ecuaciones descritas por Guillard (1973).

Tasa de crecimiento específica (μ)

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_2) - \text{Ln}(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Donde: μ = Tasa de crecimiento específica en días.

N_1 = Es el número de células al tiempo t_1 .

N_2 = Es el número de células al tiempo t_2 .

t_1 y t_2 = Son el tiempo inicial y final en días.

Número de divisiones por día (D). Para convertir la tasa de crecimiento específica (μ) calculada con la expresión anterior, a número de divisiones por día (D), se divide entre el logaritmo natural de 2.

$$D = \frac{\mu}{\text{Ln}(2)} \quad (2)$$

El tiempo de duplicación (TD) es el valor recíproco del número de divisiones por día y se calcula como sigue:

$$\text{TD} = \frac{1}{D} \quad (3)$$

Donde:

TD = Tiempo de duplicación en días.

D = Divisiones por día.

La producción diaria (PD) se calculó en base a la diferencia del número de células producidas entre el tiempo t_1 y el tiempo t_2 .

$$\text{PD} = \frac{(C_2 - C_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (4)$$

Donde:

C_2 = Son concentración de células al tiempo t_2 .

C_1 = Son concentración de células al tiempo t_1 .

t_1 y t_2 = Son el tiempo inicial y final en días.

III.2. Peso seco total y orgánico

Para la determinación de biomasa en base a peso seco, se tomaron volúmenes de 250, 100, 50 y 25 ml de los cultivos cada segundo día, estos se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 1.2 μm y 47 mm de diámetro, previamente lavados e incinerados en un horno a 490 °C y pesados en una balanza analítica. Al filtrar las muestras de microalgas, éstas se lavaron con formato de amonio al 3% para eliminar sales. Los filtros con la muestra se colocaron en una estufa a 60 °C por 24 horas, igualmente se pesaron en una balanza analítica para poder obtener el peso seco, posteriormente se calcinaron en un horno por 12 horas para cuantificar de cenizas, las cuales se pesaron y por diferencia entre el peso seco total se obtuvo el peso seco orgánico (Sorokin, 1973).

III.3. Composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos)

Para realizar los análisis proximales, se filtraron volúmenes de 250, 100, 50 y 25 ml de los cultivos mediante filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 1.2 μm y 25 mm de diámetro, posteriormente fueron almacenados en un ultracongelador a -70 °C para su análisis. Para la cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos se realizaron curvas de calibración con estándares comerciales, en las cuales se empleó Seroalbumina bovina para proteínas, ácido esteárico para lípidos y D-Glucosa para carbohidratos. Las proteínas fueron extraídas de acuerdo al procedimiento de Raush (1981) y se cuantificaron por el método de Bradford (1976); la extracción de lípidos se realizó de acuerdo con Bligh y Dyer (1959) y se estimó por el método de Pande *et al.* (1963); para carbohidratos se utilizó el método del fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956) con una hidrólisis previa de la muestra con 10 ml de ácido sulfúrico 2 N en baño María a 100 °C durante 2 horas.

III.4. Consumo de nutrientes (nitratos y fosfatos)

Para el análisis de nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{2-}), se realizaron curvas de calibración con nitrato de potasio como estándar para nitrato y fosfato monobásico de potasio para fosfato. Diario se colectaron muestras ($n= 3$ por tratamiento) de 10 ml de cultivo, el cual se filtró mediante filtros de fibra de vidrio GF/C de $1.2 \mu\text{m}$ y 25 mm de diámetro, el agua filtrada se colecto en frascos de polietileno y se almacenaron en ultracongelador a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. Para determinar la concentración residual de nitratos y fosfatos en el cultivo, se emplearon los métodos descritos por Parson *et al.* (1985).

III.5. Análisis de pigmentos

Para conocer el contenido de clorofila *a* se filtró un volumen diario de 10 ml de cultivo de cada unidad experimental mediante filtros de fibra de vidrio GF/C de $1.2 \mu\text{m}$ y 25 mm de diámetro, los cuales fueron, etiquetados y almacenados en un contenedor con nitrógeno líquido. Posteriormente, el filtro que contenía la muestra, se colocó en un tubo para centrifuga y se adicionaron 10 ml de acetona al 90%, la extracción de clorofilas se llevó a cabo en refrigeración a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y en oscuridad por 24 horas (Parson *et al.*, 1985).

Al termino de este tiempo se homogenizó cada muestra con la ayuda de un agitador vortex y se centrifugaron a $1190 \times g$ durante 10 minutos, el extracto, fue leído a longitudes de onda de 750, 664, 647 y 630 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter Dv 530, Life Science uv/vis Spectrophotometer).

Para conocer la concentración de clorofila *a* y carotenoides totales se utilizaron las ecuaciones mencionadas por Parson *et al.* (1985):

$$\text{Clorofila } a = 11.85 \cdot E_{664} - 1.54 \cdot E_{647} - 0.08 \cdot E_{630} \quad (5)$$

$$\text{Carotenoides} = 7.6 (E_{480} - 1.49 \cdot E_{510}) \quad (6)$$

Con estos valores se calculó la cantidad de pigmentos presentes en un volumen unitario de cultivo con la formula:

$$\mu\text{g} \times \text{l}^{-1} = (C \times v)/V \quad (7)$$

Donde:

V = Es el volumen de acetona en mL.

v = Es el volumen de la muestra filtrada en litros.

C = Es la cantidad de pigmento en mL.

III.6. Análisis de ficoeritrina

Para conocer el contenido de ficoeritrina en *Porphyridium cruentum* se filtró diario un volumen de 10 ml de cultivo de cada unidad experimental, mediante filtros de fibra de vidrio GF/C de 1.2 μm y 25 mm de diámetro, los cuales fueron, etiquetados y almacenados en un contenedor con nitrógeno líquido. Posteriormente, el filtro con contiene la muestra, se colocó en un tubo para centrifuga tipo falcón y se le adicionaron 5 ml de glicerol al 10%, la extracción de ficoeritrina se llevó a cabo en refrigeración a 4 °C y en oscuridad por 24 horas (Wyman y Fay, 1986). Al término de este periodo se homogeneizaron las muestras con la ayuda de un agitador vortex y se centrifugaron a 1030 x g, durante 10 minutos, el extracto obtenido fue leído a longitudes de onda de 650, 620, y 565 nm contra un blanco de acetato de sodio 20 mM, en un espectrofotómetro (Beckman Coulter Dv 530, Life Science uv/vis Spectrophotometer).

Para conocer la concentración de ficoeritrina se utilizaron las ecuaciones mencionadas por Bennet y Bogorad (1973):

$$\text{Ficocianina (PC)} = (E_{620} - 0.7 \cdot E_{650}) / 7.38 \quad (8)$$

$$\text{Aloficocianina (APC)} = (E_{650} - 0.19 \cdot E_{620}) / 6.65 \quad (9)$$

$$\text{Ficoeritrina (PE)} = (E_{565} - 2.8 \times (\text{PC}) - 1.34 \times (\text{APC}) / 12.7 \quad (10)$$

III.7. Análisis estadístico

A los resultados obtenidos de número de células, composición proximal, peso seco total, peso seco orgánico, consumo de nutrientes y pigmentos, se les aplicó una prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el objeto de determinar diferencias entre tratamientos, el análisis se realizó con el paquete estadístico STATISTICA con $\alpha = 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. Variables físico-químicas

Las condiciones físico-químicas en que se desarrollaron los cultivos estáticos de *P. cruentum* fueron los siguientes: la temperatura promedio tanto en nivel de Fernbach como en garrafón fue de 21 ± 1 °C y salinidad de 34 ppm. El pH varió entre 8.1 y 8.7 en Fernbach y en garrafón respectivamente. En el nivel de columna la temperatura promedio fue 20 ± 1 °C y salinidad de 34 ppm, el pH inicial de los cultivos fue 7.0 y se registraron valores al final de 8.2 (Anexo C).

IV.2. Crecimiento microalgal

El crecimiento microalgal promedio en los cuatro niveles de cultivo para medio f/2 y fertilizantes agrícolas se observa en la Figura 1. A nivel Erlenmeyer (100 ml) el crecimiento inicial promedio en el medio f/2 fue de 1.56×10^5 células ml^{-1} así mismo el medio con fertilizantes agrícolas inició con 1.55×10^5 células ml^{-1} . Tanto en los cultivos con medio f/2 como con fertilizantes agrícolas, la fase de crecimiento exponencial se presentó desde el primer día (Fig. 1-A). Esta fase tuvo una duración de 48 horas, fue en este periodo donde se registró la mayor tasa de crecimiento específica (μ) con 0.75 y 0.87, así como el mayor número de divisiones por día (D) con 1.08 y 1.25 para el medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente. Después se presentó una fase de lento crecimiento, la cual se caracterizó por una reducción en la tasa de crecimiento específica (μ) y un aumento en el tiempo de duplicación (TD) (Tabla III.). En general los valores máximos en la densidad celular y en la producción diaria (PD) se obtuvieron al séptimo día de cultivo, registrando biomásas 24.28 y 23.48×10^5 células ml^{-1} y valores en la producción diaria (PD) de 4.31 y 4.13×10^5 células ml^{-1} para el medio f/2 y fertilizantes agrícolas

respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en ambos tratamientos.

En los cultivos a nivel Fernbach (2 L), la densidad celular inicial promedio fue de 1.20 y 1.10×10^5 células ml^{-1} para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente (Tabla IV). En este nivel se presentó un continuo crecimiento desde el inicio de los cultivos, con una duración de 72 horas y fue en este periodo del cultivo donde se registró la mayor tasa de crecimiento específica (μ) (0.75 y 0.79) y el mayor número de divisiones por día (1.08 y 1.13) para el medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente (Fig. 1-B). Después se presentó una disminución en la tasa de crecimiento específica (μ) y un aumento en el tiempo de duplicación (TD) (Tabla IV). La máxima producción diaria (PD) se obtuvo al quinto día para el medio f/2 (9.52×10^5 células ml^{-1}) en tanto que, para el medio con fertilizantes agrícolas se obtuvo al séptimo día de cultivo (9.21×10^5 células ml^{-1}). Las máximas densidades celulares se observaron al séptimo día de cultivo, con 42.50 y 37.44×10^5 células ml^{-1} para los cultivos con medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en ambos tratamientos.

A nivel garrafón (18 L), la densidad celular inicial promedio fue 5.45 y 4.55×10^5 células ml^{-1} (Tabla V). En este nivel se presentó un crecimiento moderado durante los siete días de cultivo tanto para el medio f/2 y los fertilizantes agrícolas, registrando valores máximos en la tasa de crecimiento específica (μ) de 0.59 y 0.49 y valores en las divisiones por día (D) de 0.85 y 0.70, al segundo día para el medio f/2 y al tercer día para el medio con fertilizantes agrícolas respectivamente (Fig. 1-C). Posteriormente se inició una fase de crecimiento lento, la cual se caracterizó por una reducción en la tasa de crecimiento específica (μ) y un aumento en el tiempo de duplicación (TD) (Tabla V). Los valores

máximos en la producción diaria (PD) se obtuvieron al cuarto día para el medio f/2 (9.93×10^5 células ml^{-1}) en tanto que para el medio con fertilizantes agrícolas se alcanzaron al séptimo día de cultivo (9.69×10^5 células ml^{-1}). La máxima densidad celular se obtuvo al séptimo día de cultivo, 44.51 y 40.24×10^5 células ml^{-1} para los cultivos con medio f/2 y con fertilizantes agrícolas respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ambos tratamientos.

En los cultivos a nivel columna (400 L), la densidad celular inicial promedio fue de 1.28 y 1.16×10^5 células ml^{-1} para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente. En este nivel se presentó un crecimiento constante durante las primeras 24 horas (Fig. 1-D), después inició la fase de crecimiento exponencial que comprendió del segundo al cuarto día de cultivo, periodo en el cual se registraron las mayores tasas de crecimiento específico (μ) (0.77 y 0.74) y número de divisiones por día (D) (1.11 y 1.06) para los cultivos con medio f/2 y con fertilizantes agrícolas respectivamente. (Tabla VI). Posteriormente se inició una etapa de crecimiento lento donde se presentó una disminución paulatina de la tasa de crecimiento específica (μ), así como, un aumento en el tiempo de duplicación (TD). Tanto en el medio f/2 como en los fertilizantes agrícolas los valores máximos en la producción diaria (PD) se obtuvieron al cuarto día 10.02 y 8.01×10^5 células ml^{-1} respectivamente. Los cultivos alcanzaron densidades celulares finales de 39.46 y 34.91×10^5 células ml^{-1} para los cultivos con medio f/2 y con fertilizantes agrícolas, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ambos tratamientos.

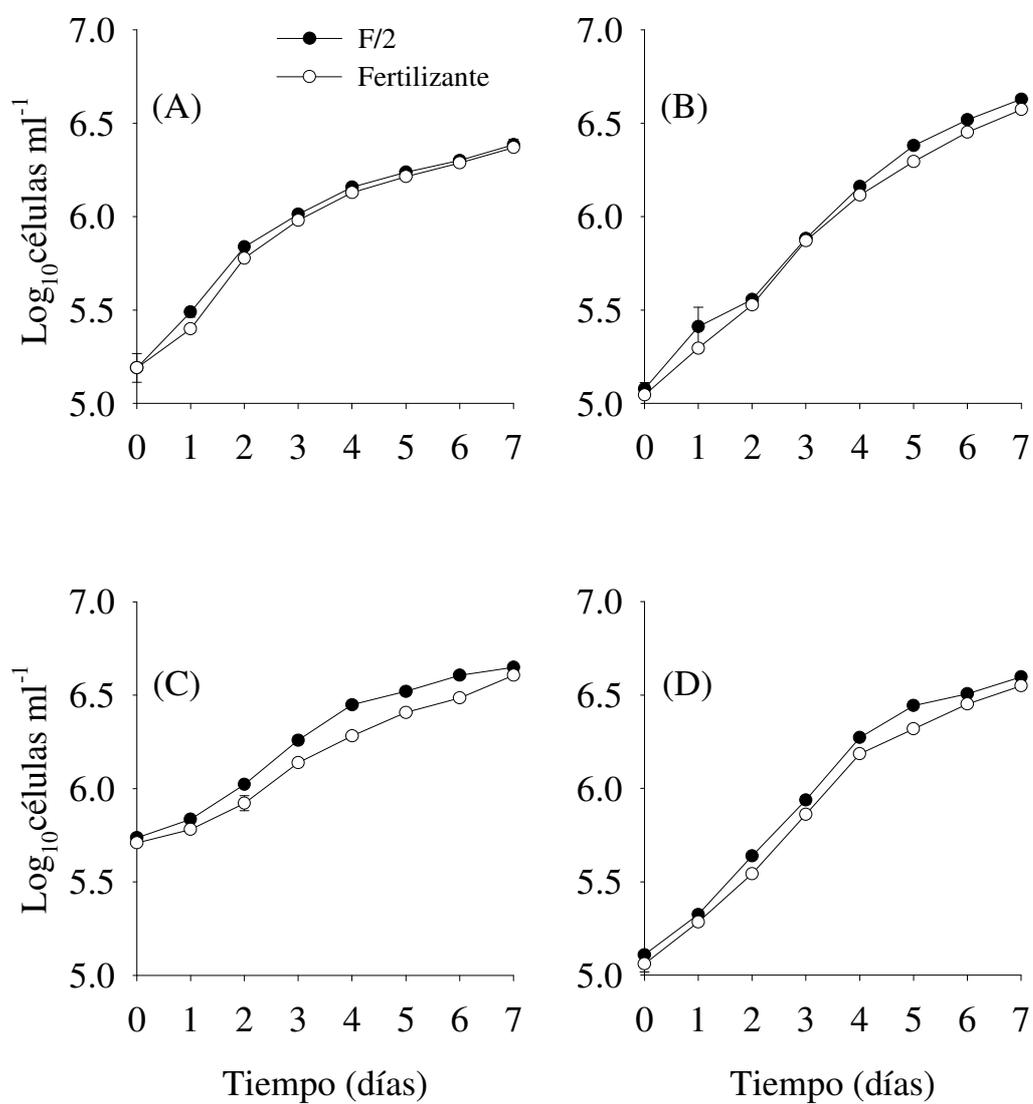


Figura 1. Crecimiento promedio de *Porphyridium cruentum* cultivada en un volumen de 100 ml (A), 2 L (B), 18 L (C) y 400 L (D) con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar ($n=3$).

Tabla III. Densidad celular, parámetros poblacionales promedio y desviaciones estándar entre paréntesis estimados de *Porphyridium cruentum* cultivados en 100 ml con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B). Los parámetros que describen el crecimiento son: tasa de crecimiento específico (μ), tiempo de duplicación (TD), divisiones por día (D) y producción diaria (PD).

(A)

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)
0	1.56 (0.24)	----	----	----	---
1	3.27 (0.16)	0.74	0.94	1.06	1.71
2	6.90 (0.24)	0.75	0.92	1.08	3.63
3	10.28 (0.43)	0.40	1.75	0.57	3.38
4	14.43 (0.39)	0.34	2.04	0.49	4.15
5	17.94 (0.12)	0.21	3.33	0.30	3.51
6	19.96 (0.19)	0.11	6.66	0.15	2.02
7	24.28 (1.38)	0.20	3.57	0.28	4.32

(B)

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)
0	1.55 (0.04)	----	----	----	---
1	2.51 (0.21)	0.48	1.44	0.69	0.96
2	5.98 (0.17)	0.87	0.80	1.25	3.47
3	9.85 (0.62)	0.50	1.38	0.72	3.87
4	13.44 (0.53)	0.31	2.27	0.44	3.59
5	16.38 (0.74)	0.19	3.70	0.27	2.94
6	19.35 (0.38)	0.17	4.16	0.24	2.97
7	23.48 (1.41)	0.19	3.70	0.27	4.13

Tabla IV. Densidad celular, parámetros poblacionales promedio y desviaciones estándar entre paréntesis estimados de *Porphyridium cruentum* cultivados en 2 L. con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B). Los parámetros que describen el crecimiento son: tasa de crecimiento específico (μ), tiempo de duplicación (TD), divisiones por día (D) y producción diaria (PD).

(A)

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)
0	1.20 (0.16)	-	-	-	-
1	2.04 (0.03)	0.53	1.31	0.76	0.84
2	3.60 (0.14)	0.57	1.21	0.83	1.56
3	7.62 (0.33)	0.75	0.92	1.08	4.02
4	14.48 (0.97)	0.64	1.08	0.92	6.86
5	24.00 (1.20)	0.51	1.36	0.73	9.52
6	33.03 (1.67)	0.32	2.17	0.46	9.03
7	42.50 (0.58)	0.25	2.77	0.36	9.47

(B)

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)
0	1.10 (0.06)	-	-	-	-
1	1.98 (0.14)	0.60	1.16	0.86	0.88
2	3.36 (0.06)	0.53	1.31	0.76	1.38
3	7.42 (0.45)	0.79	0.88	1.13	4.06
4	13.00 (0.30)	0.56	1.25	0.80	5.58
5	19.68 (0.70)	0.42	1.66	0.60	6.68
6	28.22 (1.22)	0.36	1.96	0.51	8.54
7	37.44 (0.55)	0.28	2.5	0.40	9.22

Tabla V. Densidad celular, parámetros poblacionales promedio y desviaciones estándar entre paréntesis estimados de *Porphyridium cruentum* cultivados en 18 L. con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B). Los parámetros que describen el crecimiento son: tasa de crecimiento específico (μ), tiempo de duplicación (TD), divisiones por día (D) y producción diaria (PD).

(A)

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)
0	5.45 (0.35)	-	-	-	-
1	6.83 (0.19)	0.23	3.03	0.33	1.38
2	10.52 (0.64)	0.59	1.17	0.85	3.69
3	18.16 (1.60)	0.55	1.26	0.79	7.64
4	28.10 (2.02)	0.43	1.61	0.62	9.94
5	33.16 (2.56)	0.17	4.16	0.24	5.06
6	40.30 (1.22)	0.19	3.70	0.27	7.14
7	44.51 (0.65)	0.10	7.14	0.14	4.21

(B)

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)
0	5.11 (0.29)	-	-	-	-
1	6.04 (0.17)	0.19	3.70	0.27	0.93
2	8.40 (1.37)	0.33	2.12	0.47	2.36
3	13.72 (0.56)	0.49	1.42	0.70	5.32
4	19.10 (0.43)	0.33	2.12	0.47	5.38
5	25.50 (0.40)	0.29	2.43	0.41	6.40
6	30.54 (0.31)	0.18	4.00	0.25	5.04
7	40.24 (0.69)	0.27	2.63	0.38	9.70

Tabla VI. Densidad celular, parámetros poblacionales promedio y desviaciones estándar entre paréntesis estimados de *Porphyridium cruentum* cultivados en 400 L. con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B). Los parámetros que describen el crecimiento son: tasa de crecimiento específico (μ), tiempo de duplicación (TD), divisiones por día (D) y producción diaria (PD).

(A)

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)
0	1.28 (0.05)	-	-	-	-
1	2.11 (0.18)	0.50	1.38	0.72	0.83
2	4.34 (0.25)	0.72	0.97	1.03	2.23
3	8.66 (0.76)	0.69	1.01	0.99	4.32
4	18.68 (0.30)	0.77	0.90	1.11	10.02
5	27.74 (0.41)	0.39	1.78	0.56	9.06
6	32.06 (0.78)	0.15	4.76	0.21	4.32
7	39.46 (0.31)	0.20	3.57	0.28	7.40

(B)

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (células ml ⁻¹ × 10 ⁵)
0	1.16 (0.18)	-	-	-	-
1	1.92 (0.06)	0.51	1.36	0.73	0.76
2	3.48 (0.07)	0.59	1.17	0.85	1.56
3	7.26 (0.55)	0.74	0.94	1.06	3.78
4	15.27 (0.06)	0.74	0.94	1.06	8.01
5	20.78 (0.21)	0.31	2.27	0.44	5.51
6	28.25 (0.09)	0.31	2.27	0.44	7.47
7	35.61 (0.98)	0.23	3.33	0.30	7.36

IV.3. Peso seco total y orgánico

La determinación de la biomasa celular con relación al peso seco total y peso seco orgánico expresado en pg cél^{-1} durante los siete días de cultivo en *P. cruentum*, en un volumen de 400 litros con medio f/2 y con fertilizantes agrícolas se indica en la Figura 2 y Tabla VII.

El contenido promedio por día del peso seco total (pg cél^{-1}), muestra una tendencia similar a la observada con el número de células, con un aumento durante los primeros días, registrándose los valores máximos para el tercer día de cultivo con $250.8 \text{ pg cél}^{-1}$ para el medio f/2 y $308.7 \text{ pg cél}^{-1}$ para fertilizantes agrícolas, observándose posteriormente una disminución a través del tiempo de cultivo, obteniéndose valores mínimos al séptimo día de 79.4 y 81.7 pg cél^{-1} para el medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente.

En lo que respecta al contenido de biomasa celular en base a peso seco orgánico esta registró su valor máximo al tercer día con $155.5 \text{ pg cél}^{-1}$ en el medio f/2 y $214.5 \text{ pg cél}^{-1}$ en los fertilizantes agrícolas, a partir de este momento y durante el resto del periodo del cultivo, el peso seco orgánico disminuyó hasta valores de 49.6 y 50.0 pg cél^{-1} para el medio f/2 y los fertilizantes agrícolas respectivamente (Tabla VII). Al representar los valores de peso seco orgánico en porcentaje, éstos variaron del 62.0 al 76.6% en el medio f/2 y en los fertilizantes agrícolas del 61.2 al 69.5% .

En el contenido de ceniza se observó un aumento constante durante los primeros tres días de cultivo, periodo en el cual alcanzó su valor máximo (día 3) con 95.3 pg cél^{-1} en el medio f/2 y 94.1 pg cél^{-1} en los fertilizantes agrícolas, posteriormente se observó una disminución hasta valores de 29.7 y 31.7 pg cél^{-1} para el medio f/2 y los fertilizantes agrícolas respectivamente (Tabla VII).

Al representar los valores de cenizas en porcentaje éste varió del 23.4 al 38.0 % en el medio f/2 y en los fertilizantes agrícolas varió del 30.5 al 38.8 %. Al realizar un análisis de varianza en el contenido de biomasa celular en base a peso seco total y peso seco orgánico se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el medio con fertilizantes agrícolas con respecto a los obtenidos con medio f/2, en el porcentaje de ceniza, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ambos tratamientos.

IV.4. Composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos)

El contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de *P. cruentum* en un volumen de 400 litros con medio f/2 y con fertilizantes agrícolas durante siete días de cultivo se muestra en la Tabla VIIIA-B y en la Figura 3.

Se puede apreciar que al inicio de los cultivos, la concentración promedio de proteínas por unidad celular presentó sus máximos valores en ambos medios de cultivo, (Tabla VIIIA-B). Después de este periodo y hasta el final del experimento, el contenido de proteínas disminuyó en ambos medios de cultivo, hasta registrar valores de 6.6 y 6.1 pg de proteína por célula para el medio f/2 y para los fertilizantes agrícolas respectivamente. A través de una análisis de varianza se demostró que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de proteínas entre los medios de cultivo.

El contenido de carbohidratos, se puede apreciar en la Figura 3-B. El mayor contenido de carbohidratos por unidad celular se registró las primeras 72 horas de cultivo con valores de 38.8 - 20.1 y 42.2 - 24.8 pg cél⁻¹ para el medio f/2 y para los fertilizantes agrícolas respectivamente. A partir de este momento y durante el resto del periodo del cultivo el contenido de carbohidratos fue disminuyendo en ambos tratamientos, hasta llegar

a valores mínimos de 6.0 y 6.1 pg cél⁻¹ al séptimo día cultivo para el medio f/2 y para los fertilizantes agrícolas respectivamente (Tabla VIIIA-B). En ambos medios de cultivo no se encontraron en el contenido de carbohidratos diferencias significativas ($p>0.05$).

El contenido de lípidos, se indica en la figura 3-C y Tabla VIIIA-B, al igual que el contenido de proteínas y carbohidratos, los lípidos registraron su mayor concentración por unidad celular las primeras 72 horas de cultivo, con valores de 8.7 - 5.5 y 10.1 - 5.9 pg cél⁻¹ para el medio f/2 y para los fertilizantes agrícolas respectivamente.

Después el contenido de lípidos disminuyó en ambos medios de cultivo, hasta registrar valores en la concentración de 4.2 y 4.2 pg cél⁻¹ para el medio f/2 y para los fertilizantes agrícolas respectivamente, posteriormente se registró un aumento en el contenido de este constituyente celular durante la fase final del cultivo con valores en el contenido de lípidos de 5.1 y 5.2 pg cél⁻¹ para el medio f/2 y para los fertilizantes agrícolas respectivamente. En ambos tratamientos no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el contenido de lípidos.

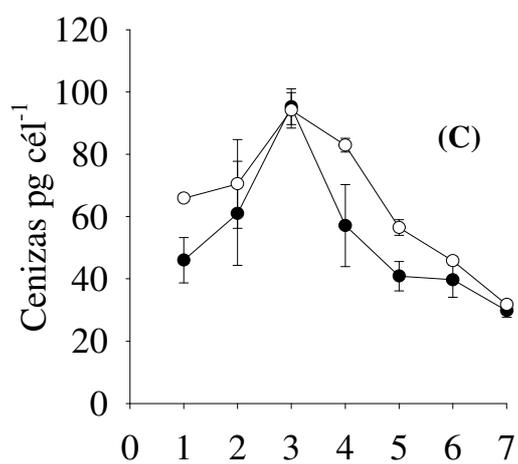
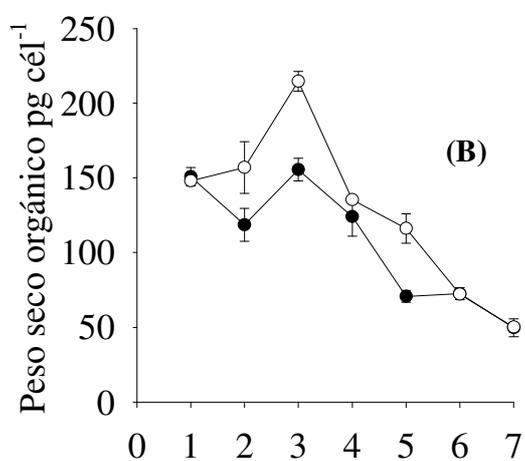
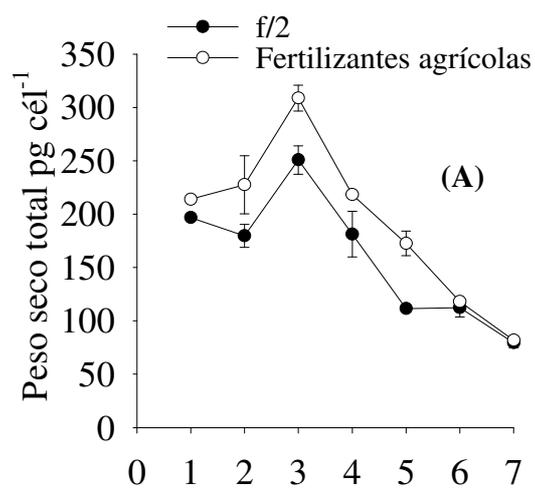


Figura 2. Peso seco total (A), peso seco orgánico (B) y cenizas en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L, con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar (n= 3)

Tabla VII. Contenido promedio de peso seco total (PST), peso seco orgánico (PSO) expresado en $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 (A) y fertilizantes agr\u00edcolas (B). La desviaci\u00f3n est\u00e1ndar se incluye entre par\u00e9ntesis.

(A)

D\u00eda	PST ($\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$)	PSO ($\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$)	PSO %	Cenizas ($\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$)	Cenizas %
1	196.8 (3.75)	150.8 (10.87)	76.6 (6.22)	45.9 (12.60)	23.4 (6.22)
2	179.6 (18.60)	118.6 (18.95)	66.0 (13.66)	61.0 (28.97)	34.0 (13.66)
3	250.8 (22.95)	155.5 (13.13)	62.0 (0.57)	95.3 (9.88)	38.0 (0.57)
4	181.1 (37.08)	124.0 (22.57)	68.5 (7.51)	57.1 (22.79)	31.5 (7.51)
5	111.5 (5.21)	70.6 (6.91)	63.3 (6.45)	40.8 (8.25)	36.6 (6.45)
6	112.1 (14.78)	72.4 (7.07)	64.6 (4.64)	39.7 (9.78)	35.4 (4.64)
7	79.4 (7.53)	49.6 (10.31)	62.5 (7.99)	29.7 (3.77)	37.5 (7.99)

(B)

D\u00eda	PST ($\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$)	PSO ($\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$)	PSO %	Cenizas ($\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$)	Cenizas %
1	213.9 (0.83)	147.9 (2.82)	69.2 (1.10)	65.9 (2.16)	30.8 (1.10)
2	227.4 (47.12)	156.8 (30.08)	69.0 (7.40)	70.5 (24.66)	31.0 (7.40)
3	308.7 (20.84)	214.5 (11.34)	69.5 (1.22)	94.1 (9.84)	30.5 (1.22)
4	218.2 (0.74)	135.3 (3.17)	62.0 (1.64)	82.9 (3.84)	38.0 (1.64)
5	172.5 (19.98)	116.0 (17.07)	67.3 (2.49)	56.5 (4.38)	32.7 (2.49)
6	118.0 (2.41)	72.2 (3.78)	61.0 (2.25)	45.8 (2.23)	38.8 (2.25)
7	81.7 (2.38)	50.0 (4.87)	61.2 (4.13)	31.7 (2.48)	38.7 (4.13)

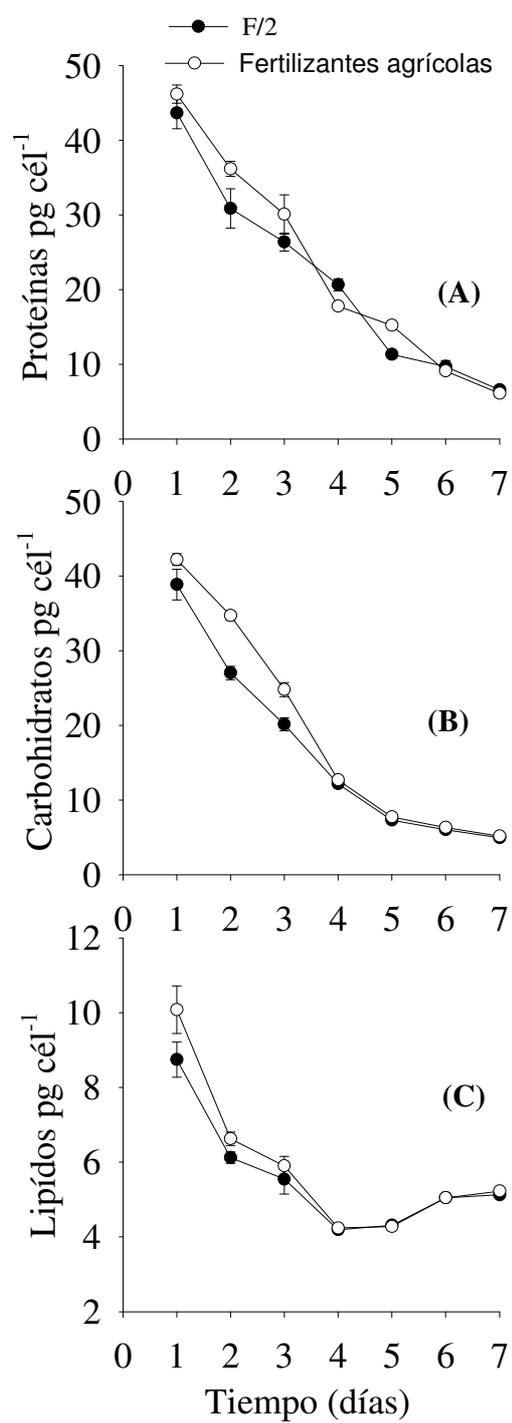


Figura 3. Contenido promedio de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

Tabla VIII. Composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) de *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B) expresada en $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$. La desviación estándar se incluye entre paréntesis.

(A)

Día	Proteínas ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$)	Carbohidratos ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$)	Lípidos ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$)
1	43.6 (3.61)	38.8 (3.53)	8.7 (0.81)
2	30.9 (4.56)	27.0 (1.57)	6.1 (0.27)
3	26.4 (2.06)	20.1 (1.51)	5.5 (0.69)
4	20.6 (1.37)	12.2 (0.20)	4.2 (0.07)
5	11.3 (0.34)	7.3 (0.54)	4.3 (0.06)
6	9.7 (1.35)	6.1 (0.15)	5.0 (0.12)
7	6.6 (0.19)	6.0 (0.05)	5.1 (0.05)

(B)

Día	Proteínas ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$)	Carbohidratos ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$)	Lípidos ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$)
1	46.2 (2.10)	42.2 (1.35)	10.1 (1.10)
2	36.2 (1.75)	34.7 (1.10)	6.6 (0.31)
3	30.0 (4.57)	24.8 (1.63)	5.9 (0.44)
4	17.8 (0.10)	12.7 (0.15)	4.2 (0.02)
5	15.2 (0.50)	7.7 (0.12)	4.3 (0.04)
6	9.1 (0.56)	6.3 (0.10)	5.0 (0.02)
7	6.1 (0.69)	6.1 (0.08)	5.2 (0.09)

IV.5 Consumo de nutrientes (Nitratos y Fosfatos)

La concentración residual de NO_3^- y PO_4^{3-} , durante los siete días de cultivo en *P. cruentum* en un volumen de 400 litros con medio f/2 y con fertilizantes agrícolas se puede observar en las Figuras 7-A y 7-B, respectivamente.

Los cultivos iniciaron con concentraciones de NO_3^- de 883 μM para el medio f/2, mientras que los cultivos con fertilizantes agrícolas iniciaron con 882 μM de NH_4NO_3 de los cuales 441 μM se encuentran en forma de NO_3^-

La concentración residual de NO_3^- disminuye desde el primer día de cultivo y hasta el final del experimento llegando a una concentración residual de 90.4 μM para el NO_3^- residual en el medio f/2 y de 105.7 μM en el medio con fertilizantes agrícolas.

En lo que respecta al consumo de nitratos ($\mu\text{M día}^{-1}$) este fue mayor durante el periodo que comprende del segundo (160.5 $\mu\text{M día}^{-1}$) al sexto día (103.1 $\mu\text{M día}^{-1}$) para el medio f/2. En contraste el mayor consumo de nitratos para el medio con fertilizantes agrícolas comprendió del segundo (54.3 $\mu\text{M día}^{-1}$) al quinto día (99.4 $\mu\text{M día}^{-1}$) (Tabla IX-A).

En el consumo acumulado de nitratos ($\mu\text{M día}^{-1}$) se observó la tendencia a aumentar conforme transcurre el tiempo de cultivo, registrando una variación del 20.0 $\mu\text{M día}^{-1}$ al 792.7 $\mu\text{M día}^{-1}$ en el medio f/2, mientras que en los fertilizantes agrícolas presentó una variación del 12.7 $\mu\text{M día}^{-1}$ al 335.2 $\mu\text{M día}^{-1}$.

Al representar el consumo acumulado de nitratos en porcentaje, el medio f/2 registra una variación del 2.2 % (día 1) hasta un 89.7 % para el séptimo día de cultivo, en tanto que el medio con fertilizantes agrícolas muestra una variación del 2.8 % (día 1) al 71.4 % en el

séptimo día del cultivo. No Se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el consumo acumulado de nitratos expresado en porcentaje.

En lo que respecta al fosfato, los cultivos iniciaron con concentraciones de PO_4^{3-} de $36.3 \mu\text{M día}^{-1}$ para el medio f/2 mientras que los cultivos con fertilizantes agrícolas iniciaron con $39.4 \mu\text{M día}^{-1}$. La diferencia en la concentración inicial, no fue significativa ($p>0.05$).

La concentración residual de PO_4^{3-} disminuyó desde el primer día de cultivo, los valores iniciales tanto para medio f/2 ($28.9 \mu\text{M día}^{-1}$) como para los fertilizantes agrícolas ($32.2 \mu\text{M día}^{-1}$) disminuyeron hasta 12.7 y $10.5 \mu\text{M día}^{-1}$ al séptimo día para el medio respectivamente (Tabla X A-B).

Asimismo el consumo de fosfatos ($\mu\text{M día}^{-1}$) fue mayor durante el periodo que comprende del primer día ($7.3 \mu\text{M día}^{-1}$) al cuarto día de cultivo ($3.3 \mu\text{M día}^{-1}$) para el medio f/2, en tanto que para el medio con fertilizantes agrícolas comprendió del primer día ($7.2 \mu\text{M día}^{-1}$) al quinto día de cultivo ($4.4 \mu\text{M día}^{-1}$).

El consumo acumulado de fosfatos ($\mu\text{M día}^{-1}$) tiene la tendencia a aumentar conforme transcurre el periodo de cultivo, registrando una variación del $7.3 \mu\text{M día}^{-1}$ al $23.3 \mu\text{M día}^{-1}$ en el medio f/2, mientras que en los fertilizantes agrícolas varia del $7.2 \mu\text{M día}^{-1}$ al $28.7 \mu\text{M día}^{-1}$ (Tabla X A-B).

Al representar en porcentaje el consumo acumulado $\mu\text{M día}^{-1}$ de fosfatos el medio f/2 registra una variación del 20.1% hasta un 64.1% para el séptimo día de cultivo, en tanto que el medio con fertilizantes agrícolas muestra una variación del 18.2% al 72.7% para el séptimo día de cultivo. No encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el consumo acumulado $\mu\text{M día}^{-1}$ de fosfatos en ambos medios de cultivo.

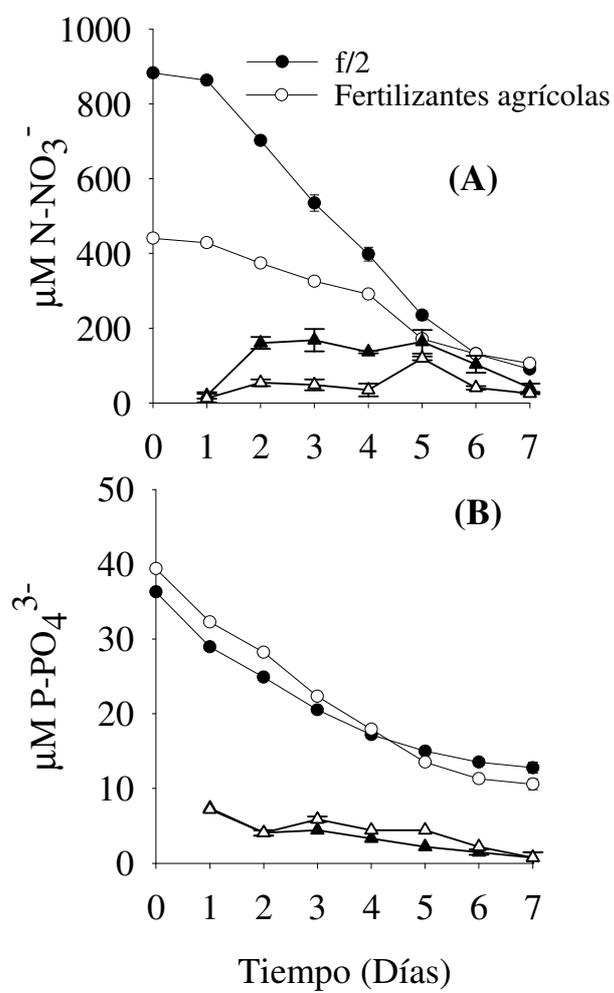


Figura 4. Concentración residual promedio [(●) medio f/2 (○) fertilizantes agrícolas] y consumo diario promedio [(▲) medio f/2 (Δ) fertilizantes agrícolas] de nitratos (A) y fosfatos (B) en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L. La barra vertical indica el error estándar (n= 3).

Tabla IX. Concentración residual promedio y consumo diario promedio de nitratos en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B).

(A)

Día	Concentración Residual ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo Acumulado ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo Acumulado ($\mu\text{M día}^{-1}$) %
0	883.0	-	-	-
1	863.1	20.0	20.0	2.2
2	702.5	160.5	180.5	20.4
3	534.4	168.0	348.6	39.4
4	398.1	136.3	484.9	54.9
5	234.4	163.7	648.7	73.4
6	131.3	103.1	751.8	85.1
7	90.4	40.8	792.7	89.7

(B)

Día	Concentración Residual ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo Acumulado ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo Acumulado ($\mu\text{M día}^{-1}$) %
0	441.0	-	-	-
1	428.2	12.7	12.7	2.8
2	373.9	54.3	67.0	15.1
3	325.4	48.5	115.6	26.2
4	290.7	34.6	150.2	34.0
5	191.3	99.4	269.6	56.6
6	130.8	40.4	310.1	65.7
7	105.7	25.1	335.2	71.4

Tabla X. Concentración residual promedio y consumo diario promedio de fosfatos en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B).

(A)

Día	Concentración Residual ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo Acumulado ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo Acumulado ($\mu\text{M día}^{-1}$) %
0	36.3	-	-	-
1	28.9	7.3	7.3	20.1
2	24.8	4.0	11.3	31.1
3	20.4	4.4	15.7	43.2
4	17.1	3.3	19.0	52.3
5	14.9	2.2	21.2	58.4
6	13.5	1.4	22.6	62.2
7	12.7	0.7	23.3	64.1

(B)

Día	Concentración Residual ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo Acumulado ($\mu\text{M día}^{-1}$)	Consumo Acumulado ($\mu\text{M día}^{-1}$) %
0	39.4	-	-	-
1	32.2	7.2	7.2	18.2
2	28.2	4.0	11.2	28.3
3	22.3	5.8	17.0	43.0
4	17.9	4.4	21.4	54.2
5	13.5	4.4	25.8	65.3
6	11.2	2.2	28.0	70.9
7	10.5	0.7	28.7	72.7

IV.6. Contenido de clorofila *a* y carotenoides totales

El contenido promedio de clorofila *a* se muestra en la Figura 5-A y Tabla X-A, durante el período de cultivo la concentración de clorofila *a* varió de 4.5 a 8.6 pg cél⁻¹ en el medio f/2, mientras que en el cultivo con fertilizantes agrícolas presentó valores de 4.4 a 7.6 pg cél⁻¹. En ambos medios de cultivo (medio f/2 y fertilizantes agrícolas) el contenido de clorofila *a* por célula aumentó durante las primeras 72 horas. A partir de este momento y durante el resto del periodo del cultivo el contenido de este pigmento fue disminuyendo en ambos tratamientos, hasta llegar a valores mínimos de 4.5 y 4.4 pg cél⁻¹ al séptimo día cultivo para el medio f/2 y para los fertilizantes agrícolas respectivamente. (Tabla XI-A). No hubo diferencias significativas ($p>0.05$) en la concentración de clorofila *a* por célula en el medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

El contenido promedio de carotenoides totales se muestra en la Figura 5-B y en la Tabla X-B. Los de carotenoides totales mostraron una tendencia a aumentar su contenido durante los primeros días de cultivo, registrando su máximo contenido (4.3 pg cél⁻¹ para medio f/2 y 2.3 pg cél⁻¹ para los fertilizantes agrícolas) al tercer día. A partir de este momento y durante el transcurso del cultivo su contenido fue disminuyendo lentamente, hasta llegar a valores de 2.3 y 1.2 pg cél⁻¹ para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente al séptimo día cultivo (Tabla XI-B). En la concentración de carotenoides totales por célula en medio f/2 y fertilizantes agrícolas se registraron diferencias significativas ($p<0.05$).

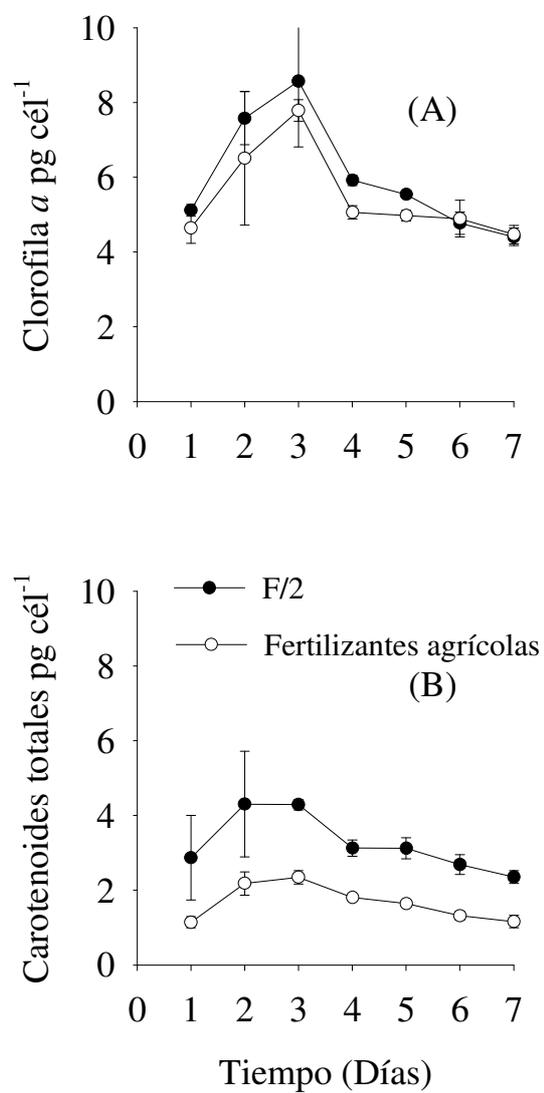


Figura 5. Contenido promedio de Clorofila *a* (A) y carotenoides totales (B) en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

Tabla XI. Contenido promedio de Clorofila *a* (A) y carotenoides totales (B) en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La desviación estándar se incluye entre paréntesis.

(A)		
Día	Medio f/2	Fertilizantes agrícolas
	pg cél ⁻¹	pg cél ⁻¹
1	4.6 (0.73)	5.1 (0.27)
2	7.8 (0.50)	6.5 (3.10)
3	8.6 (3.05)	7.6 (1.23)
4	5.1 (0.31)	5.9 (0.24)
5	5.0 (0.24)	5.5 (0.12)
6	4.9 (0.85)	4.8 (0.51)
7	4.5 (0.43)	4.4 (0.40)

(B)		
Día	Medio f/2	Fertilizantes agrícolas
	pg cél ⁻¹	pg cél ⁻¹
1	2.9 (1.96)	1.1 (0.26)
2	4.3 (2.45)	2.2 (0.54)
3	4.3 (0.24)	2.3 (0.31)
4	3.1 (0.38)	1.8 (0.13)
5	3.1 (0.49)	1.6 (0.03)
6	2.7 (0.46)	1.3 (0.20)
7	2.3 (0.30)	1.2 (0.30)

IV.7 Contenido de ficoeritrina

El contenido promedio de ficoeritrina se muestra en la Figura 6 y Tabla XII, durante el período de cultivo la concentración de ficoeritrina varió de 1.1 a 5.4 pg cél⁻¹ en el medio f/2, mientras que en el cultivo con fertilizantes agrícolas presentó valores de 0.9 a 4.5 pg cél⁻¹. En la concentración de ficoeritrina se observó un comportamiento similar a la clorofila *a*, es decir, está mostró una tendencia a aumentar su concentración durante los primeros días de cultivo, registrando su mayor concentración al tercer día en ambos medios de cultivo. A partir de este momento y durante el resto del periodo del cultivo el contenido de este pigmento disminuyó, hasta llegar a valores de 2.5 y 2.1 pg cél⁻¹ para medio f/2 y fertilizantes agrícolas al séptimo día de cultivo respectivamente. En la concentración de ficoeritrina por célula entre medio f/2 y fertilizantes agrícolas no se registraron diferencias significativas ($p>0.05$).

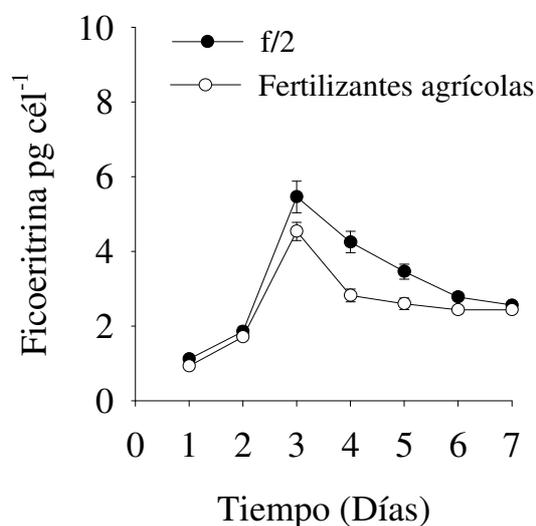


Figura 6. Contenido promedio de ficoeritrina en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

Tabla XII. Contenido promedio de ficoeritrina en *Porphyridium cruentum* cultivada en 400 L con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La desviación estándar se incluye entre paréntesis

Día	Medio f/2 pg cél ⁻¹	fertilizantes agrícolas pg cél ⁻¹
1	1.1 (0.02)	0.9 (0.04)
2	1.8 (0.14)	1.7 (0.06)
3	5.4 (0.42)	4.5 (0.24)
4	4.2 (0.29)	2.8 (0.18)
5	3.4 (0.20)	2.6 (0.16)
6	2.8 (0.10)	2.5 (0.07)
7	2.5 (0.09)	2.1 (0.06)

V. DISCUSIÓN

Entre los principales factores que influyen en la calidad y la cantidad celular de las microalgas, figuran la temperatura, la irradiancia, la salinidad, el pH y la limitación de nutrientes (Sommer, 1997). El origen y la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, son factores que influyen directamente en el crecimiento, composición celular, contenido de clorofila, así como en el rendimiento final (Valenzuela-Espinoza, 1997).

Durante el desarrollo del presente trabajo la temperatura promedio de los cultivos se mantuvo dentro del intervalo de las temperaturas promedio (20-25 °C) reportadas como óptimas para el cultivo de especies de este género (Vonshak *et al.*, 1985) debido a lo cual se considera que la temperatura no tuvo una influencia directa en el cultivo de *P. cruentum*, de la misma manera la salinidad se mantuvo en niveles óptimos .

Con relación a la irradiancia, se ha reportado que esta especie crece en un amplio espectro de luz (Vonshak *et al.*, 1985), por lo tanto en el presente trabajo se mantuvo una irradiancia constante de 150 a 1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, cambios en la irradiancia al interior de los cultivos pudieron haberse presentado en los niveles de 18 y 400 litros por el efecto del autosombreado debido a la densidad celular, influyendo posiblemente en la composición bioquímica de la microalga.

El pH de los cultivos en todos los niveles se mantuvieron entre 7.0 y 8.7, por lo tanto esta variable se mantuvo en el intervalo óptimo (7.7-8.9). Los cambios en los valores del pH estuvieron asociados al crecimiento microalgal, y a la actividad fotosintética, lo que ocasiona un incremento en el consumo de carbono y una disminución de la concentración de CO₂ en el medio y por consiguiente un aumento en el pH. La mayor parte del carbono inorgánico que esta disponible para el crecimiento algal esta en forma de bicarbonato,

cuando el carbono del HCO_3^- es utilizado para la fotosíntesis algal, una parte del CO_3^{2-} que se encuentra en el medio toma protones del agua para formar HCO_3^- con el objeto de compensar la disminución de su concentración, este proceso equilibra al medio, donde debido a la liberación de iones OH^- el pH se incrementa, mientras la concentración de carbono inorgánico disminuye (Uusitalo, 1996). Resultados similares han sido observados en cultivos de *Rhodomonas* sp. y en diatomeas bentónicas en los cuales el pH se incrementó conforme transcurrió el tiempo de cultivo (Lafarga-De la Cruz, 2000, Rojo-Salazar, 2002).

Al comparar el crecimiento de *P. cruentum* con el medio constituido con fertilizantes agrícolas y el medio f/2 en distintos volúmenes de cultivo (100 ml, 2 L, 18 L y 400 L) se observaron concentraciones celulares similares durante los siete días de cultivo; esto indica que el medio de cultivo con fertilizantes no afectó la tasa de crecimiento de *P. cruentum*, debido a que en ambos medios y en los diferentes volúmenes de cultivo, presentaron una fase de crecimiento exponencial y una fase de crecimiento lento el cultivo. Esto se debió a que las variables físico-químicas (Anexo C) y los nutrientes disueltos en el medio no fueron limitantes. Fue en la fase de crecimiento exponencial donde se observó que las células se duplican sucesivamente y donde se registraron las mayores tasas de crecimiento específico (μ), así como el mayor número de divisiones por día (D), observaciones similares en el ciclo de crecimiento han sido reportadas por Valenzuela-Espinoza (1997) en cultivos de *Isochrysis aff. galbana*, en *Rhodomonas* sp. por Lafarga de la Cruz (2000), en diatomeas bentónicas (Rojo-Salazar, 2002; Montes-Macias, 2004) y en *Thalassiosira pseudonana* por González-Muñoz (2004).

Las divisiones por día (D) 1.11-1.06 y la tasa de crecimiento (μ) 0.77-0.74 obtenidas en el nivel de columna, en medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente, son superiores a los obtenidos por Cohen *et al.* (1988) quienes reportan valores entre 0.65 y 0.98 divisiones por día (D) en *P. cruentum*, con irradiancias de 60 a 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, así mismo Sada *et al.* (1989), encuentran que el número de divisiones por día (D) en *P. cruentum* fue 0.27 y 0.85 bajo condiciones de irradiancia de 40 a 180 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en tanto que Friedman *et al.* (1991) señalan que las divisiones por día (D) en *Porphyridium* sp. bajo condiciones de irradiancia de 75, 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fueron 1.00, 1.00 y 0.50 respectivamente, por su parte, Dermoun y Chaumont (1992) reportan en *P. cruentum* valores de divisiones por día (D) de 0.82 y 1.11 en irradiancias de 64 a 367 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se demostró que la fuente y concentración de elementos que conformaron el medio con fertilizantes agrícolas, reunió los requerimientos de sales inorgánicas necesarias para promover el crecimiento de *P. cruentum*, asimismo este medio puede sustituir al medio f/2 en los volúmenes pequeños que tradicionalmente se emplean para el mantenimiento de la cepa, así como para la producción de inóculo para grandes volúmenes de cultivo. Lo cual reduciría considerablemente el costo asociado al uso de nutrientes para el cultivo de esta especie.

Respecto a la composición bioquímica de *P. cruentum* los contenidos de de proteínas, carbohidratos y lípidos, fueron mas elevados al inicio del periodo de cultivo, en ambos tratamientos, esto se debió a que la población algal (garrafón) usada como inóculo se encontraba en una fase de crecimiento lento, durante la cual las células viables

permanecen metabólicamente activas continúan fijando carbono lo cual ocasiona que continúen acumulando carbohidratos y lípidos. Brown *et al.* (1997) consideran que estos cambios se relacionan con la fase de cosecha y las condiciones de cultivo. En el presente trabajo como se había mencionado anteriormente el mayor contenido de proteínas se encontró durante las primeras 72 horas (43.6-26 y 46.2-30 pg cél⁻¹) para el medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente, posteriormente en la fase de crecimiento exponencial definida coincide con el periodo de disminución en los constituyentes bioquímicos, esta disminución es producto de la división celular de *P. cruentum*, los resultados en el contenido de proteínas en el medio con fertilizantes agrícolas son similares a los encontrados por Valenzuela-Espinoza (1997) en cultivos de *Isochrysis aff galbana*. Asimismo, Gracida-Valdepeña (1999) y Simental-Trinidad (1999) reportan resultados similares en cultivos de diatomeas bentónicas. Los resultados obtenidos en este estudio confirman la hipótesis que la fuente y concentración de nutriente del fertilizante agrícola producen la misma biomasa y cantidad de proteína que el medio f/2.

En relación al contenido de carbohidratos, la tendencia en su contenido fue similar al contenido protéico, es decir, registraron su mayor contenido durante las primeras 72 horas (38.8-20.1 y 42.2-24.8 pg cél⁻¹) para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente, el aumento en el contenido de carbohidratos en las células recién transferidas del inoculo anterior puede deberse a la recuperación de la capacidad fotosintética y se relaciona con el consumo de nutrientes así como un incremento en la tasa específica de crecimiento (μ).

En lo que respecta al contenido de lípidos, registran una tendencia similar a las proteínas y los carbohidratos, al final de la fase de crecimiento exponencial se expresó un

ligero incremento. La relación inversa entre la tasa de crecimiento y el contenido de lípidos, indica que las células acumulan lípidos como compuestos de reserva. Lafarga de la Cruz (1997), encontró un comportamiento similar, en cultivos de *Rhodomonas* sp. en medio f/2 donde todos los constituyentes celulares disminuyen durante la fase exponencial, mientras que en la fase de crecimiento lento disminuyen las proteínas y aumentan los lípidos.

Los resultados indican que la composición bioquímica de *P. cruentum*, está relacionada con la fase de crecimiento del cultivo o con el medio del cultivo, además los datos muestran que no hay una relación directa en el consumo de nutrientes y el contenido de constituyentes bioquímicos, lo cual se atribuye a que la velocidad de incorporación de nutrientes es mayor que la velocidad de la síntesis de los componentes bioquímicos.

El contenido promedio de ceniza fue menor al inicio de los cultivos sin embargo, tendieron a aumentar o a mantenerse constantes durante el transcurso del cultivo, asimismo, estos porcentajes de ceniza obtenidos (27 al 38%) muestran valores mayores con relación a los obtenidos por otros autores en *P. cruentum*. Ginzberg *et al.* (2000) obtuvieron valores del 10%, en contraste, Reboloso *et al.* (2000) y Bermejo *et al.* (2002) reportan valores del 20%.

En general, los componentes bioquímicos principales fueron las proteínas (18%), seguidos por los carbohidratos (15%) y los lípidos (6%) tanto para las microalgas cultivadas en medio f/2 así como para los fertilizantes agrícolas. Estos valores no concuerdan con los resultados mostrados por otros autores para *P. cruentum*. Reboloso *et al.* (2000) reportaron valores promedio de proteínas 34%, carbohidratos 32% y lípidos 6.5%, por otra parte, Bermejo *et al.* (2002) obtuvieron valores promedio de proteínas 35%, carbohidratos 33% y lípidos 6%, en contraste Ginzberg *et al.* (2000) reportan valores

promedio de proteínas 15%, carbohidratos 65% y lípidos 10%. Las discrepancias con estos trabajos, quizás estén asociadas a las distintas condiciones de cultivo así como a los métodos empleados para la determinación de los constituyentes.

El determinar el consumo de nutrientes en cultivos de microalgas es importante, ya que explica la respuesta fisiológica de las células en el medio de cultivo, asimismo, permite conocer el consumo de nutrientes de acuerdo a la tasa de crecimiento celular y producción de biomasa en los cultivos.

En relación al consumo de nitrato, se observó que la concentración residual de este compuesto en ambos medios de cultivo disminuye conforme transcurre el tiempo de experimentación, manteniendo una relación inversa al crecimiento, sin embargo el consumo acumulado, aumenta mostrando un comportamiento similar al crecimiento celular.

Durante los primeros tres días el consumo acumulado de nitrato en el medio f/2 fue solo de 348.6 μM , en cambio para los días restantes se incrementó hasta llegar a valores de 792.7 μM al séptimo día de cultivo. El medio formulado con fertilizantes agrícolas cuenta con dos fuentes de nitrógeno (nitrato y amonio) y se observó que en el consumo de nitrato durante los primeros tres días fue 115.6 μM , en cambio para los días restantes se incremento hasta 335.3 μM al séptimo día de cultivo, esto puede explicarse por la preferencia de las microalgas por la otra fuente de nitrógeno contenida en el medio (amonio) debido al menor costo energético para su consumo, asimismo se ha demostrado que el consumo de nitrato es mínimo en presencia del amonio, debido a que la nitrato reductasa no se encuentra activa mientras el amonio este presente y la nitrato reductasa se activa cuando las células agotan el amonio del medio de cultivo (Syrett, 1981).

De la misma forma que el nitrato, la concentración residual de fosfato en ambos medios de cultivo mostraron una relación inversa al crecimiento, durante las primeras 24 horas el consumo acumulado fue 7.3 μM y 7.2 μM para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente, durante este periodo las células estuvieron adaptándose al nuevo medio de cultivo y probablemente utilizaron sus reservas endógenas acumuladas en gránulos citoplasmáticos (Fogg y Take, 1987). Después del primer día y hasta el final del experimento el consumo acumulado de fosfato se incrementó hasta llegar a valores de 23.3 μM y 28.7 μM al séptimo día de cultivo para medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente, esto nos indica que esta Rhodophyta tiene la capacidad de emplear tanto el fosfato monobásico de sodio del medio f/2 así como el pentóxido de fósforo del medio con fertilizantes agrícolas.

Al relacionar las curvas de crecimiento de *P. cruentum*, con el consumo de fosfato en ambos medios de cultivo, se encontró, que después del quinto día la tasa de crecimiento específica (μ), el contenido de proteínas y carbohidratos disminuyen, en tanto que el contenido de lípidos comienzan a aumentar al final del período de cultivo, tanto en el medio f/2 como en el medio con fertilizantes agrícolas, esto sugiere que las reservas endógenas acumuladas regulan directa o indirectamente la tasa de crecimiento de *P. cruentum*, en cambio cuando hay condiciones limitantes de fosfato, no hay división celular, sin embargo hay un aumento en el volumen celular, donde reservas endógenas son encausadas a la síntesis de proteínas (Rhee, 1974).

Por otro lado, la concentración total de pigmentos puede ser modificada por variables ambientales como la irradiancia, la longitud de onda de la luz y la concentración de nitrógeno, (Kirk, 1994). La clorofila *a* es uno de los componentes celulares que se

utilizan como un índice confiable para estimar la biomasa microalgal. En el presente estudio, en ambos tratamientos el contenido de clorofila *a*, carotenoides totales y ficoeritrina aumentó los primeros días de cultivo y fue en este periodo donde se encontró el mayor contenido de estos pigmentos (8.6, 7.6 y 5.4 pg cél⁻¹) y (4.3, 2.3 y 2.8 pg cél⁻¹). Del cuarto al séptimo día de cultivo, su contenido disminuyó, la reducción en el contenido de los pigmentos celulares, se considera un proceso de regulación del aparato fotosintético para obtener un balance entre la ganancia de luz y la demanda de energía necesaria para mantener el crecimiento algal, este comportamiento ha sido observado en otras especies de fitoplancton marino (López-Muñoz *et al.*, 1992; Lafarga-De la Cruz, 2000; González-Muñoz, 2004). Asimismo, la tendencia a disminuir su contenido celular esta asociado con la disminución en la disponibilidad de nitrógeno y fosfato en el medio, ya que en varios grupos microalgales (especialmente la cianobacterias y algas rojas) la disminución de nutrientes provoca un descenso en el contenido pigmentario y en la tasa de fotosíntesis (Kost *et al.*, 1984).

Los resultados en el contenido de clorofila *a*, carotenoides totales y ficoeritrina de *P. cruentum* con una irradiancia de 1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtenidos en el presente estudio tanto con medio *f/2* y fertilizantes agrícolas, son superiores a los reportados por Friedman *et al.* (1991) en *Porphyridium* sp. y *Porphyridium aerigineum* quienes reportan concentraciones de 0.3 y 1.1 pg cél⁻¹ de clorofila *a*, carotenoides totales de 0.2 y 0.5 pg cél⁻¹ y de ficoeritrina de 2.0 y 2.7 pg cél⁻¹ bajo condiciones de irradiancia de 75, 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, así mismo Bermejo *et al.* (2002) obtuvieron concentraciones de 0.6 pg cél⁻¹ de clorofila *a*, carotenoides totales de 0.1 pg cél⁻¹ y de ficoeritrina de 2.0 pg cél⁻¹ en *Porphyridium cruentum*, bajo condiciones de irradiancia de 180 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en

cambio al comparar los resultados de este estudio con los citados por Reboloso *et al.* (2000), observamos que los valores en el contenido de clorofila *a* (21.3 pg cél⁻¹), en carotenoides totales (10.2 pg cél⁻¹) y en ficoeritrina (20.2 pg cél⁻¹) son mayores a los aquí expuestos.

Las diferencias del contenido de clorofila *a*, en carotenoides totales y en la ficoeritrina obtenidos en este trabajo con los autores antes mencionados pueden deberse a la cantidad y calidad del inóculo, a la irradiancia, así como a la concentración y forma química de nutrientes en el medio, los cuales pueden afectar la producción de este pigmento (Whyte, 1987).

Conforme a los resultados obtenidos en el presente trabajo, el medio de cultivo con fertilizantes agrícolas produjo una biomasa celular y parámetros poblacionales similares a las obtenidas con el medio *f/2* de Guillard (1975), obteniendo también una composición proximal similar, por lo que podría ser una opción alternativa en el cultivo de esta microalga.

Estos resultados confirman que el uso de los fertilizantes agrícolas en la elaboración de medios de cultivo para la producción masiva de *P. cruentum*. disminuye considerablemente los costos de producción que implica su cultivo.

VI. CONCLUSIONES.

- * La biomasa microalgal obtenida en el medio constituido por fertilizantes agrícolas es similar a la producida en medio f/2 para el mismo período de cultivo.
- * La fuente y concentración de nutrientes de los fertilizantes agrícolas no causaron cambios importantes en la composición proximal de *P. cruentum* durante los siete días de cultivo.
- * El análisis del consumo de nutrientes mostró que no hubo limitación de nitratos y fosfatos durante siete días de cultivo.
- * El contenido de clorofila *a*, carotenoides totales y ficoeritrina en el cultivo basado en fertilizantes agrícolas es similar al obtenido en medio f/2 para el mismo período de cultivo.
- * El costo de producción se reduce aproximadamente un 40% al utilizar el medio con fertilizantes agrícolas.

Literatura citada.

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, Concepción. 1995. Microalgas, cultivos y aplicaciones. Universidad de la Coruña. Casa del Libro. España. 205 pp.
- Antia, M., J.C. Merchuck y S. Arad, 1970. The tocopherol, vitamin K and related isoprenoid quinone composition of an unicellular red alga *Porphyridium cruentum*. J. Phycol. 6:301-312 .
- Arad, S. 1987. Biochemicals from unicellular red algae international industrial. J. Biotech. 54:281-283 .
- Arredondo-Vega, B.O. y R. Vázquez-Duhalt. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. Ciencia y Desarrollo. 8:99.
- Becker, E. W. 1994. Microalgae biotechnology and microbiology. Cambridge:Cambridge University Press. USA. 290 pp.
- Bennet, A. y L. Bogorad. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. J. Cell. Biol. 58:419-422.
- Bermejo-Roman, R.J., M. Alvarez-Pez., F.G. Acien-Fernandez y E. Molina-Grima. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from microalga *Porphyridium cruentum*. J. Biotech. 93:73-85.
- Bligh, E.G. y W. Dayer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can, J. Biochem. Physiol. 37:911-917.
- Bradford, M. 1976. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Can. Biochem. Physiol. 37:911-917.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey., J.K. Volkman y G.A. Duntans. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture. 151:315-331.
- Cohen, Z., A. Vonshak y A. Richmond. 1988. The effect of environmental conditions on fatty acid composition of *Porphyridium cruentum*. J. Phycol. 24:328-332.
- Damonte, E., M. Matulewicz., A. Cerezo y C. Coto. 1990. *Herpes simplex* virus inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. Chemotherapy. 42:576-579.
- Dermoun, D., D. Chaumont., J.M. Thebault y A. Dauta. 1992. Modelling of growth *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors light and temperature. Bioresource Technology 42:113-117.

- Dubois, M., K.A. Gilles., J.K. Hamilton., P.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Fabregas, J., C. Herrero., J. Abalde., R. Liaño y B. Cabezas. 1985. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalgae *Isochrysis galbana*. Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture* 83:17-37.
- Friedman, O., Z. Dubinsky y S. Arad. 1991. Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue green algae. *Bioresource Technology* 38:105-110.
- Fogg, G.E. y B. Take. 1987. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press. USA. 259 pp.
- Geider, R.J., J. La Roche., R.M. Greene y M. Olaizola. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J. Phycol.* 29:755-766.
- Ginzberg, A., M. Cohen., U. Sod-Moriah., S. Shraga., A. Rosenshtrauch y S. Arad. 2000. Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium cruentum* have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *J. Phycol.* 12:325-330.
- Golueke, C.G. y W.J. Oswald. 1962. The mass culture of *Porphyridium cruentum*. *Applied Microbiology*. 10:102-110.
- González-Rodríguez, E. S. y S. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. *Aquaculture*. 36:245-256.
- González-Muñoz, J.A. 2004. Crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) cultivada en medio f/2 y fertilizantes agrícolas con luz fluorescente e incandescente. Tesis de Licenciatura, C.U.C.B.A, U de G. Guadalajara, Jalisco. 50 pp.
- Gracida-Valdepeña, M. 1999. Producción de tres especies de Diatomeas utilizando una mezcla de fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría C.I.C.E.S.E. Ensenada, Baja California. 108 pp.
- Graziano, L.M., J. La Roche y R.J. Geider. 1996. Physiological responses to phosphorus limitation in batch steady-state cultures of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) A unique stress protein as indicator of phosphate deficiency. *J. Phycol.* 32:825-832.
- Gudín, C., A. Bernard., D. Chaumont., C. Thepenier y T. Hardy. 1984. Direct bioconversion of solar energy into organic chemicals. *J. Biotech.* 84:541-550.

- Guillard, R.R.L y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. *J. Microbiol.* 8:229-239.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. En Stein, J.R. (ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements.* Cambridge University Press, 289-313.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates animals. En: *Culture of Marine invertebrates animals.* Smith, W. L y Chanley (eds). Plenum Publishing Corp., New York, 338 pp.
- Guzman-Murillo, M.A y F. Ascencio. 2000. Anti-adhesive activity of sulphated exopolisaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells, *Letters in Applied Microbiol.* 30:273-476.
- Harrison, P.J., P.A. Thompson y G.S. Calderwood. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 2:45-56.
- Hemericks, G. 1973. Culture methods and growth measurements. En Stein, J.R. (ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements.* Cambridge University Press, 259-260.
- Jones, R.E., L. Spencer y W. Kury. 1963. Studies on the growth of red alga *Porphyridium cruentum*. *Physiologia Plantarum.* 16:636-643.
- Kinne, O. 1976. *Marine Ecology. A Comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters.* Wiley-Interscience. Londres, 578 pp.
- Kirk, J.T.O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems.* Second edition Cambridge University Press, 260-290.
- Kost, H.P. M. Sener y G. Warnner. 1984. Effect of nitrate and sulphate starvation on *Porphyridium cruentum* cells. *Plant Physiol.* 113:231-249.
- Kufferath, H. 1937. Notes sur la physiologie et la morphologie de *Porphyridium cruentum* Naeg. *Bull. Societe Royal Botanique Belgium.* 52:286-290.
- Kylin, H. 1937. Uber eine marine *Porphyridium* Kungl. *Fysiografiska sallskapets Handligar,* 7:119-123.
- Lafarga-De la Cruz, F. 1997. Relación entre consumo de nutrientes y los cambios en la composición bioquímica de *Rhodomonas* sp. cultivada con el medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Licenciatura, UABC. Ensenada Baja California. 50 pp.

- Lafarga-De la Cruz, F. 2000. Interacción entre luz, consumo de nutrientes, composición celular y producción de *Rhodomonas sp.* en cultivos estáticos. Tesis de Maestría, UABC. Ensenada, Baja California 133 pp.
- Lee, Y.K., H. Tan y C. Hew. 1985. The effect of growth temperature on the bioenergetics of photosynthetic algal cultures. *Biotech and Bioengineering* 27:555-561.
- Lee, T. y M. Bazin. 1991. Environmental factors influencing photosynthetic efficiency of the micro red alga *Porphyridium cruentum* in light limited cultures. *J. Phycol* 18:513-519.
- Levasseur, M., P.A. Thompson y P.J. Harrison. 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *J. Phycol.* 29:587-595.
- Lewitus, J.A. y D.A. Caron. 1990. Relative effects of nitrogen or phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61:171-181.
- López-Elías, J. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas.* 19 (2):168-180.
- López-Muñoz, I., J. Abalde y C. Herrero. 1992. Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *Nova Acta Científica Compostelana (Biologia).* 3:59-65.
- Lourenco, S.A., E. Barbarino., U.M. Lanfer y E. Aidar. 1998. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. *J. Phycol.* 34:798-811.
- Montes-Macias, R. A. 2004. Cultivo de *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, utilizando medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Licenciatura, C.U.C.B.A, U de G. Guadalajara, Jalisco. 70 pp.
- Morel, F.F.M., E. Reuter., D.M. Anderson y R.L.L. Guillard. 1979. Aquil: a chemically defined phytoplankton culture media for trace metal studies. *Limnol. Oceanogr.* 36:1742-1755.
- 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. UABCS. La Paz, Baja California México. 54 pp.
- Pande, S.V., R. Parvin y T. Venkitasubramanian. 1963. Microdeterminacion of lipid and serum total fatty acid. *Analyt. Biochem.* 6:415-423.

- Parson, T.R., Y. Maita y C.M. Lalli. 1985. Manual of chemical and biological methods for seawater analysis. First edition. Ed. Pergamon Press. USA. 173 pp.
- Pringsheim, E.G y O. Pringsheim. 1949. The growth requirements of *Porphyridium cruentum* with remarks in the ecology of brackish water algae. J. Ecology 37:54-64.
- Pruder, G.D. y E.T. Bolton. 1978. System configuration and performance Bivalve Molluscan Mariculture. Proceeding of the Annual Meeting World Mariculture Society. 749-759.
- Raush, T. 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. Hidrologia, 78:237-251.
- Reboloso-Fuentes, M.M. G.G. Acien-Fernandez, J.A. Sanchez-Perez, y J.L. Guill-Guerrero. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. Food Chemistry. 70:345-353.
- Reitan, K.I., J.R Rainuzzo., G. Oie y I. Olsen. 1997. A review of nutritional effects of algae marine in fish larvae. Aquaculture, 170:147-159.
- Rhee, G-Yull. 1974. Phosphate uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp and its ecological implications. J. Phycol. 10:470-475.
- Rojos-Salazar, G. 2002. Supervivencia y crecimiento de *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) alimentadas con diatomeas bentónicas. Tesis de Maestría, UABC, Ensenada, Baja California. 94 pp.
- Sada, E., S. Katho y H.Yokoi. 1989. Effects of light intensity on the growth of the red algae *Porphyridium cruentum*, J. Phycol. 2:135-137.
- Sánchez-Saavedra, M. y D. Voltolina. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. Comp. Biochem. Physiol. 107B(1):39-44.
- Servel, M.O., C. Claire., A. Derrien., L. Coiffard y Y. Deroeckholtzhauer. 1994. Fatty acid composition of some marine microalgae. Phytochemistry. 36:691-693.
- 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. C.I.C.E.SE. Ensenada Baja California. 115 pp.
- Simental-Trinidad, J.A., M. Sánchez-Saavedra, y J.G. Correa-Reyes. 2001. Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. J. Shellfish Res. 20:611-617.

- Sommer, U. 1997. Selectivity of *Idothea chelipes* (Crustacea:Isopoda) grazing on benthic microalgae. *Limnol. Oceanogr.* 42(7):1622-1628.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cells volume and optical density a method for the production of unicellular algal food. En Stein, J.R. (ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements.* Cambridge University Press, 322-343.
- Starr, R.C. 1960. The culture collection of algae at Indiana University. *America Journal of Botany*, 47:67-80.
- Strzepek, R.F. y N. Price. 2002. Influence of irradiance and temperature on the iron content of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Marine Ecol. Prog. Ser.* Vol. 206:107-117.
- Syrett, P.J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. En: T. Platt (ed). *Physiological bases of phytoplankton ecology.* *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210:182-210.
- Talyshinky, M., Y. Souprun y M. Huleihel. 2000. Antiviral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer cell International* 2:1-8.
- Turpin, D.H. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* 27:14-20.
- Uusitalo, J. 1996. Algal carbon uptake and the difference between alkalinity and high pH (alkalization) exemplified with a pH drift experiment. *Sci. Mar.* 60(1):129-134.
- Valenzuela-Espinoza, E. 1997. Uso de un medio alterno al f/2 para el cultivo de *Isochrysis aff galbana* (CLONE T-ISO). Tesis de Maestría, UABC. Ensenada, Baja California. 51 pp.
- Valenzuela-Espinoza, E., V. Gendrop-Funes, R. Pérez-Castañeda, y J.G. Wilburn-González. 1999. Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boon) alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas* 25(3):423-437.
- Vonshak, A., Z. Cohen y A. Richmond. 1985. The feasibility of mass cultivation of *Porphyridium*. *Biomass* 8:13-25.
- Whyte, J.N. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture.* 60:231-241.

Wyman, M. y P. Fay. 1986. Interaction between light quality and nitrogen availability in the differentiation of akinetes in the planktonic cyanobacterium *Gloetrichia echinulata*. British Phycological Journal. 21:147-153.

ANEXOS

Anexo A medios de cultivo

Tabla XIII Compuestos y concentración de nutrientes para preparar el medio f/2 de Guillard (1975) y el medio con fertilizantes agrícolas descrito Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999).

Medio F/2			Fertilizante Agrícola			
Nutrientes mayores	Cant.	Conc. μ Molar	Nombre Comercial	Nutrientes mayores	Cant.	Conc. μ Molar
NaNO_3	75 mg	883	Fertimex	NH_4NO_3	36.8mg	882
NaH_2PO_4	5 mg	36.3	Subdury	P_2O_5	5.6mg	39.4
Na_2SiO_3	30 mg	107	Penta silicato	Na_2SiO_3	30 mg	107
Metales traza			Metales traza			
Na_2EDTA	4.36 mg	11.7	KGRO	Fe-EDTA	5.4mg	5.51
FeCl_3	3.15 mg	11.7	KGRO	Fe-no quelado	70.7mg	1265.8
CuSO_4	0.01 mg	0.04	KGRO	CuSO_4	2.0mg	13.92
ZnSO_4	0.022 mg	0.08	KGRO	ZnSO_4	1.09mg	6.75
CoCl_2	0.01 mg	0.05	KGRO	MnSO_4	1.09mg	8.07
MnCl_2	0.18 mg	0.9	KGRO	Sulfatos	45.84mg	1429.6
Na_2MoO_4	0.006 mg	0.03				
Vitaminas			Vitaminas			
B_{12}	0.5 μ g		B_{12}	0.5 μ g		
Biotina	0.5 μ g		Biotina	0.5 μ g		
Tiamina	0.1mg		Tiamina	0.1mg		

Anexo B Variables fisico-químicas

Tabla XIV. Variables físicas químicas en los cultivos de *Porphyridium cruentum* cultivada en Fernbach (2 L) Garrafón (18 L) y Columna (400 L) con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B).

(A)

Día	Fernbach			T°C	Garrafón			T°C	Columna	
	T°C	pH	S‰		pH	S‰	pH		S‰	
1	21	7.0	34	22.5	8.4/7.5	34	22	7.5	34	
2	21	7.7	34	21	8.7/7.3	34	21	8.0/7.4	34	
3	21	8.5/7.0	34	21	8.5/6.9	34	21	8.3/7.5	34	
4	21.5	8.4/7.2	34	21.5	8.5/7.2	34	20.5	8.3/7.6	34	
5	21	8.5/7.2	34	21	8.7/7.2	34	20.5	8.2/7.2	34	
6	21	8.7/7.0	34	21	8.5/7.1	34	20.5	8.2/7.4	34	
7	21	8.7/7.0	34	21	8.4/7.0	34	20	8.0/7.3	34	

(B)

Día	Fernbach			T°C	Garrafón			T°C	Columna	
	T°C	pH	S‰		pH	S‰	pH		S‰	
1	21	7.0	34	22.5	8.1/7.0	34	21.5	7.5	34	
2	21	7.6	34	20	8.4/7.0	34	21	8.0/7.4	34	
3	21	8.2/6.9	34	20	8.5/6.9	34	20.5	8.1/7.5	34	
4	21.5	8.0/7.0	34	21.5	8.6/7.0	34	20.5	8.1/7.1	34	
5	21	8.1/7.0	34	21	8.5/7.0	34	20.5	8.2/7.1	34	
6	21	8.1/7.0	34	21	8.6/7.0	34	20	8.2/7.2	34	
7	21	8.1/7.0	34	21	8.5/7.0	34	20	8.1/7.1	34	