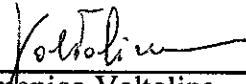


RESUMEN de la tesis de Carmen Guadalupe Paniagua Chávez presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en OCEANOLOGIA con opción en ECOLOGIA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Enero de 1993.

VIABILIDAD, COMPOSICION PROXIMAL Y VALOR ALIMENTICIO DE *Dunaliella* sp. PRESERVADA POR CONGELAMIENTO

Resumen aprobado por:


Dr. Domenico Voltolina
Director de Tesis

Se cultivaron dos cepas de *Dunaliella* y una de *Tetraselmis* con la finalidad de producir alimento para *Artemia franciscana* y para estudiar la factibilidad de su preservación por congelamiento, para su utilización como alimento preservado o como inóculo para cultivos masivos.

Para seleccionar una cepa entre las tres a disposición, se utilizaron tres medios alternativos basados en el uso de fertilizantes agrícolas y medio "f" como control. Los mejores crecimientos se obtuvieron con el último, y se demostró la escasa factibilidad del uso de medios alternativos. Por otro lado, los resultados de los análisis proximales indican que el contenido protéico celular de *Dunaliella* es notablemente mayor en los cultivos con un medio basado en sales de amonio. No se notaron diferencias importantes en la producción de biomasa o en la composición proximal entre las cepas de *Dunaliella*. Para *Tetraselmis* la producción diaria de sustancia orgánica es superior a la que se obtiene con *Dunaliella* (0.2 g por unidad productiva de 10 l para *Dunaliella*, en comparación con 0.3-0.4 g para *Tetraselmis*). Cualitativamente la biomasa no es muy diferente, con la excepción de los carbohidratos que son inferiores en el caso de *Tetraselmis*. Se demostró que *Tetraselmis* no puede ser utilizada como alimento para *Artemia franciscana*. Entre las dos cepas de *Dunaliella*, que no presentaron diferencias en la cantidad o calidad de biomasa producida, se seleccionó la que tuvo mejores características por lo que se refiere al manejo del sistema de cultivo.

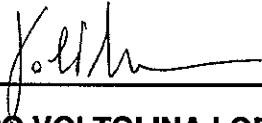
La talla de juveniles y adultos de *Artemia* alimentados con *Dunaliella* preservada es inferior a la de los de igual edad mantenidos con alimento fresco. La composición proximal de *Artemia* al momento de terminar el bioensayo señala diferencias entre los organismos mantenidos con alimento fresco y congelado, sobre todo para los lípidos.

La composición proximal de la cepa preservada por congelación después de diferentes tiempos de conservación, indica que hubo pérdidas importantes de las tres fracciones orgánicas, que disminuyeron notablemente en comparación con los datos iniciales.

La viabilidad de las tres cepas no es afectada por el proceso de congelamiento, pero disminuye notablemente con el tiempo de almacenamiento.

TESIS DEFENDIDA POR: CARMEN GUADALUPE PANIAGUA CHAVEZ

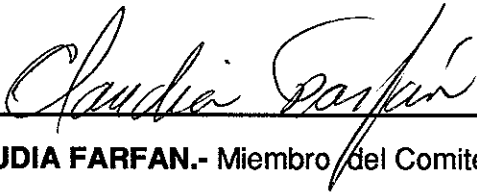
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE:



DR. DOMENICO VOLTOLINA LOBINA.- Director del Comité



DRA. DIANA TENTORI SANTA CRUZ.- Miembro de Comité

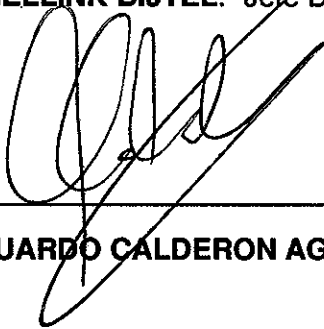


M.C. CLAUDIA FARFAN.- Miembro del Comité



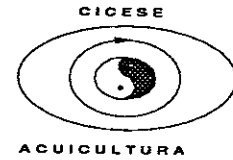
M.C. BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL.- Miembro del Comité

DR. ERICK MELLINK BIJTEL.- Jefe Depto. Ecología Marina



DR. LUIS EDUARDO CALDERON AGUILERA.- Director de Estudios de Posgrado

18 DE ENERO DE 1993



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE EDUCACION
SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

VIABILIDAD, COMPOSICION PROXIMAL Y VALOR ALIMENTICIO DE
Dunaliella sp. PRESERVADA POR CONGELAMIENTO

TESIS

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

presenta

CARMEN GUADALUPE PANIAGUA CHAVEZ

Ensenada, B. C., Enero de 1993.

A mis padres quienes
me dieron la vida y el
amor.

A Manuel, quien me dio el
amor y la vida.

A mis hermanos con
cariño.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Domenico Voltolina por aceptarme como su estudiante, apoyarme en el trabajo de tesis y compartir conmigo algo de su gran experiencia.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Domenico Voltolina, Dra. Diana Tentori, M en C. Claudia Farfán por sus valiosas sugerencias.

En especial a la Cand. Dr. Beatriz Cordero Esquivel quien siempre estuvo conmigo y fue mi maestra en el laboratorio.

Al Dr. Francisco Correa y Cand. Dr. Pilar Sánchez por su apoyo y acertadas sugerencias en el trabajo experimental.

Al M. en C. Miguel Angel del Río, gran amigo y compañero con quien aprendí a utilizar una microcomputadora y recibí valiosas sugerencias.

Al M. en C. Manuel Segovia por la ayuda brindada y paciencia en los días de mucho trabajo.

A los técnicos Norberto Flores y Francisco Valenzuela por la ayuda en la instalación del sistema de cultivo.

A todos mis compañeros estudiantes por todos los momentos compartidos.

Al personal Departamento de Acuicultura, gracias.

En especial a la M. en C. Claudia Farfán jefa del departamento, quien me brindó todo su apoyo para ser aceptada en esta institución, muchas gracias.

A la C. P. Saidé Chávez por la ayuda ofrecida en la toma de fotografías.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por el apoyo brindado para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la ayuda económica y pago de colegiaturas.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
I INTRODUCCION.	1
I.1 Objetivos	5
II MATERIALES Y METODOS.	6
II.1 Cepas.	6
II.2 Evaluación de biomasa.	7
II.3 Selección de medios en cultivos terminales.	9
II.4 Selección de cepas y medios en cultivos semimasivos semicontínuos.	11
II.5 Valor dietético de la biomasa.	12
II.5.1 Composición proximal.	12
II.5.1.1 Modificación al método de Lowry.	14
II.5.2 Bioensayo de eficiencia dietética.	15
II.6 Preservación de biomasa.	17
II.6.1 Cosecha y criopreservación.	17
II.6.2 Sobrevivencia y viabilidad	17
II.6.3 Choque osmótico.	18
III RESULTADOS.	19
III.1 Medios alternativos.	19
III.1.1 Selección de medios alternativos para la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1.	19

CONTENIDO (Continuación)

	<u>Página</u>
III.1.2 Selección de medios alternativos para la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2.	22
III.1.3 Selección de medios alternativos para <i>Tetraselmis</i> sp.	25
III.2 Experimentos de cultivos semimasivos semicontinuos.	28
III.2.1 Crecimiento y dilución óptima para la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1.	28
III.2.2 Crecimiento y dilución óptima para la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2.	31
III.2.3 Crecimiento y dilución óptima para <i>Tetraselmis</i> sp.	34
III.2.4 Composición proximal.	36
III.2.5 Selección de cepa	38
III.3 Valor dietético de la biomasa.	40
III.3.1 Bioensayo de eficiencia dietética.	40
III.3.2 Composición proximal de <i>Artemia</i> .	44
III.3.3 Composición proximal de <i>Dunaliella</i> DU-X-2 con diferentes tiempos de conservación.	47
III.4 Cosecha y criopreservación.	50
III.4.1 Cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1.	50
III.4.1.1 Centrifugación.	50
III.4.1.2 Criopreservación.	50
III.4.2 Cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2.	53

CONTENIDO (Continuación)

	<u>Página</u>
III.4.2.1 Centrifugación.	53
III.4.2.2 Criopreservación.	53
III.4.3 <i>Tetraselmis</i> sp.	56
III.4.3.1 Centrifugación.	56
III.4.3.2 Criopreservación.	56
IV DISCUSION.	59
IV.1 Medio de cultivo	59
IV.2 Criopreservación de <i>Dunaliella</i> sp.	62
IV.3 Utilización de <i>Dunaliella</i> en la acuicultura.	64
V CONCLUSIONES.	67
LITERATURA CITADA.	68

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. Rectas y ecuaciones de calibración para las cepas DU-X-1 (a), DU-X-2 (b) y <i>Tetraselmis</i> sp. (c).	8
2. Curvas de crecimiento para la cepa DU-X-1 cultivada con diferentes medios a).- Medio "f", b).- Medio urea-fosfato diamónico, c).- Medio nitrato de amonio-fosfato diamónico y d).- Medio sulfato de amonio-fosfato diamónico.	19
3. Curvas de crecimiento para la cepa DU-X-2 cultivada con diferentes medios a).- Medio "f", b).- Medio urea-fosfato diamónico, c).- Medio nitrato de amonio-fosfato diamónico y d).- Medio sulfato de amonio-fosfato diamónico.	22
4. Curvas de crecimiento para <i>Tetraselmis</i> sp. cultivada con diferentes medios a).- Medio "f", b).- Medio urea-fosfato diamónico, c).- Medio nitrato de amonio-fosfato diamónico y d).- Medio de sulfato de amonio-fosfato diamónico.	25
5. Cultivos semicontinuos en medio "f" de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1 con diluciones del 60% (a) y 30% (b).	28
6. Cultivos semicontinuos en medio "f" de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2 con diluciones del 60% (a) y 30% (b).	32
7. Crecimiento de <i>Artemia franciscana</i> alimentada con la cepa de <i>Dunaliella</i> (DU-X-2) en forma fresca y congelada. a).- Tallas en mm y b).- Logaritmo natural de las tallas en mm.	41

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
I.	Medios de cultivo "f", nitrato de amonio-fosfato diamónico (NAM), urea-fosfato diamónico (NUR) y sulfato de amonio-fosfato diamónico (SAM). Concentración de los enriquecimientos en un litro de agua.	10
II.	Raciones de la microalga <i>Dunaliella</i> cepa DU-X-2 administrada a <i>Artemia franciscana</i> según su edad.	16
III.	Análisis de varianza de los resultados de cultivo en Erlenmeyer de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1 en los tres medios de cultivo experimentales y en el control (A): para la tasa de crecimiento en la fase exponencial y (B): para la biomasa de los tres últimos días de la fase estacionaria.	20
IV.	Valores promedio y desviación estandar de la tasa de crecimiento en fase exponencial y la biomasa producida durante los últimos tres días de la fase estacionaria de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1 cultivada con diferentes medios. También se indican los resultados de la prueba de análisis de intervalos múltiples ($\alpha = 0.05$) para la cantidad de biomasa producida.	21
V.	Análisis de varianza de los resultados de los cultivos en Erlenmeyer de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2 en los tres medios de cultivo experimentales y en el control (A): para la tasa de crecimiento en fase exponencial y (B): prueba de Kruskal Wallis para la biomasa de los tres últimos días de la fase estacionaria.	23
VI.	Valores promedio y desviación estandar de la tasa de crecimiento en fase exponencial y la biomasa producida durante los últimos tres días de la fase estacionaria de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2 cultivada con diferentes medios. También se indican los resultados de la prueba de análisis de intervalos múltiples ($\alpha = 0.05$) para la cantidad de biomasa producida.	24
VII.	Análisis de varianza de los resultados de los cultivos en Erlenmeyer de <i>Tetraselmis</i> sp. en los tres medios de cultivo experimentales y en el control (A): para la tasa de crecimiento en fase exponencial y (B): para la biomasa de los tres últimos días de la fase estacionaria.	26

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
VIII.	Valores promedio y desviación estandar de la tasa de crecimiento en fase exponencial y de la biomasa producida durante los últimos tres días de la fase estacionaria para <i>Tetraselmis</i> sp. cultivada con diferentes medios. También se indican los resultados de la prueba de análisis de intervalos múltiples ($\alpha = 0.05$) para la cantidad de biomasa producida.	27
IX.	Biomazas máximas producidas con los diferentes medios, de los cultivos semimasivos semicontinuos de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1.	30
X.	Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de intervalo múltiple para la comparación de las biomazas máximas producidas por cada medio en cultivo masivo para la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1.	30
XI.	Biomazas máximas producidas con los diferentes medios, en los cultivos semimasivos semicontinuos de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2.	33
XII.	Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de intervalo múltiple para la comparación de las biomazas máximas producidas por cada medio en cultivo masivo para la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2.	33
XIII.	Biomazas (promedio y desviación estandar) obtenidas por unidad productiva de cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp. en medio "f" y en medio alternativo (**= $\alpha \leq 0.01$) (López Elias, 1990).	35
XIV.	Resultados de los análisis proximales (promedio y desviación estandar) de las cepas de <i>Dunaliella</i> DU-X-1 y DU-X-2, cultivadas en medio de nitrato de amonio-fosfato diamónico ($\text{NH}_4\text{NO}_3/2$) y medio "f", y de <i>Tetraselmis</i> sp. cultivada solo en medio "f".	36
XV.	Tallas (promedio y desviación estandar), de los diferentes estadios de <i>Artemia franciscana</i> alimentada con la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2, prueba estadística utilizada (KW: Kruskal-Wallis; ANOVA: Análisis de varianza de una vía). N, M, J y A: nauplius, metanauplius, juveniles y adultos, respectivamente. La segunda letra (F: fresca; C: congelada) se refiere a la dieta empleada. S y SN: significativo o no significativo ($\alpha = 0.05$)	43

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XVI.	Análisis de varianza para la comparación de tallas adultos en edad de primera apareación, alimentada con los dos tipos de dieta.	43
XVII.	Resultado del análisis proximal (promedio y en paréntesis, desviación estandar) de adultos de <i>Artemia franciscana</i> alimentadas con <i>Dunaliella</i> (DU-X-2) en presentación fresca y congelada, % de P.S y % de P.S.O.: indican los porcentajes de peso seco y peso seco orgánico respectivamente.	45
XVIII.	Análisis de varianza para las fracciones orgánicas de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>Dunaliella</i> DU-X-2 fresca y preservada por congelamiento (A) proteínas, (B) carbohidratos y (C) lípidos.	46
XIX	Composición proximal de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2 después de congelada (muestra inicial) y después de 15 y 30 días de almacenamiento. La parte superior (A) reporta los datos como porcentajes del peso seco total de la muestra inicial. En (B), los mismos datos se dan como porcentaje del peso orgánico de la misma muestra inicial. En paréntesis se indica la desviación estandar.	48
XX.	Análisis de varianza para (A): La fracción de proteínas, (B): carbohidratos y (C): lípidos de la cepa DU-X-2 con diferentes tiempos de congelacion.	49
XXI.	Sobrevivencia y viabilidad de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1 con inóculos de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 ; sin centrifugar (SC) y centrifugada a 1800 y a 1000 r.p.m. después de 3 (3d), 5 (5d) y 15 (15d) días de incubación. (-----) no se hicieron mediciones, después de comprobar crecimiento en los tres tubos de cada dilución.	51
XXII.	Sobrevivencia y viabilidad de inóculos diferentes de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-1 después de una semana, quince días y un mes de congelamiento, sin y con choque osmótico. Los números indican los días necesarios para que se produjera crecimiento medido como aumento de la densidad óptica y revisión microscópica; T ₁ , T ₂ y T ₃ (tubos 1, 2 y 3).	52

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XXIII.	Sobrevivencia de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2 con inóculos de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 ; sin centrifugar (SC) y centrifugada a 1800 y a 1000 r.p.m. después de 3 (3d), 5 (5d) y 15 (15d) días de incubación. (-----) no se hicieron mediciones, después de comprobar crecimiento en los tres tubos de cada dilución.	54
XXIV.	Sobrevivencia y viabilidad de inóculos diferentes de la cepa de <i>Dunaliella</i> DU-X-2 después de una semana, quince días y un mes de congelamiento, sin y con choque osmótico. Los números indican los días necesarios para que se produjera crecimiento medido como aumento de la densidad óptica y revisión microscópica; T ₁ , T ₂ y T ₃ (tubos 1, 2 y 3).	55
XXV.	Sobrevivencia y viabilidad de <i>Tetraselmis</i> sp. con inóculos de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 ; sin centrifugar (SC) y centrifugada a 1800 y a 1000 r.p.m. después de 3 (3d), 5 (5d) y 15 (15d) días de incubación. (-----) no se hicieron mediciones, después de comprobar crecimiento en los tres tubos de cada dilución.	57
XXVI.	Sobrevivencia y viabilidad de inóculos diferentes de <i>Tetraselmis</i> sp. después de una semana, quince días y un mes de congelamiento, sin choque osmótico. Los números indican los días necesarios para que se produjera crecimiento medido como aumento de la densidad óptica y revisión microscópica; T ₁ , T ₂ y T ₃ (tubos 1, 2 y 3).	58

VIABILIDAD, COMPOSICION PROXIMAL Y VALOR ALIMENTICIO DE

Dunaliella sp. PRESERVADA POR CONGELAMIENTO.

I. INTRODUCCION.

El principal recurso alimenticio para el cultivo de varios organismos acuáticos, tanto moluscos bivalvos como larvas de crustáceos y peces, son las microalgas (Fernández Reiriz *et al.*, 1989). Por este motivo, el éxito de una granja de producción (expresado en términos de mortalidad, de crecimiento y, en el caso de organismos bivalvos, de la tasa de fijación) está condicionado a la disponibilidad de este tipo de alimento. Esto significa que es necesario contar con una gran producción de biomasa para poder garantizar el desarrollo normal y el crecimiento de la especie que se quiere cultivar (De Pauw *et al.*, 1983 y 1984).

Hay que considerar que no es solamente necesario mantener una alta producción algal, sino que también hay que transferir eficientemente este alimento a los niveles superiores de la cadena trófica (Fabregas *et al.*, 1986). Para obtener este resultado las microalgas tienen que ser consideradas bajo dos puntos de vista igualmente importantes: su composición proximal y su valor nutricional específico. El conocimiento de la composición proximal y bioquímica de una dieta está implícito en las características de su valor nutricional, pero no es el único factor que debe ser considerado cuando se estudia la factibilidad de utilizar una especie fitoplanctónica como alimento; otros factores, como el tamaño de la célula y la digeribilidad han sido sugeridos como explicaciones de las diferencias en el valor dietético de diferentes especies (Fernández Reiriz *et al.*, 1989). También hay que considerar otros factores, que pueden producir cambios en la composición proximal de una microalga; entre éstos la forma de cultivarla (p. e. manteniéndola en cultivos semicontinuos o continuos con diferentes tasas de cosecha, el variar la cantidad y las concentraciones relativas de los nutrientes presentes en el medio o el introducir

artificialmente factores limitantes como falta de CO₂ o de luz), o mantenerla y cosecharla en diferentes fases de crecimiento son las que se mencionan más frecuentemente (Fabregas *et al.*, 1989; Fogg y Thake, 1987).

Debido a que, como se dijo anteriormente, es necesario tener una gran producción de biomasa y que el costo de preparación de los medios tradicionales utilizados para el cultivo es relativamente alto (Stein, 1973; Fabregas *et al.*, 1984; Fabregas *et al.*, 1985), se ha intentado producir microalgas a un costo más bajo utilizando medios formulados con fertilizantes (Herrero *et al.*, 1991; González Rodríguez y Maestrini, 1984; López Elías, 1990).

Otro tipo de problemas que hay que resolver para producir microalgas masivamente, es el de evitar variaciones en las condiciones del cultivo que puedan causar cambios cualitativos de la biomasa. Por este motivo, la necesidad de producir un alimento de calidad constante hace que el cultivo se vuelva tedioso, laborioso y técnicamente complejo (Biendenbach *et al.*, 1990). Con el objeto de resolver este problema, varios autores han intentado formular dietas artificiales capaces de satisfacer los requerimientos alimenticio de los organismos cultivados (Jones *et al.*, 1974; Jones *et al.* 1984; Kurmaly *et al.*, 1989). Aunque éstos pueden complementar relativamente bien el alimento vivo en muchos regímenes alimenticios, se ha encontrado que su reemplazamiento total afecta frecuentemente el crecimiento de los organismos (Laing *et al.*, 1990; Nell y O'Connor, 1991; Laing y Millican, 1992). Una estrategia alternativa que se ha utilizado, es la preservación del alimento vivo para su uso posterior (Biendenbach *et al.*, 1990). Sin embargo, un prerequisite es que la técnica de preservación no cause variaciones en el valor nutritivo, debido a pérdidas de constituyentes importantes como vitaminas y minerales (De Pauw, 1981) o de otros constituyentes (Cordero Esquivel *et al.*, 1992).

Entre los métodos de preservación, el de criopreservación es posiblemente el más interesante, ya que ofrece la posibilidad de almacenar el alimento por mucho tiempo, con un mínimo de esfuerzo, de tiempo y de dinero (Holm-Hansen, 1963).

Otro beneficio que se obtiene con esta técnica es que disminuye la posibilidad de variaciones en el valor dietético como consecuencia de la preservación y almacenamiento (Cordero Esquivel *et al.*, 1992). Además se ha demostrado para algunas especies que las células se pueden mantener viables por un período de tiempo de por lo menos algunos meses (Buitrago, 1992). Esto último reduce grandemente el tiempo, el equipo y el espacio para mantener el stock de microalgas, en contraste con los requeridos en el mantenimiento de stocks por transferencias; además se tiene una mayor garantía de su estabilidad genética (Holm-Hansen, 1973).

En años recientes, se ha dado mucha atención a las algas del género *Dunaliella*. Esta es una alga verde unicelular biflagelada, con una estructura celular típica de los miembros del orden de las Volvocales (Clase Chlorophyceae), que ha recibido atención debido a que una de sus principales características es que las células se encuentran rodeadas sólo por una membrana protoplasmática elástica y carecen de una pared celular verdadera (Oliveira *et al.*, 1980). Esta característica la hace idónea para ser utilizada como alimento, ya que le confiere una mayor digeribilidad y eleva la posibilidad de su eficiente asimilación por los organismos en cultivo (Spectorova *et al.*, 1982; Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Varios miembros de este género se utilizan en la industria para la producción de vitaminas (Spectorova *et al.*, 1982), como un recurso protéico (Fabregas *et al.*, 1986), para la producción de componentes químicos como glicerol y β caroteno (Ben-Amotz y Avron, 1973; Borowitzka, 1986), y en la acuicultura como alimento para *Artemia* y rotíferos (Mason, 1963). Otra característica interesante observada en algunas especies de este género es su tolerancia a altas salinidades. Para ajustar su presión osmótica en respuesta a cambios externos, *Dunaliella* cuenta con un mecanismo regulador a través del cual se produce glicerol, que auxilia a la microalga a mantener los iones intracelulares a niveles compatibles con sus funciones metabólicas en presencia de altas concentraciones salinas (McLachlan, 1960; Ben-Amotz y Avron, 1978; Hellebust, 1985).

Dada la necesidad de producir cultivos microalgales masivos a bajo costo y con un alto valor dietético, y debido a las características de *Dunaliella*, esta microalga pudiera ser cultivada masivamente porque además de proveer alimento adecuado para una diversidad de organismos del siguiente nivel trófico (Spectorova *et al.*, 1982), pudiera ser factible utilizarla como alimento preservado, utilizando como criopreservador el glicerol producido naturalmente, que facilitaría su almacenamiento.

I.1. Objetivos.

El objetivo general de este trabajo es cultivar en forma semimasiva una microalga del género *Dunaliella* y ensayar su criopreservación para que pueda ser empleada en acuicultura, o directamente como dieta o como inóculo para cultivos masivos terminales. Para lo anterior se plantearon los siguientes objetivos específicos.

1. Seleccionar entre las tres cepas a disposición en la colección del cepario del CICESE, la que se preste a ser cultivada en forma semicontinua, utilizando como criterios la aceptación de medios alternativos basados en fertilizantes agrícolas y la producción de biomasa en esos medios.
2. Hacer bioensayos de alimentación de *Artemia franciscana*, para comparar la eficiencia dietética de la microalga seleccionada, preservada y utilizada en fresco.
3. Probar dos formas de criopreservación y verificar la sobrevivencia de *Dunaliella*, para poderla utilizar como inóculo masivo.

II. MATERIALES Y METODOS.

II.1. Cepas

Se utilizaron las dos cepas de *Dunaliella* existentes en la colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. Una de ellas (DU-X-1), fue aislada de la Laguna Salada, ubicada en el Noreste de Baja California y la segunda (DU-X-2), en una laguna hiperalina de la costa pacífica del mismo Estado. Mayor información acerca de ambas cepas se puede obtener en Voltolina *et al.* (1991).

Por haber sido ambas aisladas en ambientes hiperalinos y debido a sus dimensiones y demás características morfológicas y cromáticas, la primera de ellas fue tentativamente asignada a la especie *D. salina* y la segunda a la especie *D. viridis*. Como comparación se empleó una tercera cepa que se obtuvo de la colección del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional en la Ciudad de México, con la identificación de *D. tertiolecta* Butcher. En una fase ya avanzada de la experimentación se notó que esta cepa tenía características morfológicas diferentes de las esperadas (presencia de pared celular y cuatro flagelos) y reproducción vegetativa al interior de la pared de la célula madre y con pérdida de flagelos, mientras que para *Dunaliella* la división es directa y sin pérdida de los flagelos (Borowitzka y Borowitzka, 1988). Por estas características se asignó esta cepa al género *Tetraselmis*, pero se decidió seguir experimentando con ella por lo menos hasta finalizar la fase de selección de cepas y de medios, dado que los resultados obtenidos hasta entonces la indicaban como una cepa de interés potencial para la acuicultura y especialmente para la criopreservación.

II.2. Evaluación de biomasa.

En todos los experimentos, ya sea de crecimiento en volumen limitado o en los ensayos en cultivos masivos, la biomasa se estimó por medio de la densidad óptica de los cultivos. Esta se midió diariamente como absorbancia con un espectrofotómetro HACH DREL 2000, a una longitud de onda de 550 nm para evitar los picos de absorción máxima de clorofila. Para cada cepa los datos se transformaron en número de células utilizando las ecuaciones de calibración que se indican en las figuras 1 a, b y c.

En estas figuras se reportan los datos relativos a tres de las seis calibraciones efectuadas, dado que en el transcurso del trabajo fue preciso cambiar la fuente de luz del espectrofotómetro. Durante esa operación se aprovechó para hacer también la limpieza de algunas de las superficies ópticas. Debido a esto todas las curvas de calibración para el experimento tuvieron que ser repetidas. Sin embargo cabe destacar que la reproducibilidad de los datos no fue afectada por esas operaciones y que las calibraciones presentadas son representativas.

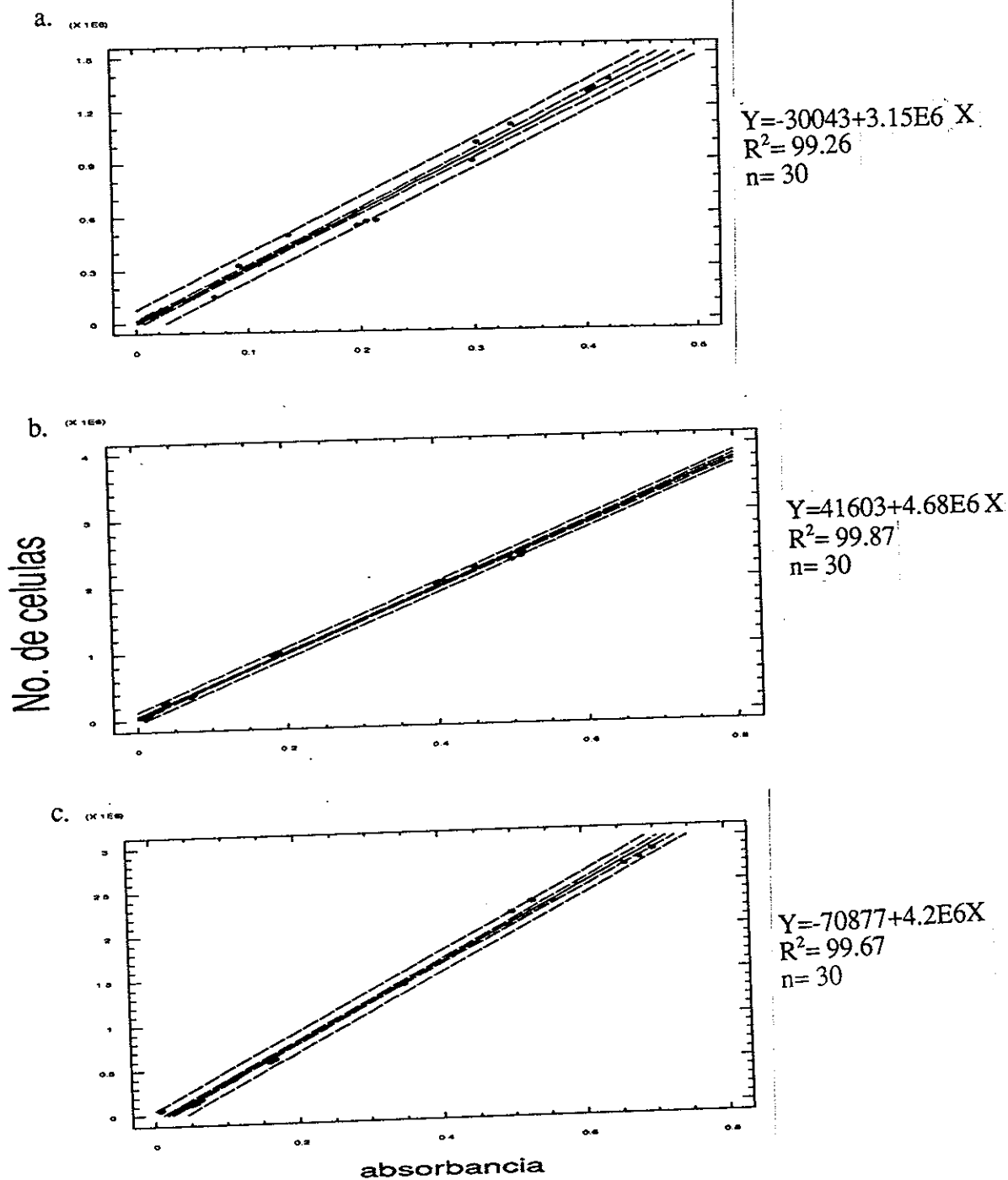


Figura 1. Rectas y ecuaciones de calibración absorbancia-número de células por ml, para las cepas *Tetraselmis* sp. (a), DU-X-1 (b) y DU-X-2 (c). La banda punteada interna representa el nivel de confianza de 95% y externa el 99%.

II.3. Selección de medios en cultivos terminales.

Para el logro del primero de los objetivos específicos se diseñaron tres medios alternativos basados en el uso de los siguientes fertilizantes agrícolas: Como fuentes de nitrógeno, se utilizaron nitrato de amonio, sulfato de amonio y urea. Como fuente de fósforo solamente se ensayó con fosfato diamónico; para todos los casos se cuidó que las concentraciones finales de nitrógeno y fósforo fueran iguales a las del medio "f" de Guillard y Ryther (1962), utilizado como control y por consiguiente todos los medios tuvieron la misma razón (átomo a átomo) de N:P que es de 24.4:1. En la tabla I se dan las concentraciones de los varios elementos presentes como enriquecimiento en un litro de agua.

Para seleccionar entre éstos el medio de cultivo más adecuado, se decidió primeramente comparar su efecto sobre la forma de crecimiento de las tres cepas. Con esta finalidad se prepararon cuatro grupos (uno para cada uno de los medios) de tres matraces Erlenmeyer de 200 ml; cada matraz, con 100 ml del medio a ensayarse, se inoculó con 1×10^6 células de la cepa que se estaba probando, después de su aclimatación al medio experimental en Erlenmeyer, durante algunas generaciones. El diseño se repitió por cada una de las tres cepas. El crecimiento se registró diariamente mediante mediciones de densidad óptica de cada matraz por un período de ocho días. Al final del experimento se calcularon las tasas de división diaria y las biomásas producidas con las fórmulas citadas en Fogg y Thake (1987). Los resultados obtenidos con cada medio se compararon utilizando primariamente la tasa de división diaria promedio durante un número igual de días de la fase de crecimiento exponencial; también se compararon las biomásas máximas producidas contrastando los valores medios de las biomásas de los tres últimos días de la fase estacionaria de crecimiento.

Tabla I. Medios de cultivo "f", nitrato de amonio-fosfato de diamónico (NAM), urea-fosfato de amonio (NUR) y sulfato de amonio-fosfato de amonio (SAM): Concentración de los enriquecimientos en un litro de agua.

CONSTITUYENTES:	MEDIOS			
	"f"	NAM	NUR	SAM
Nutrientes mayores				
NITROGENO				
Nitrato de sodio	1.76 mg.at	-----	-----	-----
Fosfato diamónico	-----	0.144 mg.at	0.144 mg.at	0.144 mg.at
Nitrato de amonio	-----	1.62 mg.at	-----	-----
Sulfato de amonio	-----	-----	-----	1.62 mg.at
Urea	-----	-----	1.62 mg.at	-----
FOSFORO				
Fosfato de sodio monobásico	0.072 mg.at	-----	-----	-----
Fosfato diamónico	-----	0.072 mg.at	0.072 mg.at	0.072 mg.at
Metales traza				
EDTA Férrico	23.0 µM	-----	-----	-----
Sulfato Cúprico [Cu]	0.076 "	-----	-----	-----
Sulfato de Zinc [Zn]	0.153 "	-----	-----	-----
Cloruro de Cobalto [Co]	0.085 "	-----	-----	-----
Cloruro Manganoso [Mn]	1.830 "	-----	-----	-----
Molibdato de Sodio [Mo]	0.052 "	-----	-----	-----
Vitaminas				
Biotina	1.00 mg	-----	-----	-----
Cianocobalamina	1.00 mg	-----	-----	-----
Tiamina	200.00 mg	-----	-----	-----

II.4. Selección de cepas y medios de cultivos semimasivos y semicontinuos.

Los cultivos se mantuvieron hasta su decaimiento o por un máximo de 20 días en cada caso, en garrafones (carboys) de 18 litros con 10 litros de cultivo, con un enriquecimiento constante de CO₂ suficiente para mantener el pH entre 7.0 y 7.5. Las demás condiciones de cultivo fueron: temperatura: 21°C; salinidad: 32‰; iluminación constante con una concentración de 149.2 uE m⁻²s⁻¹ (11,700 Lux), obtenida con cuatro focos fluorescentes blanco-frío de 40 W cada uno por cada grupo de tres carboys, y agitación por aireación. Para la obtención del segundo objetivo las tres cepas se cultivaron con la técnica semicontinua en cada uno de los medios alternativos y los resultados se contrastaron con los obtenidos con el medio control, comparando las biomásas máximas obtenidas en cada uno. También se hicieron algunas pruebas para seleccionar la tasa de dilución más adecuada, las diluciones que se utilizaron fueron del 60 % y 30 %.

Se estimó que no era necesario volver a comparar la tasa de división celular durante la fase de crecimiento exponencial, ya que la posibilidad de una limitación del crecimiento debida a la formulación del medio ya se había descartado con el experimento anterior.

Los datos que se contrastaron fueron:

- a) Biomasa en número de células producidas diariamente. Este parámetro se utilizó para seleccionar el medio más adecuado para cada cepa.
- b) Biomasa máxima (en gramos) producida diariamente por unidad productiva con el medio que dió los mejores resultados para cada cepa. Este indicador se utilizó para seleccionar la cepa que se quería cultivar para alcanzar los demás objetivos planteados.

II.5. Valor dietético de la biomasa.

II.5.1. Composición proximal.

El primer punto que se tomó en consideración para la evaluación de las microalgas para fines dietéticos fue el análisis de las diferentes fracciones de su biomasa. Con esta finalidad se cosecharon 300 muestras de cada una de las cepas mantenidas en las condiciones de cultivo masivo y semicontinuo seleccionado, concentrándolas en filtros de fibra de vidrio GF-C (porosidad nominal de 1.1-1.2 μm). En el caso de la determinación de peso seco total y orgánico se usaron filtros de 4.7 cm de diámetro y se filtró un volumen de cultivo de 100 ml, o menor a esto, si la velocidad de filtración indicaba que la biomasa cosechada era suficiente para los fines de este análisis. Para las demás fracciones (proteínas, lípidos y carbohidratos) se utilizaron filtros del mismo tipo y de diámetro de 2.5 cm, filtrando un volumen de 10 ml de cultivo. Las técnicas de evaluación de las diferentes fracciones de biomasa fueron las siguientes:

Peso seco total y orgánico: se utilizaron las técnicas descritas por Sorokin (1973): los filtros precalcificados y pre-pesados y con la biomasa de microalgas indicada anteriormente se introdujeron en una estufa a 60°C en la cual se mantuvieron durante un período de 6 horas; después de esto se introdujeron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesaron en una balanza analítica con precisión de lectura de ± 0.1 mg; finalmente los filtros se introdujeron en una mufla a 450°C por un período de 4 horas, se repitió la operación de estabilización de temperatura y se determinó la diferencia entre el primer peso (peso seco total) y el segundo (peso de las sales inorgánicas), lo cual permitió evaluar por diferencia el porcentaje de la sustancia orgánica de la biomasa.

Carbohidratos: Para la extracción se empleó la técnica descrita por Whyte (1987) y para la cuantificación la técnica descrita por Dubois *et al.* (1956) con las modificaciones de Malara y Charra (1972a) y Farber Lorda (1986).

Lípidos: La técnica de extracción empleada fue la descrita por Bligh y Dyer (1959) modificada por Chiaverini (1972) y para la determinación se utilizó el método colorimétrico de Pande *et al.* (1963) y Farber Lorda (1986).

Proteínas: Para la determinación de esta fracción fue necesario primariamente ensayar las mejores condiciones de pretratamiento y extracción. Para la determinación se emplearon las modificaciones de Malara y Charra (1972b) y Farber Lorda (1986) del método de Lowry *et al.* (1951) en el caso de *Tetraselmis*; para *Dunaliella* se utilizó el mismo método, pero con la modificación de Dorsey *et al.* (1977) propuesta en Claus *et al.* (1979). Este método fue el que dió los mejores resultados y se describe a continuación.

II.5.1.1. Modificación al método de Lowry.

1.- Reactivos modificados

Para la extracción de proteínas se utilizó hidróxido de sodio 0.25N.

Para la determinación de proteínas se utilizó tartrato de sodio y potasio al 1% (solución B₂) agregando la concentración propuesta por Dorsey *et al.* (1977).

2.- Procedimiento:

a).- Extracción:

Las muestras se homogenizaron primeramente con la ayuda de una varilla de vidrio y después con un homogenizador Potter-Elvehjem. La cantidad de mililitros necesarios de hidróxido de sodio para hacer la homogenización fue determinada dependiendo del peso seco de las muestras.

La extracción fue doble, utilizando primeramente la mitad de los mililitros de hidróxido de sodio y colocando las muestras durante 30 minutos en un baño maría a una temperatura de 100°C, se centrifugó a 4000 r.p.m. por un término de 15 minutos y se colectó el sobrenadante. Para la segunda extracción se utilizó el mismo procedimiento. Del extracto total obtenido con cada muestra se tomó 1 ml para la determinación.

b).- Determinación:

Se agregaron 5 ml de la solución C a cada mililitro de esta muestra. La solución C se prepara con las soluciones de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N (Solución A), sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% (solución B₁) y tartrato de sodio y potasio al 1% (solución B₂). Las proporciones estándares utilizadas en Lowry *et al.* (1951) son de 100:1:1. La modificación utilizada para *Dunaliella* consiste en el cambio de las proporciones, que son 100:1:2. Después de agregar la solución C, se dejó reposar por el término de 10 minutos y por último se agregó la solución D, compuesta por el reactivo de Folin-Ciocalteu y agua destilada en proporción 1:1; se esperó 1:30 horas para leer cada una de las muestras en el espectrofotómetro

a una longitud de onda de 750 nm. Las lecturas se corrigieron con un blanco de reactivos y se calcularon las concentraciones de proteína utilizando los resultados de la calibración realizada con las mismas mezclas de reactivos y con concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino.

II.5.2. Bioensayo de eficiencia dietética de *Dunaliella*.

El ensayo de eficiencia dietética, se hizo con *Artemia franciscana* Kellogg (1906). Se utilizaron quistes de San Francisco Bay Brand Inc., Lote No. 3475, que se descapsularon según la técnica descrita por San Francisco Bay Brand Inc. (1988), modificada por Correa Sandoval y Bückle Ramírez (1993), y se incubaron en agua de mar a 25 °C durante 36 horas. Los nauplios se colectaron durante las 4 horas siguientes a la primera eclosión, para asegurarse de que fueran organismos de una misma cohorte, y se distribuyeron en seis cajas de acrílico de 12.5 X 12.5 X 20.0 cm, con una capacidad de aproximadamente tres litros y con un volumen útil de dos litros. La densidad de nauplios en cada caja fue de 1 organismo/2 ml (1000 nauplios por caja).

Los nauplios de tres de las cajas se alimentaron con *Dunaliella* DU-X-2 congelada y los de las otras tres con la misma cepa suministrada en forma fresca. Las raciones diarias se establecieron, con la finalidad de que al momento de agregar nuevo alimento que se proporcionaba con frecuencia diaria, hubiera todavía en el acuario el 30 % aproximadamente, de las microalgas del día anterior, en base a los resultados de un ensayo preliminar y variaron según la edad de los organismos (Tabla II). Las condiciones de cultivo fueron: temperatura $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, salinidad 32 ‰, y aireación constante; todos los días se eliminaron con un sifón las heces y otros precipitados y se hicieron cambios totales de agua cada segundo día.

A partir del día inicial y cada cuatro días sucesivos se midió el tamaño de diez organismos de cada caja, fijados con la solución descrita por Correa Sandoval y Bückle Ramírez (1993). El ensayo terminó cuando se observaron las primeras parejas en las tres cajas con el mismo

alimento. A este punto se contaron los organismos para evaluar la sobrevivencia y se determinó la longitud total de 30 organismos de cada caja. Los restantes se preservaron en congelación, para la posterior determinación de su composición proximal.

Tabla II. Raciones de la microalga *Dunaliella* cepa DU-X-2 administradas a *Artemia franciscana* según su edad.

Edad (días)	Estadio	Ración diaria (10 ³ Cels por organismo)
1	Nauplius	270
2,3,4	Nauplius-Metanauplius	540
5,6	Metanauplius	671
7	Metanauplius-Juveniles	1080
8	Juveniles	1154
9	Juveniles-Adultos	1691
10,11	Adultos	1745

II.6. Preservación de biomasa.

II.6.1. Cosecha y criopreservación.

Primeramente, para llevar a cabo los ensayos de criopreservación fue necesario encontrar una técnica de cosecha adecuada para los fines a los cuales se iban a destinar la microalgas preservadas. Se consideró inadecuada la floculación con floculantes químicos, dado que ésto hubiera impedido la utilización de la biomasa para fines alimenticios. Por lo que se refiere a sedimentación, dado que se trata de organismos flagelados se descartó la posibilidad de emplear un espesador gravimétrico de placas inclinadas (The Great Lakes Environmental, 1989) y se decidió ensayar solamente y en pequeña escala la técnica de choque térmico manteniendo una suspensión de cultivo a 4°C, con la finalidad de ver si esta temperatura causaba una disminución de la actividad de los flagelos, facilitando de esta forma la acumulación de la biomasa al fondo del recipiente. Esta prueba resultó negativa y se decidió probar la separación por centrifugación a 1000 y 1800 r.p.m. Después de la separación se evaluó la sobrevivencia de cada una de las cepas a los diferentes regímenes de gravedad, antes de proceder con las pruebas de criopreservación. Para ésto se utilizó la técnica de congelamiento lento, colocando muestras de 1 ml de concentrado en un congelador a -60°C, preservándolas a esta temperatura y comprobando su sobrevivencia después de siete, quince y treinta días.

II.6.2. Sobrevivencia y viabilidad.

La sobrevivencia a la criopreservación de cada una de las cepas se midió descongelando a temperatura ambiente una de las muestras después de tres tiempos de almacenamiento a -60°C. Esta se resuspendió en el medio en el cual había sido inicialmente cultivada y se inoculó por triplicado en una serie de tubos de ensayo con una densidad de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 células por tubo.

El porcentaje de sobrevivencia se evaluó en base a la presencia o ausencia de crecimiento en las diferentes diluciones, sin considerar el tiempo necesario para que ésto se hiciera visible,

mientras que el retardo en el crecimiento se utilizó como un estimador cualitativo del estado fisiológico de las células medido como capacidad de reproducirse, que de aquí en adelante definimos como viabilidad.

II.6.3. Choque osmótico.

Para las cepas de *Dunaliella*, cuya rápida producción de glicerol es bien conocida cuando se encuentra en estado de estrés osmótico, se ensayó la posible función de este metabolito como criopreservador, resuspendiendo la biomasa cosechada en una solución de cloruro de sodio equivalente a una salinidad de 90 ‰ durante 4 horas, que fue el tiempo necesario para que las células volvieran a reestablecer su movimiento, cosechando nuevamente la biomasa y procediendo normalmente con el proceso de criopreservación y con las pruebas de sobrevivencia. Esta técnica no se probó con *Tetraselmis* sp., ya que este organismo carece de este mecanismo osmoregulador.

III RESULTADOS

III.1. Medios alternativos.

III.1.1. Selección de medios alternativos para la cepa de *Dunaliella* DU-X-1.

Las curvas de crecimiento se ilustran en la figura 2. Estos datos resultaron normales y homoscedásticos, por lo cual se contrastaron con una prueba de análisis de varianza de una vía. De ésta resultó que no hay diferencias debidas al medio de cultivo por lo que se refiere a la tasa de crecimiento (Tabla IIIa), pero que la biomasa máxima se obtiene con el medio basado en nitrato de amonio (Tablas IIIb y IV).

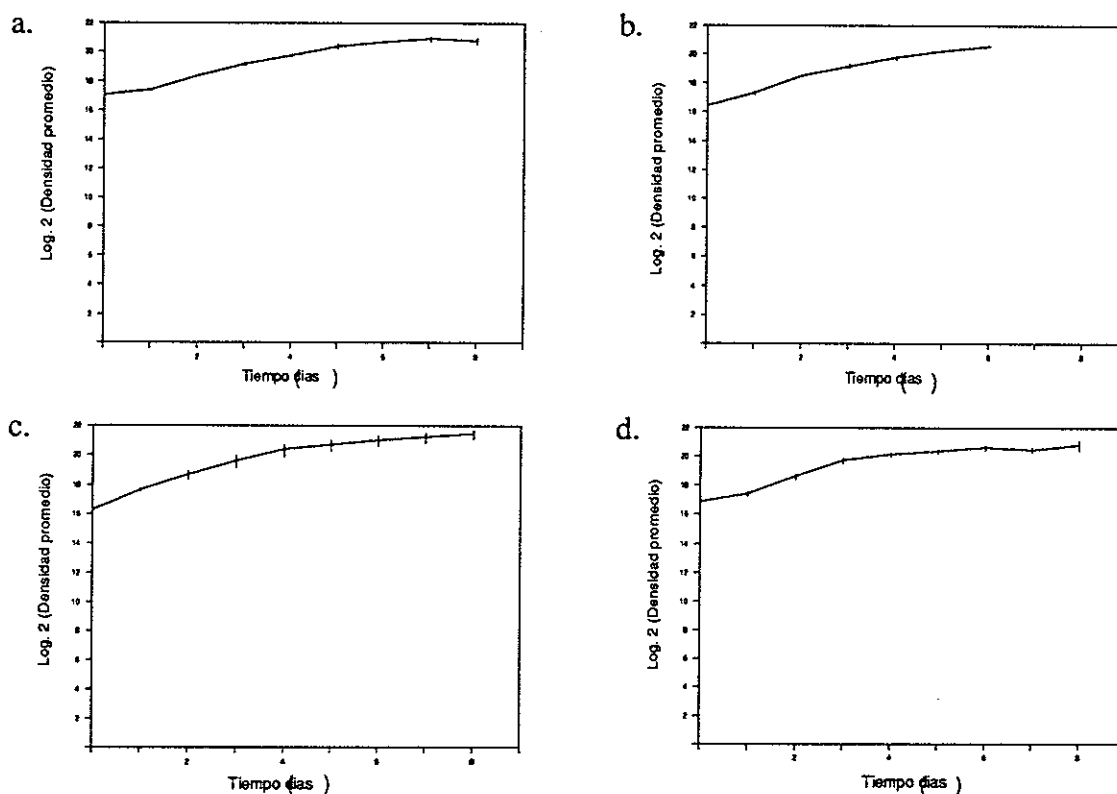


Figura 2. Curvas de crecimiento para la cepa de *Dunaliella* DU-X-1 cultivada con diferentes medios a).- Medio "f", b).- Medio urea-fosfato diamónico, c).- Medio nitrato de amonio-fosfato diamónico y d).- Medio sulfato de amonio-fosfato diamónico.

Tabla III. Análisis de varianza de los resultados de cultivo en Erlenmeyer de la cepa de *Dunaliella* DU-X-1 en los tres medios de cultivo experimentales y en el control (A): para la tasa de crecimiento en fase exponencial y (B): para la biomasa de los tres últimos días de la fase estacionaria.

A

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	.513	3	.171	2.339	.088
DENTRO DE GRUPOS	2.850	39	.073		
TOTAL	3.363	42			

B

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	6.554×10^{12}	3	2.185×10^{12}	7.838	<.001
DENTRO DE GRUPOS	8.920×10^{12}	32	2.787×10^{11}		
TOTAL	1.547×10^{13}	35			

Tabla IV. Valores promedio y desviaciones estandar de la tasa de crecimiento en fase exponencial y de la biomasa producida durante los últimos tres días de la fase estacionaria de la cepa de *Dunaliella* DU-X-1 cultivada con diferentes medios. También se indican los resultados de la prueba de análisis de intervalos múltiples ($\alpha = 0.05$) para la cantidad de biomasa producida.

MEDIO	PROMEDIO DE μ EXP. (Div. dfa ⁻¹)	D. E.	BIOM. MAX. Cels.10 ⁶ .ml ⁻¹	D. E.
NH ₄ NO ₃	1.03	±.26	2.56	±.75 *
"f"	.89	±.14	1.84	±.29 *
(NH ₄) ₂ SO ₄	.95	±.32	1.66	±.39 *
NH ₂ CONH ₂	.84	±.28	1.42	±.56 *

III.1.2. Selección de medios alternativos para la cepa de *Dunaliella* DU-X-2

Para esta cepa las curvas de crecimiento se ilustran en la figura 3. Los datos de la tasa de crecimiento en fase exponencial resultaron normales y homoscedásticos, mientras que los datos de biomasa máxima producida en los tres últimos días de la fase estacionaria resultaron ser no normales, Consecuentemente las tasas de crecimiento se contrastaron con una prueba de análisis de varianza de una vía mientras que los de biomasa máxima se constrastaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Tablas Va y b respectivamente).

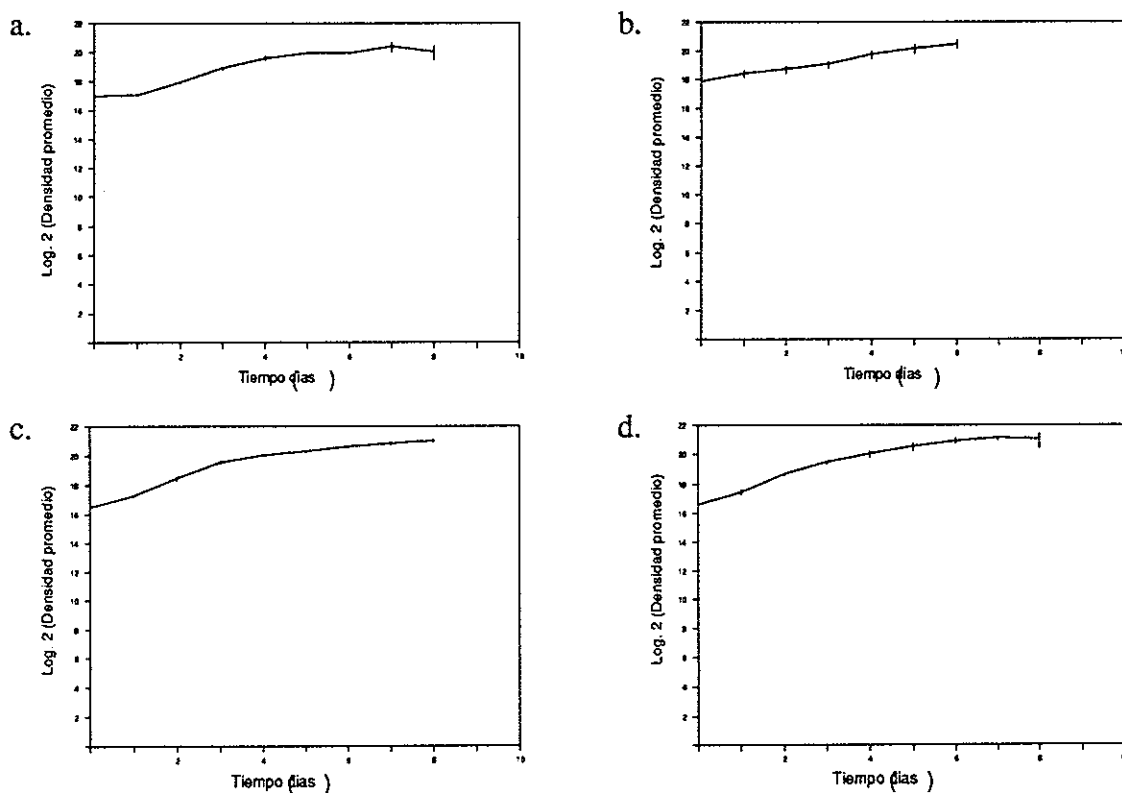


Figura 3. Curvas de crecimiento para la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 cultivada con diferentes medios a).- Medio "f", b).- Medio urea-fosfato diamónico, c).- Medio nitrato de amonio-fosfato diamónico y d).- Medio sulfato de amonio-fosfato diamónico.

No se encontraron diferencias debidas al medio de cultivo por lo que se refiere a la tasa de crecimiento, pero la biomasa máxima se obtuvo con los medios basados en fertilizantes, que resultaron todos superiores al medio control (Tabla VI) e iguales entre sí.

Tabla V. Análisis de varianza de los resultados de los cultivos en Erlenmeyer de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 en los tres medios de cultivo experimentales y en el control (A); para la tasa de crecimiento en fase exponencial y (B): prueba de Kruskal Wallis para la biomasa de los tres últimos días de la fase estacionaria.

A					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	.247	3	.082	1.415	.253
DENTRO DE GRUPOS	2.273	39	.058		
TOTAL	2.521	42			
B					
MEDIO	n		INTERVALO PROMEDIO		PROMEDIO (Cels. $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$)
(NH ₄) ₂ SO ₄	9		25.389		2.17
NH ₂ CONH ₂	9		23.500		2.06
NH ₄ NO ₃	9		20.111		1.90
"f"	9		5.000		.94

$\chi^2 = 20.879$ Nivel de significancia = <.001

Tabla VI. Valores promedio y desviaciones estandar de la tasa de crecimiento en fase exponencial y de la biomasa producida durante los últimos tres días de la fase estacionaria de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 cultivada con diferentes medios. También se indican los resultados de la prueba de análisis de intervalos múltiples ($\alpha = 0.05$) para la cantidad de biomasa producida.

MEDIO	PROMEDIO DE μ_{EXP} . (Div. día ⁻¹)	D. E.	BIOM. MAX. Cels.10 ⁶ .ml ⁻¹	D. E.
(NH ₄) ₂ SO ₄	.94	±.25	2.17	± .51 *
NH ₂ CONH ₂	1.00	±.29	2.06	± .53 *
NH ₄ NO ₃	1.02	±.18	1.90	± .25 *
"f"	.92	±.31	.94	± .13 *

III.1.3. Selección de medios alternativos para *Tetraselmis* sp.

Las curvas de crecimiento se ilustran en la figura 4; los valores de la tasa de crecimiento en el período exponencial y de la biomasa máxima resultaron normales y homoscedásticos y se constrastaron con una prueba de análisis de varianza de una vía (Tablas VIIa y b respectivamente). De ésta resultó que no hay diferencias debidas al medio de cultivo por lo que se refiere a la tasa de crecimiento y que hay alguna diferencia en la biomasa producida (Tabla VIII), aunque la prueba de intervalos múltiples no la detecta.

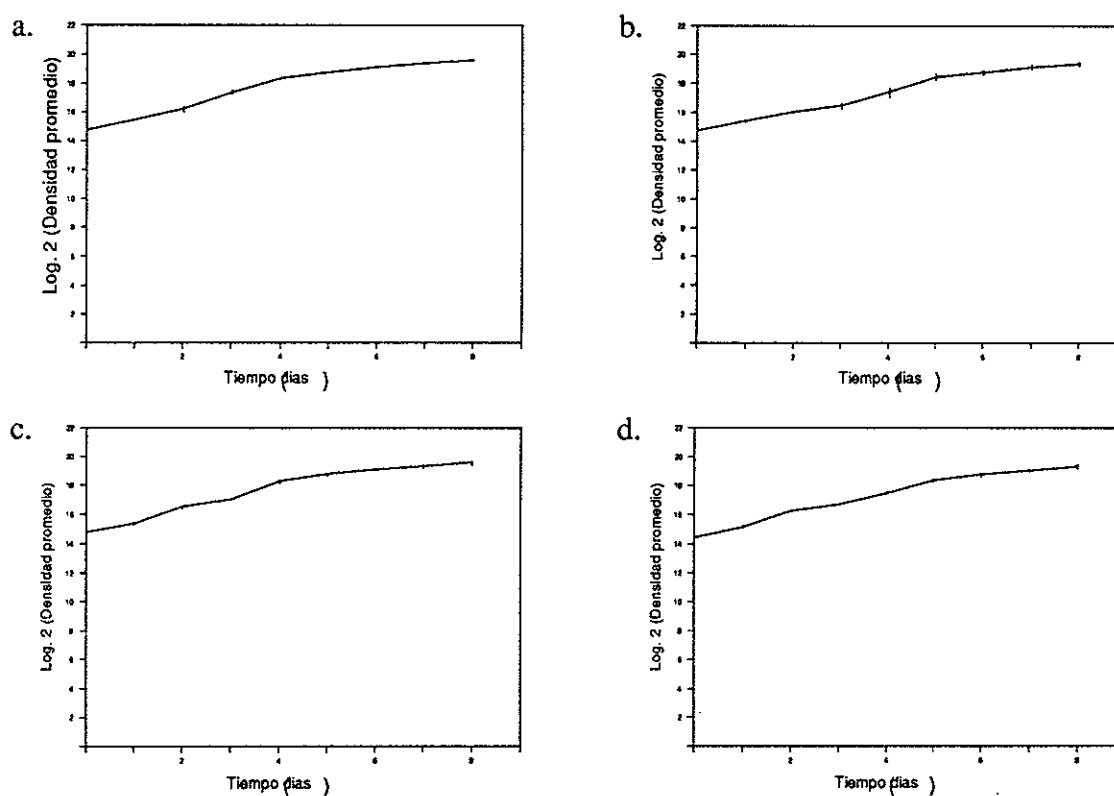


Figura 4. Curvas de crecimiento para *Tetraselmis* sp. cultivada con diferentes medios a).- Medio "f", b).- Medio urea-fosfato diamónico, c).- Medio nitrato de amonio-fosfato diamónico y d).- Medio sulfato de amonio-fosfato diamónico.

Tabla VII. Análisis de varianza de los resultados de los cultivos en Erlenmeyer de *Tetraselmis* sp. en los tres medios de cultivo experimentales y en el control (A): para la tasa de crecimiento en fase exponencial y (B): para la biomasa de los tres últimos días de la fase estacionaria.

A					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	.073	3	.024	.382	.767
DENTRO DE GRUPOS	1.650	26	.063		
TOTAL	1.723	29			
B					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	1.226×10^{11}	3	4.088×10^{10}	3.299	.033
DENTRO DE GRUPOS	3.965×10^{11}	32	1.239×10^{10}		
TOTAL	5.192×10^{11}	35			

Tabla VIII. Valores promedio y desviaciones estandar de la tasa de crecimiento en fase exponencial y de la biomasa producida durante los últimos tres días de la fase estacionaria de *Tetraselmis* sp. cultivada con diferentes medios. También se indican los resultados de la prueba de análisis de intervalos múltiples ($\alpha = 0.05$) para la cantidad de biomasa producida.

MEDIO	PROMEDIO DE μ EXP. (Div. día ⁻¹)	D. E.	BIOM. MAX. Cels.10 ⁶ .ml ⁻¹	D. E.
"I"	1.06	±.17	.69	±.11 *
NH ₄ NO ₃	.87	±.36	.67	±.11 *
NH ₂ CONH ₂	1.01	±.08	.57	±.12 *
(NH ₄) ₂ SO ₄	.93	±.27	.56	±.11 *

III.2. Experimentos de cultivos semimasivos semicontinuos.

III.2.1. Crecimiento y dilución óptima para la cepa de *Dunaliella* DU-X-1

En los primeros ensayos de cultivo de esta cepa, se empleó medio "f" y una tasa de dilución del 60%, notándose que la biomasa regresa a su valor inicial después de varios días, mientras que al bajar la tasa de dilución al 30% se obtuvo la recuperación del valor inicial en 24 horas (Fig. 5a). Este ensayo demuestra, como los llevados a cabo en Erlenmeyer (Tabla IV), que solamente en los primeros días de la fase exponencial la tasa de división celular

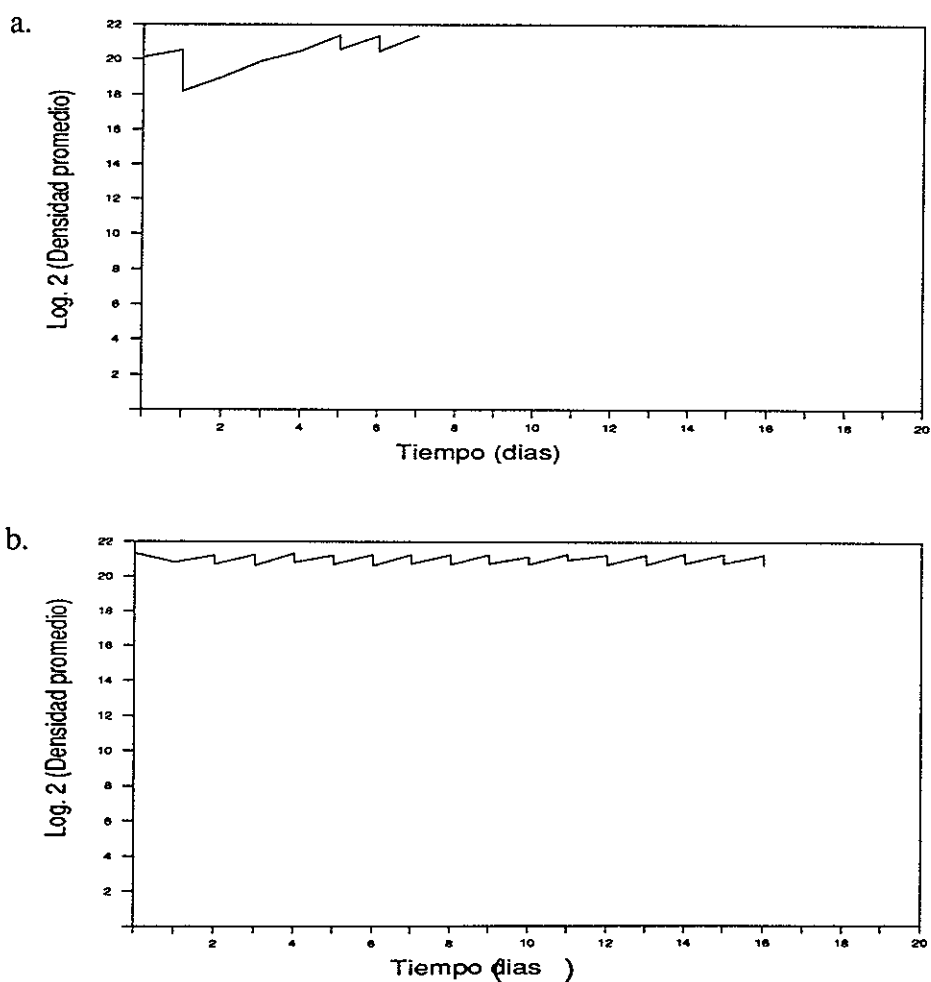


Figura 5. Cultivos semicontinuos en medio "f" de la cepa de *Dunaliella* DU-X-1 con diluciones del 60% (a) y 30% (b).

a una división por día, con la cual sería posible en teoría una cosecha máxima equivalente al 50% de la biomasa pero que, cuando aumenta la concentración celular, sólo entre el 25 y el 50% de las células se divide cada día.

En un segundo ensayo se probó inicialmente el medio basado en sulfato de amonio-fosfato diamónico, y se notó que con éste las células se adhieren a las paredes y al fondo del recipiente, causando en breve tiempo el decaimiento del cultivo. Con el medio "f", el cultivo se mantuvo estable (Fig. 5b) con una concentración de $2.6 \times 10^6 \pm 0.1 \text{ cel. ml}^{-1}$ durante un período de por lo menos 20 días. Después de esto se dió por terminado el experimento, aunque el cultivo no presentaba síntomas de decaimiento. Ninguno de los otros medios dió resultados comparables. En promedio, la duración del cultivo con el medio basado en urea no pasó de los diez días, durante los cuales el crecimiento después de la cosecha no fue suficiente para reemplazar la biomasa retirada, que resultó en el mejor de los casos de $0.58 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$. En el caso del medio con nitrato de amonio se obtuvieron resultados análogos. A este punto, pensando que la alta concentración de sales de amonio hubiera podido ser el motivo de la inestabilidad y corta duración de los cultivos, se hizo un ensayo disminuyendo la cantidad de nitrógeno amoniacal a la mitad de la prevista inicialmente con este medio; el cultivo se mantuvo estable durante un período equivalente al que se obtuvo con el medio control, pero la cosecha fue notablemente inferior debido a las bajas concentraciones celulares alcanzadas con este medio (Tabla IX).

Los análisis estadísticos realizados para la cepa DU-X-1, indican que hay diferencias significativas entre la biomasa máxima producida con el medio "f" y con los medios alternativos utilizados en el cultivo masivo (Tabla X).

Tabla IX. Biomazas máximas producidas con los diferentes medios, en los cultivos semimasivos semicontinuos de la cepa de *Dunaliella* DU-X-1

MEDIO	BIOM. MAX. PROD. DIAR. (Cel.10 ⁶ .ml ⁻¹ .)	D. E.	PROD. POR CARBOY (g/día/carboy)	DIAS DE CULTIVO ESTABLE
"f"	.80	±.05	.21	20
NH ₂ CONH ₂	(.58)	(±.12)	----	----
NH ₄ NO ₃	.52	±.05	.16	5
NH ₄ NO ₃ /2	.44	±.11	.10	20

Tabla X. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de intervalos múltiples ($\alpha = 0.05$) para la comparación de las biomazas máximas producidas por cada medio en cultivo masivo para la cepa de *Dunaliella* DU-X-1.

MEDIO	n	INTERVALO PROMEDIO	PROMEDIO (Cel.10 ⁶ ml. ⁻¹)
"f"	21	35.952	.80 *
NH ₄ NO ₃	3	19.000	.58 *
NH ₂ CONH ₂	4	16.875	.52 *
NH ₄ NO ₃ /2	18	11.194	.44 *

$\chi^2 = 34.529$ Nivel de significancia = <0.001

III.2.2. Crecimiento y dilución óptima para la cepa de *Dunaliella* DU-X-2

Para el cultivo semimasivo de esta cepa tampoco se usó el medio de sulfato de amonio, debido a las mismas razones mencionadas para la cepa DU-X-1.

El primer ensayo se hizo con medio "f" y se inició con una dilución del 60%; con esto se demostró que esta cepa, como la anterior, tarda un tiempo largo antes de regresar a concentraciones cercanas a las iniciales; esto era de esperarse ya que esta dilución corresponde a más que una división por día, con lo cual sería posible en teoría, al igual que para DU-X-1, una cosecha máxima equivalente al 50% de la biomasa. Durante este ensayo, también se observó que esta cepa es muy sensible a los cambios de pH. En la figura 6a, aparte de apreciar que el cultivo tarda en recuperarse después de una primera dilución, también se observa un comportamiento errático de los cultivos. Esto está relacionado con la amplia variabilidad de los valores de pH, el cual no se pudo controlar debido a un desperfecto en el sistema de suministro de CO₂. El intervalo de variación del pH fue 6.0 - 9.5. El índice de correlación calculado ($r = -0.76$; $P < 0.005$) entre los valores de pH y de concentración celular indican que altos valores del primero coinciden con bajas concentraciones celulares y viceversa.

En el segundo experimento, llevado a cabo con el mismo medio y con tasa de dilución del 30%, el cultivo se mantuvo estable durante un período de 20 días (Fig. 6b). En el caso de los medios alternativos, el basado en el uso de urea permitió en el mejor de los casos solamente tres días de cosecha. En un segundo intento con la misma tasa de dilución el cultivo fue decayendo, causando la terminación del ensayo después de cinco días (Tabla XI). Igualmente, en el caso del medio de nitrato de amonio, el cultivo fue decayendo al inicio paulatinamente y en forma definitiva después de pocos días de cosecha.

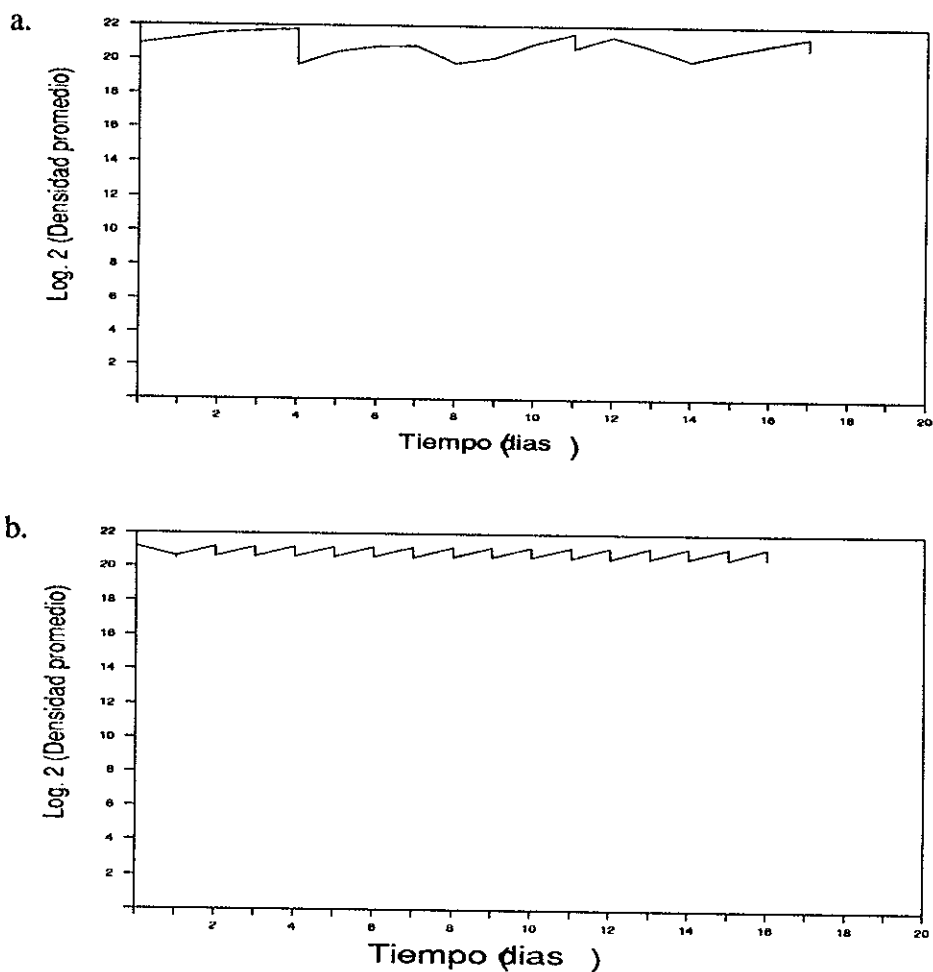


Figura 6. Cultivos semicontinuos en medio "f" de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 con diluciones del 60% (a) y 30% (b).

Este último medio, pero con concentración de nitrógeno reducida a la mitad, mantuvo el cultivo estable durante 20 días, pero la concentración celular y la cosecha fueron inferiores a los obtenidos en el medio control (Tabla XI).

Al igual que con la cepa DU-X-1 se encontró que existían diferencias significativas entre el medio "f" y los medios alternativos utilizados en los cultivos masivos en términos de producción diaria de biomasa (Tabla XII).

Tabla XI. Biomosas máximas producidas con los diferentes medios, en los cultivos semimasivos semicontinuos de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2.

MEDIO	BIOM. MAX. PROD. DIAR. (Cel.10 ⁶ .ml ⁻¹)	D.E	PROD. POR CARBOY (g/día/carboy)	DIAS DE CULTIVO ESTABLE
"f"	.82	±.03	.19	20
NH ₂ CONH ₂	.54	±.27	----	----
NH ₄ NO ₃	.51	±.08	.16	5
NH ₄ NO ₃ /2	.52	±.08	.12	20

Tabla XII. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de intervalos múltiples para la comparación de las biomosas máximas producidas por cada medio en cultivo masivo para la cepa de *Dunaliella* DU-X-2.

MEDIO	n	INTERVALO PROMEDIO	PROMEDIO (Cel.10 ⁶ .ml ⁻¹)
"f"	18	34.444	.82 *
NH ₂ CONH ₂	5	14.000	.54 *
NH ₄ NO ₃ /2	17	12.824	.52 *
NH ₄ NO ₃	3	12.667	.51 *

$\chi^2 = 30.463$ Nivel de significancia = <0.001

III.2.3. Crecimiento y dilución óptima para *Tetraselmis* sp.

Después de identificar la tercera especie como *Tetraselmis* sp. se decidió no probar cultivos masivos con medios simplificados. Esto se debe a que un examen morfológico más detenido y un seguimiento del historial de esta cepa nos permitieron identificarla como la cepa TE-X-1 del cepario del CICESE, que había evidentemente contaminado la cepa de *D. tertiolecta* obtenida del CINVESTAV. La cepa en cuestión ya había sido estudiada por López Elías (1990), quien llegó a la conclusión de que aunque la composición proximal no varía cambiando el medio de cultivo, la producción máxima de esta especie en un medio simplificado basado en compuestos reducidos de nitrógeno similar al basado en urea y fosfato diamónico empleado en este trabajo es significativamente inferior a la que se obtiene con el medio "f". Los datos obtenidos por el autor antes mencionado con cultivos semicontinuos con tasa de dilución del 30%, se resumen en la tabla XIII.

Tabla XIII. Biomosas (promedio y desviación estandar) por unidad productiva de cultivo de *Tetraselmis* sp. en medio "f" y en medio alternativo (**= $\alpha \leq 0.01$) (Tomada de López Elias, 1990).

Biomasa cosechada en 3 litros	Medio "f"	Medio alternativo
Peso seco total (g)	0.46** (0.02)	0.36 (0.02)
Peso seco organico (g)	0.38** (0.002)	0.30 (0.02)
Proteinas (%)	47.1 (7.10)	40.0 (3.70)
Carbohidratos (%)	9.6 (1.33)	13.6 (1.90)
Lípidos (%)	11.8 (4.75)	10.3 (0.70)
Cenizas (%)	17.1 (3.07)	16.2 (2.19)

III.2.4. Composición proximal.

Los resultados de los análisis proximales de la biomasa cosechada en fresco se reportan en la tabla XIV. De esta tabla se deduce que el porcentaje de sustancia orgánica de la biomasa de las dos cepas de *Dunaliella* es de entre un 15 a un 20 % superior al que se obtiene con *Tetraselmis*. Esto se debe probablemente a la cantidad de agua retenida al interior de la pared celular, que no es eliminada por el lavado con formato de amonio. Es notable, en el caso de las dos cepas de *Dunaliella*, la diferencia en el contenido protéico celular entre los dos medios ("F" y NH_4NO_3): en ambos casos el empleo de un medio basado parcialmente en sales de amonio resultó en un porcentaje de proteínas notablemente superior, que pudiera ser el resultado de una más rápida absorción de estas sales, aunque hay que considerar también la posibilidad de que la baja concentración celular, al permitir una mejor penetración de la luz, pudiera haber favorecido la síntesis protéica. Según López Elías (1990) y López Elías y Voltolina (1992) éste no es el caso para *Tetraselmis*, para la cual estos autores no encontraron diferencias significativas en la calidad de la biomasa debidas al uso de medios diferentes. Aún tomando en consideración que la fracción no explicada del contenido orgánico total es superior, la composición proximal de esta cepa, no difiere sustancialmente de la reportada en la literatura (Tabla XIII).

Tabla XIV. Resultados de los análisis proximales (promedio y desviación estandar) de las cepas de *Dunaliella* DU-X-1 y DU-X-2, cultivadas en medio de nitrato de amonio-fosfato diamónico (NH_4NO_3)/2 y medio "f", y de *Tetraselmis* sp cultivada solo en medio "f".

Medio	CEPA DU-X-1		CEPA DU-X-2		<i>Tetraselmis</i> sp.
	"f"	$\text{NH}_4\text{NO}_3/2$	"f"	$\text{NH}_4\text{NO}_3/2$	"f"
Cenizas (%)	4.0(1.3)	9.5(4.0)	4.0(1.0)	10.3(3.4)	20.0 (7.3)
Sustancia orgánica (%)	96.0(4.0)	90.5(4.0)	96.0(5.0)	89.0(3.4)	80.0 (9.2)
Proteínas (%)	34.7(2.8)	41.2(4.5)	32.5(4.0)	41.3(4.1)	37.3 (1.9)
Carbohidratos (%)	19.6(2.3)	18.8(2.3)	17.9(3.4)	12.9(2.1)	13.5 (0.4)
Lípidos (%)	25.7(6.9)	21.2(2.9)	24.6(3.2)	23.8(6.0)	26.7 (0.1)
Total de Sustancia orgánica explicada (%)	80	81.2	75	78	77.5

III.2.5. Selección de la cepa.

Al considerar los diferentes criterios que se pueden utilizar para la selección de una cepa, no se notaron diferencias importantes en la producción de biomasa o en la composición proximal entre las dos cepas de *Dunaliella*. En cuanto a *Tetraselmis*, la producción diaria de sustancia orgánica posible con esta cepa, es ponderadamente superior a la que se puede obtener con *Dunaliella* (0.2 g por unidad productiva de 10 l por día, para *Dunaliella*, en comparación con los 0.3 - 0.4 g reportados por López Elías (1990) para *Tetraselmis*). Cualitativamente la biomasa no es muy diferente, con la única excepción de los carbohidratos que son aparentemente inferiores en el caso de *Tetraselmis*.

Se hizo un ensayo preliminar de alimentación de *Artemia* utilizando como dietas cultivos en medio "f" de *Tetraselmis* sp., de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 y de *Chaetoceros* sp., cuya efectividad como alimento para *A. franciscana* ha sido estudiada en varias ocasiones en el laboratorio de Acuicultura del CICESE (Olivares González; Correa Sandoval; Sánchez Saavedra y Correa com. pers.). No se notaron diferencias importantes entre el control y los organismos alimentados con DU-X-2 mientras que, posiblemente debido a su mayor tamaño (16x8µm, comparado con 8x5µm de DU-X-2 y 6x4 µm (sin setas) de *Chaetoceros* sp.) o a la presencia de una fuerte pared celular, el crecimiento de *Artemia* alimentada con *Tetraselmis* fue casi nulo. El examen microscópico demostró que esta microalga no puede ser utilizada, presentándose un gran número de células vivas pero con daño a la pared celular, prueba evidente de que *Artemia*, por lo menos en sus primeros estadios, no las puede ingerir y/o digerir.

Debido al motivo anterior se decidió no seguir ensayando con *Tetraselmis*, por lo menos para la parte de alimentación de *Artemia*. Entre las dos cepas de *Dunaliella* que, como se reportó anteriormente no presentaron diferencias importantes en cantidad y calidad de biomasa producida, se seleccionó la cepa DU-X-2 debido a que presenta menores problemas de cultivo, ya que el porcentaje de células adheridas a las paredes del recipiente de cultivo resultó

constantemente inferior para esta cepa que para DU-X-1. Esto permite el mantenimiento de cultivos en buen estado durante tiempos largos, sin necesidad de cambios frecuentes del recipiente.

III.3. Valor dietético de la biomasa.

III.3.1. Bioensayo de eficiencia dietética.

El bioensayo con *Artemia* duró, como ya se mencionó en la sección de métodos, hasta el día en el cual se notaron las primeras parejas en todas las repeticiones de cada tipo de alimento. En el caso de las algas frescas, el primer apareamiento se notó en las primeras horas del día 10 y el experimento se dió por terminado a las 12 horas de ese mismo día. Para esa fecha, los organismos alimentados con microalgas congeladas, aunque sexualmente ya bien diferenciados en su mayoría, todavía no se estaban apareando. De todas formas se tomaron muestras para poder comparar las tallas de organismos de la misma edad.

Durante la noche entre el día 10 y 11, por un desperfecto en el control ambiental del laboratorio, la temperatura del agua de los acuarios que durante los días anteriores se mantuvo en $21 \pm 1^\circ\text{C}$, subió hasta 25°C y en la mañana del día 11 los organismos se estaban apareando. Aunque no se nota un cambio importante en la pendiente de la curva de crecimiento (Fig.7), esto pudiera haber tenido alguna influencia sobre el crecimiento y la actividad sexual de los organismos alimentados con microalgas preservadas, que iniciaron a aparearse aproximadamente 24 horas más tarde de los que se mantuvieron con alimento vivo.

El análisis estadístico demuestra que la talla de los juveniles y adultos de *Artemia* alimentados con *Dunaliella* (DU-X-2) preservada es significativamente inferior de los de igual edad mantenidos con alimento fresco (Tabla XV).

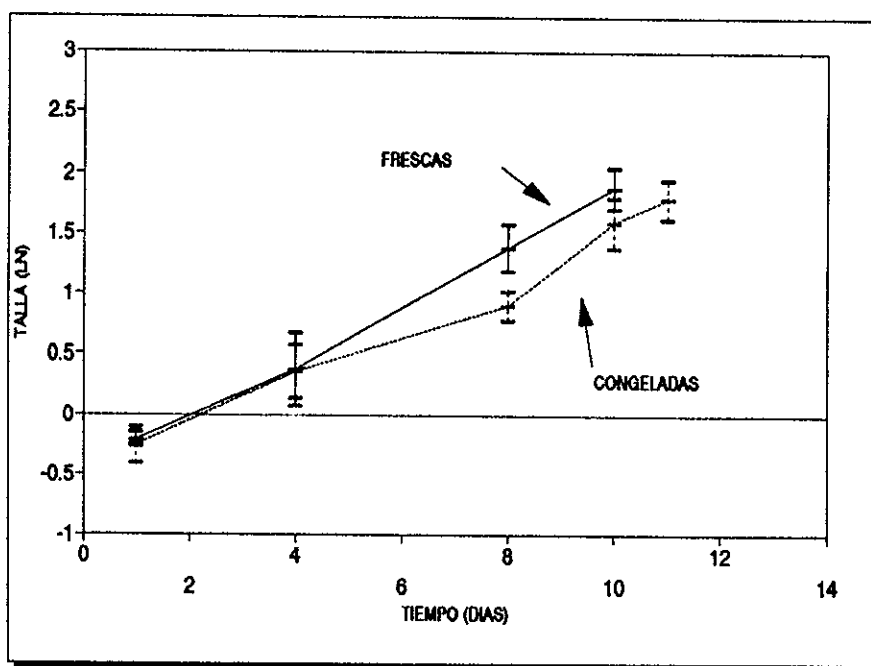
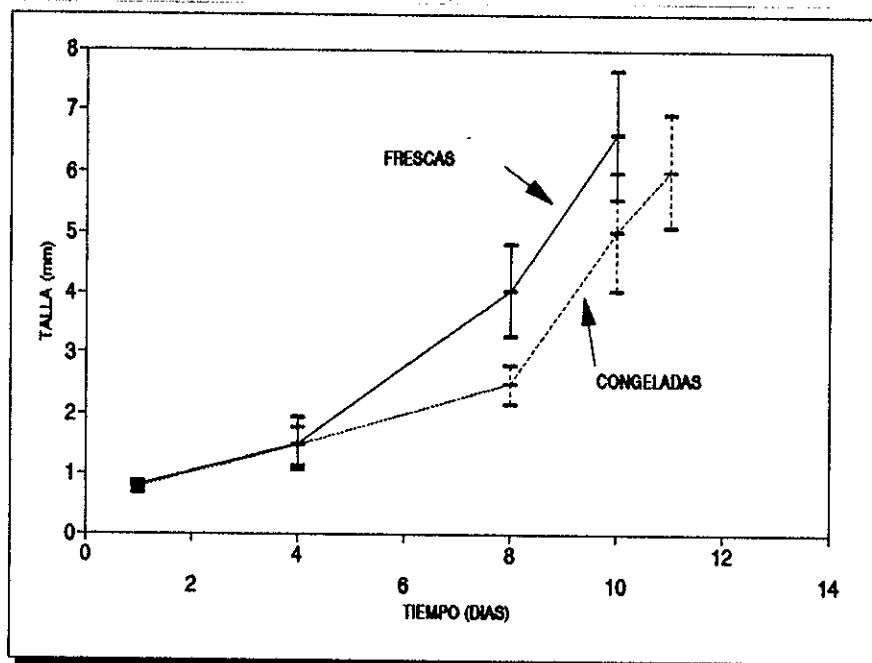


Figura 7.

Crecimiento de *Artemia franciscana* alimentada con la cepa de *Dunaliella* (DU-X-2) en forma fresca y congelada. a).- Tallas en mm y b).- Logaritmo natural de las tallas en mm.

También se encontraron diferencias significativas cuando, sin considerar la edad, se compararon las tallas de los organismos al momento de su primera apareación (Tabla XVI).

Una diferencia adicional fue que para los organismos alimentados con alimento fresco la diferenciación entre sexos inició en la fase juvenil. El alto valor de la desviación estandar que se reporta en la tabla XV para este grupo es el reflejo de la diferencia de tallas entre hembras y machos. En los últimos se notó además un inicio de diferenciación del primer par de antenas en los órganos utilizados para sujetar a la hembra durante la cópula (claspers).

Tabla XV. Tallas (Promedio y desviación estandar), de los diferentes estadios de *Artemia franciscana* alimentada con la cepa de *Dunaliella* DU-X-2, prueba estadística utilizada (KW: Kruskal-Wallis; ANOVA: Análisis de varianza de una vía). N, M, J, A: Nauplios, metanauplios, juveniles y adultos, respectivamente. La segunda letra (F= fresca; C= congelada) se refiere a la dieta empleada. S y SN: significativo o no significativo ($\alpha = 0.05$).

ESTADIO	n	(TALLA mm)	PRUEBA	INTERVALO PROMEDIO	χ^2	
NF	30	.812 (.045)	KW	32.033	0.470	NS
NC	30	.782 (.102)		28.967		
MF	44	1.503 (.43)	KW	42.614	0.208	NS
MC	38	1.461 (.310)		40.211		
JF	30	4.055 (.763)	KW	45.000	41.509	S
JC	30	2.485 (.310)		16.000		
				gdl	F	
AF		6.617 (1.057)	ANOVA	143	55.598	S
AC		5.022 (.985)				

Tabla XVI. Análisis de varianza para la comparación de tallas de adultos en su primera apareación alimentados con los dos tipos de dieta.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	1.816X10 ⁷	1	1816	18.266	<.001
DENTRO DE GRUPOS	2.088X10 ⁸	210	99		
TOTAL	2.270X10 ⁸	211			

III.3.2. Composición proximal de *Artemia franciscana*.

Al momento de concluir el experimento de alimentación se tomaron muestras de los organismos en apareamiento para la determinación de su composición proximal, la cual resultó ser significativamente diferente (Tablas XVII). El peso seco promedio de 10 adultos fue mucho más alto en el caso de los organismos mantenidos con alimento fresco. Sobre todo, resultó altamente significativa la diferencia en los porcentajes de los lípidos (Tablas XVIII a, b y c), cuya concentración es aproximadamente 10 veces más alta para las artemias alimentadas con *Dunaliella* viva. Los lípidos representan el material de reserva más importante para los crustáceos planctónicos (Raymont *et al.*, 1969, Ferguson y Raymont, 1974; Lee *et al.*, 1971; Farber Lorda, 1986), motivo por el cual se puede concluir que las microalgas preservadas por congelación no constituyen un alimento adecuado para *A. franciscana*, ya que su uso retarda el crecimiento de esta especie y no permite la canalización de una fracción importante del alimento hacia reservas energéticas, que son muy importantes durante el apareamiento para garantizar la disponibilidad de energía suficiente para la actividad reproductiva.

También es importante hacer notar la diferencia entre el total de la biomasa explicada (Tabla XVII) para los dos grupos de organismos. En el caso de *Artemia* alimentada con microalgas frescas, la fracción no explicada es inferior al 15% (<23% de la biomasa orgánica), mientras que en el caso de las alimentadas con microalgas preservadas la composición de más del 50% de la biomasa (> del 80% de la sustancia orgánica) no pudo ser identificada. La explicación más probable de esta diferencia está en que ninguno de los métodos utilizados puede determinar el componente más importante del exoesqueleto, la quitina. Aparentemente esta fracción representa la mayor parte de la biomasa de *Artemia* alimentada con *Dunaliella* congelada, lo cual explicaría esta gran diferencia.

Tabla XVII. Resultados del análisis proximal (promedio y en paréntesis, desviación estandar) de adultos de *Artemia franciscana* alimentadas con *Dunaliella* (DU-X-2) en presentación fresca y congelada, % de P.S. y % de P.S.O indican los porcentajes de peso seco y peso seco orgánico respectivamente.

	ALIMENTADAS CON MICROALGAS FRESCAS		ALIMENTADAS CON MICROALGAS CONGELADAS	
	% de P.S \bar{X}	% de P.S.O \bar{X}	% de P.S \bar{X}	% de P.S.O \bar{X}
Peso seco de 10 artemias (mg)	4.3(0.3)		2.7(1.0)	
Proteínas (%)	12.7(4.8)	19.94	9.3(2.2)	13.30
Carbohidratos (%)	7.7(2.7)	12.08	2.9(1.4)	4.15
Lípidos (%)	29.1(.03)	45.68	2.5(.23)	3.58
Cenizas (%)	36.3(2.8)		30.1(2.5)	
Total de sustancia explicada.	85.1	77.7	44.8	21.03

Tabla XVIII. Análisis de varianza para las fracciones orgánicas de *A. franciscana* alimentada con *Dunaliella* DU-X-2 fresca y preservada por congelamiento: (A) proteínas, (B) carbohidratos y (C) lípidos.

A

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	16.368	1	16.368	1.050	.363
DENTRO DE GRUPOS	62.344	4	15.586		
TOTAL	78.712	5			

B

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	26.847	1	26.847	6.636	.082
DENTRO DE GRUPOS	12.138	3	4.046		
TOTAL	38.985	4			

C

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	827.925	1	827.925	999.999	<.001
DENTRO DE GRUPOS	.327	3	.109		
TOTAL	828.252	4			

III.3.3 Composición proximal de *Dunaliella* DU-X-2 con diferentes tiempos de conservación

Durante la fase de cosecha de las microalgas que fueron posteriormente utilizadas para el ensayo de alimentación, se midió la composición proximal de una muestra un día después de congelarlas y al momento de iniciar el bioensayo (dos semanas después de la preservación). Cuatro días después de finalizar el mismo, la biomasa fue analizada nuevamente con el fin de averiguar la posibilidad de variaciones en su calidad. Los datos se reportan en la tabla XIX y demuestran la existencia de cambios importantes en la composición proximal de DU-X-2 a las dos semanas de preservación (al momento del inicio del bioensayo) con pérdidas significativas ($\alpha = 0.05$) en las fracciones de carbohidratos y lípidos. En el transcurso del bioensayo hubo otras pérdidas significativas para la fracción de carbohidratos ($\alpha = 0.05$) y para las proteínas ($\alpha = 0.1$), que disminuyeron notablemente en comparación con los datos iniciales (Tablas XXa, b y c).

Estas pérdidas dan cuenta de la escasa efectividad de esta microalga cuando se utiliza directamente como dieta, ya que evidentemente su calidad dietética disminuye notablemente con el tiempo y posiblemente porque, al momento de su utilización se tomó en consideración el número de células y no su contenido de sustancia orgánica, que había disminuido notablemente a causa de estos cambios durante el tiempo del almacenamiento.

Tabla XIX Composición proximal de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 un día después de congelada (muestra inicial) y después de 15 y 30 días de almacenamiento. La parte superior (A) reporta los datos como porcentajes del peso seco total de la muestra inicial. En (B), los mismos datos se dan como porcentajes del peso orgánico de la misma muestra inicial. En paréntesis se indica la desviación estandar.

	RECIEN CONGELADAS	15 DIAS CONGELADAS	30 DIAS CONGELADAS
A			
Proteínas	32.7 (3.9)	32.4 (3.4)	22.9 (3.4)
Carbohidratos	13.9 (0.6)	11.9 (0.6)	8.9 (0.5)
Lípidos	21.4 (0.2)	15.4 (1.1)	14.8 (0.07)
Cenizas	10.0 (1.2)		
Total explicado	78	59.7	46.6
B			
Proteínas	48.0	47.6	33.7
Carbohidratos	20.4	17.5	13.1
Lípidos	31.5	22.6	21.8
Total explicado		87.8	68.5

Tabla XX. Análisis de varianza para (A) La fracción de proteínas, (B) carbohidratos y (C) lípidos de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 con diferentes tiempos de congelación.

A					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	187.616	2	93.808	7.350	.024
DENTRO DE GRUPOS	76.580	6	12.763		
TOTAL	264.196	8			
B					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	41.536	2	20.755	56.096	<.001
DENTRO DE GRUPOS	1.851	5	.370		
TOTAL	43.387	7			
C					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G. L.	CUADRADOS MEDIOS	RAZON F	NIVEL DE SIG.
ENTRE GRUPOS	74.350	2	37.175	79.491	<.001
DENTRO DE GRUPOS	2.338	5	.468		
TOTAL	76.688	7			

III.4. Cosecha y criopreservación.

III.4.1. Cepa de *Dunaliella* DU-X-1.

III.4.1.1. Centrifugación.

La tabla XXI muestra una diferencia importante entre la viabilidad de las microalgas de la cepa DU-X-1, centrifugadas a 1800 y 1000 r.p.m. En el primer caso se produce un daño celular, evidente en el retardo en el crecimiento de los tubos inoculados con 1×10^6 células y en la falta del mismo por lo menos en parte de los tubos con diluciones mayores. La sobrevivencia a la centrifugación a 1000 r.p.m. fue superior al 99%, sin que hubiera síntomas de daño celular.

III.4.1.2. Criopreservación.

En este ensayo se pudo observar que la viabilidad de las microalgas hasta con quince días de congelamiento fue buena (entre 90 y 99%), pero que después de un mes de conservación la sobrevivencia bajó drásticamente hasta menos de un 10% (Tabla XXII). La inducción de choque osmótico no mejoró los porcentajes de sobrevivencia, pero mejoró ligeramente el tiempo necesario para la recuperación de la reproducción, después de una semana de almacenamiento. Tal efecto no se notó con tiempos más largos de conservación.

Aparentemente el congelamiento produce algún tipo de daño celular lo cual está evidenciado por el alto número de días requeridos para que se pudiera notar crecimiento en los tubos de ensayo.

Tabla XXI. Sobrevivencia y viabilidad de la cepa de *Dunaliella* DU-X-1 con inóculos de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 ; sin centrifugar (SC) y centrifugada a 1800 y a 1000 r.p.m. después de 3 (3d), 5 (5d) y 15 (15d) días de incubación. (-----) no se hicieron mediciones, después de comprobar crecimiento en los tres tubos de cada dilución.

CENTRIFUGACION	1×10^6 3d	1×10^6 5d	1×10^6 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	- - -	+ + +	-----
1000	+ + +	-----	-----
	1×10^5 3d	1×10^5 5d	1×10^5 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	+ - -	+ - -	+ - -
1000	+ + +	-----	-----
	1×10^4 3d	1×10^4 5d	1×10^4 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	+ - -	+ - -	+ + -
1000	+ + +	-----	-----

Tabla XXII. Sobrevivencia y viabilidad de inóculos diferentes de la cepa de *Dunaliella* DU-X-1 después de una semana, quince días y un mes de congelamiento sin y con choque osmótico. Los números indican los días necesarios para que se produjera crecimiento medido como aumento de la densidad óptica y revisión microscópica); T₁, T₂ y T₃ (tubos 1, 2 y 3).

CONGELAMIENTO	SIN CHOQUE			CON CHOQUE		
	OSMOTICO			OSMOTICO		
UNA SEMANA	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃
1x10 ⁶	6	6	6	5	5	5
1x10 ⁵	8	8	8	6	6	6
1x10 ⁴	8	-	-	-	-	-
DOS SEMANAS						
1x10 ⁶	4	4	4	4	4	4
1x10 ⁵	5	5	5	6	6	6
1x10 ⁴	6	6	6	7	7	7
UN MES						
1x10 ⁶	15	15	15	15	15	15
1x10 ⁵	-	-	-	-	17	-
1x10 ⁴	-	-	18	-	-	-

III.4.2. Cepa de *Dunaliella* DU-X-2.

III.4.2.1. Centrifugación.

Al igual que DU-X-1, la centrifugación de esta microalga a 1800 r.p.m. causa daño celular (<90% de sobrevivencia), mientras que la sobrevivencia es superior al 99% cuando se centrifuga a 1000 r.p.m. (Tabla XXIII).

III.4.2.2. Criopreservación.

Al igual que la anterior, esta cepa tiene buena sobrevivencia hasta después de quince días de congelamiento, pero la viabilidad disminuye notablemente después de quince días adicionales, notándose además un aumento considerable del tiempo necesario para que fuera posible registrar crecimiento. La recuperación de la capacidad de reproducción fue notablemente más rápida en el caso de las células tratadas con choque osmótico, después de una semana de conservación, que mostraron una viabilidad igual a las frescas, registrándose crecimiento entre las 24 y 48 horas después de su inóculo. Tal efecto disminuyó para los períodos más largos de almacenamiento (Tabla XXIV).

Tabla XXIII. Sobrevivencia y viabilidad de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 con inóculos de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 ; sin centrifugar (SC) y centrifugada a 1800 y a 1000 r.p.m. después de 3 (3d), 5 (5d) y 15 (15d) días de incubación. (-----) no se hicieron mediciones, después de comprobar crecimiento en los tres tubos de cada dilución.

CENTRIFUGACION	1×10^6 3d	1×10^6 5d	1×10^6 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	+ + +	-----	-----
1000	+ + +	-----	-----
	1×10^5 3d	1×10^5 5d	1×10^5 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	+ - -	+ + -	+ + -
1000	+ + +	-----	-----
	1×10^4 3d	1×10^4 5d	1×10^4 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	+ - -	+ - -	+ - -
1000	+ + +	-----	-----

Tabla XXIV. Sobrevivencia y viabilidad de inóculos diferentes de la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 después de una semana, quince días y un mes de congelamiento sin y con choque osmótico. Los números indican los días necesarios para que se produjera crecimiento medido como aumento de la densidad óptica y revisión microscópica; T₁, T₂ y T₃ (tubos 1, 2 y 3).

CONGELAMIENTO	SIN CHOQUE			CON CHOQUE		
	OSMOTICO			OSMOTICO		
UNA SEMANA	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃
1x10 ⁶	6	6	6	1	1	1
1x10 ⁵	5	5	5	2	2	2
1x10 ⁴	5	-	-	2	2	2
DOS SEMANAS						
1x10 ⁶	4	4	4	5	5	5
1x10 ⁵	6	6	6	6	6	6
1x10 ⁴	6	6	6	7	-	-
UN MES						
1x10 ⁶	15	15	15	15	15	15
1x10 ⁵	-	-	16	-	-	-
1x10 ⁴	-	17	-	15	-	-

III.4.3. *Tetraselmis* sp.

III.4.3.1. Centrifugación.

La sobrevivencia de *Tetraselmis* sp. resultó ser poco afectada por los dos distintos regímenes de centrifugación, siendo la sobrevivencia superior al 99% cuando es centrifugada a 1000 r.p.m. y de 90 al 99% cuando se centrifuga a 1800 r.p.m. (Tabla XXV).

III.4.3.2. Criopreservación.

Como en el caso de *Dunaliella*, la sobrevivencia al congelamiento de *Tetraselmis* es superior al 99% después de una semana de almacenamiento, y su capacidad reproductiva no se ve aparentemente afectada en forma importante. Tiempos superiores de conservación produjeron un decaimiento de los tiempos necesarios para evidenciar crecimiento en los cultivos, y sobrevivencias decididamente inferiores (Tabla XXVI).

Tabla XXV. Sobrevivencia y viabilidad de *Tetraselmis* sp. con inóculos de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 ; sin centrifugar (SC) y centrifugada a 1800 y a 1000 r.p.m. después de 3 (3d), 5 (5d) y 15 (15d) días de incubación. (-----) no se hicieron mediciones, después de comprobar crecimiento en los tres tubos de cada dilución.

CENTRIFUGACION	1×10^6 3d	1×10^6 5d	1×10^6 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	+ + +	-----	-----
1000	+ + +	-----	-----
	1×10^5 3d	1×10^5 5d	1×10^5 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	+ + -	+ + -	+ + -
1000	+ + +	-----	-----
	1×10^4 3d	1×10^4 5d	1×10^4 15d
SC	+ + +	-----	-----
1800	+ + +	-----	-----
1000	+ + +	-----	-----

Tabla XXVI. Sobrevivencia y viabilidad de inóculos diferentes de *Tetraselmis* sp. después de una semana, quince días y un mes de congelamiento sin choque osmótico. Los números indican los días necesarios para que se produjera crecimiento medido como aumento de la densidad óptica y revisión microscópica; T₁, T₂ y T₃ (tubos 1, 2 y 3).

CONGELAMIENTO	SIN CHOQUE OSMOTICO		
	T ₁	T ₂	T ₃
UNA SEMANA			
1x10 ⁶	3	3	3
1x10 ⁵	4	4	4
1x10 ⁴	5	5	5
DOS SEMANAS			
1x10 ⁶	5	5	5
1x10 ⁵	6	-	-
1x10 ⁴	7	7	-
UN MES			
1x10 ⁶	10	10	10
1x10 ⁵	11	-	-
1x10 ⁴	-	-	-

IV. DISCUSION.

IV.1. Medio de cultivo.

Un punto que llama la atención es la divergencia entre los resultados obtenidos con los cultivos estáticos de pequeño volumen y los semicontinuos. No tenemos una explicación para estas diferencias, que se deben probablemente a factores como por ejemplo el mayor grado de cuidado de los cultivos en pequeña escala, la mayor penetración de la luz y sobre todo el menor tiempo de mantenimiento, ya que los cultivos estáticos solamente se mantienen hasta pocos días después del inicio de la fase estacionaria de crecimiento, mientras que se pretende que los cultivos de mayor volumen duren por tiempos mucho más largos. En el primer caso, no solamente no hubo diferencias entre medios, por lo que se refiere a la tasa de división celular, sino que el uso de medios basados en sales de amonio o urea resultó en una mayor producción de biomasa. Para los semimasivos mantenidos con la técnica semicontinua, la biomasa máxima se obtuvo con el medio control; la diferencia en peso o en número de células por unidad productiva, aunque significativa, no es muy importante en comparación con la diferencia involucrada en el costo de preparación del medio. En un caso análogo López Elías y Voltolina (1992) sugieren que la decisión sobre la conveniencia del uso de un medio simplificado tiene que hacerse en base a consideraciones de tipo económico, en dependencia de los otros costos (espacio, estanquería, mano de obra y demás costos asociados) involucrados en el cultivo de microalgas. Otros autores, como Fabregas *et al.* (1989), basándose solamente en el costo de los reactivos, justifican plenamente el uso de medios simplificados, aunque carecen de una información cuya importancia se hizo patente con los resultados del presente trabajo, que es la estabilidad de los cultivos en el tiempo. En el primero de los casos mencionados, el escalamiento a cultivo semimasivo y el uso de la técnica semicontinua dió elementos para la conclusión de los autores acerca de la posible conveniencia de un medio no convencional, mientras que Fabregas *et al.* (1989), solamente basaron su conclusión en los resultados obtenidos con cultivos estáticos en volumen limitado (tubos de ensayo). Nuestra experiencia

con las dos cepas de *Dunaliella* indica los peligros involucrados en este tipo de acercamiento.

Con las dos cepas utilizadas para este trabajo mientras la biomasa producida parece ser aceptable, debido al menor costo de su producción cuando se utiliza un medio con la concentración adecuada de nitrógeno, la viabilidad de los cultivos es tan limitada en el tiempo, que un sistema de producción basado en el uso de fertilizantes nitrogenados reducidos sería incosteable, debido al mayor costo de la mano de obra, y sería además un importante factor de riesgo ya que resultaría difícil, si no imposible, garantizar la continuidad de abasto de alimento para los organismos en cultivo, a menos de utilizar cultivos terminales (en batch), empleando el sistema de producción con inóculos sucesivos de cultivos terminales de volumen progresivamente mayor como el descrito en Aquacop (1983) y en Trujillo Valle y Voltolina (1993).

Varios autores (Gibor, 1956; Grant, 1968; Borowitzka y Borowitzka, 1988) señalan que los medios de cultivo basados en urea o sales de amonio pueden ser aceptables, en el caso de *Dunaliella salina*, siempre y cuando las concentraciones de nitrógeno no alcancen niveles no compatibles con los límites de tolerancia de la especie a estos compuestos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que, al utilizar la mitad de la concentración de nitrato de amonio, los cultivos pudieron mantenerse estables durante un período largo, con la ventaja de una mayor producción de proteína por unidad de biomasa, pero con la desventaja de una producción que resultó ser aproximadamente la mitad de la que puede producir una unidad productiva de igual tamaño, empleando el medio que utilizamos como control.

En sustancia, lo afirmado por el Dr. M. Borowitzka durante el Segundo Curso Internacional de Tópicos Selectos sobre Cultivos de Microalgas (México, D.F., Junio, 1992), acerca de la conveniencia de utilizar para *Dunaliella salina* un medio complejo, basado entre otros en el uso de compuestos oxidados de nitrógeno, queda plenamente confirmado con el

presente trabajo, ya que sólo con ésto fue posible obtener una producción diaria compatible con las necesidades de un laboratorio de acuicultura, por lo que se refiere a la cantidad de biomasa por unidad productiva y a la continuidad de abasto de la misma.

IV.2. Criopreservación de *Dunaliella* sp.

Los datos que se obtuvieron en el presente trabajo indican que es posible congelar ambas cepas de *Dunaliella*, al igual que *Tetraselmis* sp., sin afectar de manera significativa la sobrevivencia de las células. Por otro lado, ésta se ve notablemente afectada por el tiempo de almacenamiento, que tiene como consecuencia una alta mortalidad y una disminución importante en la viabilidad de las células sobrevivientes, que empiezan a reproducirse después de un tiempo muy largo de incubación. Sería importante investigar si esta disminución de viabilidad se debe a la técnica de almacenamiento, en cuyo caso sería factible utilizar un preservador externo ya que evidentemente el glicerol intracelular no tiene esta función, o si la tiene, ésta está limitada en el tiempo. Por otro lado, existen indicaciones en la literatura acerca de la viabilidad en ambiente natural de algunas especies de *Dunaliella* a temperaturas de por lo menos -35°C (Teorodesco, 1906; Bunt, 1968; Siegel *et al.*, 1984). Esto indica que la actividad metabólica de esta microalga continúa, aunque evidentemente a ritmo reducido, a la temperatura que se utilizó para su almacenamiento lo cual parece ser confirmado por los cambios que se midieron en la composición proximal de DU-X-2, después de tiempos diferentes de almacenamiento. La literatura sobre criobiología es limitada por lo que se refiere a la fisiología vegetal, pero existen indicios de que varias microalgas continúan utilizando sustratos respiratorios a temperaturas $<-20^{\circ}\text{C}$ y que esta actividad, aunque bajando de intensidad, puede continuar en temperaturas inferiores (Holm-Hansen, 1973). De esta forma la viabilidad de las microalgas congeladas se vería afectada por el metabolismo mismo de las células y no sería posible su almacenamiento por un tiempo superior al necesario para que las microalgas consuman sus reservas. Por otro lado, los porcentajes de pérdida son muy altos y pudieran ser atribuidos, por lo menos parcialmente, a un cambio de permeabilidad de la membrana celular con consiguiente pérdida de electrolitos.

La utilización de *Dunaliella* DU-X-2 preservada como alimento directo trajo como consecuencia un menor crecimiento de los organismos utilizados para el bioensayo. Además,

la cantidad de biomasa de *Artemia* resultó significativamente diferente de la que se obtuvo en el caso de organismos alimentados con microalgas frescas. Es evidente que el alimento es consumido y que de hecho permite la sobrevivencia de *Artemia*, permitiendo además su crecimiento hasta alcanzar la madurez sexual. De todas formas, la menor cantidad de sustancias de reserva implica un deterioro de la calidad de la biomasa producida, que sería evidentemente de escaso valor para organismos de niveles tróficos superiores.

Por lo anterior consideramos que sería factible utilizar la cepa de *Dunaliella* DU-X-2 preservada por congelamiento solamente como alimento de emergencia, posiblemente adicionando una fracción de alimento vivo (Arriaga Haro, com. pers.).

El uso de microalgas preservadas como inóculo también pudiera ser una proposición viable, siempre y cuando fuera posible mejorar su sobrevivencia. De no ser esto factible, el uso como inóculo de las tres cepas de DU-X-1, DU-X-2 y TE-X-1 preservadas por congelamiento también pudiera ser una alternativa viable, pero empleandolas dentro de un máximo de una semana después de su congelamiento. Esto significa una desventaja importante desde el punto de vista comercial, ya que la producción tendría que hacerse sólo a demanda de clientes y no permitiría la continuidad de la operación de cultivo y cosecha; además se requeriría de un sistema de distribución muy eficiente que probablemente resultaría en un aumento considerable del costo al consumidor.

IV.3. Utilización de *Dunaliella* en la Acuicultura.

Cabe aclarar que las consideraciones que se hacen a continuación, se refieren al uso de las cepas que se utilizaron en el presente trabajo, ya que existen varios datos en la literatura que indican la efectividad de otras especies no halotolerantes de *Dunaliella* como alimento para diferentes organismos acuáticos (El-Betouhim y Kahan, 1963; Ukeles, 1965 y 1977; Walne, 1974; Spectorova *et al.*, 1982).

La utilización de las microalgas objeto del presente estudio como fuente protéica no presenta aparentemente ventajas comparado con otras microalgas. Esto se basa en la siguiente serie de consideraciones: primeramente ambas cepas resultaron muy sensibles a las condiciones de cultivo, ya que oscilaciones de pH dentro del rango que otras microalgas soportan sin que se vea sensiblemente alterado su crecimiento, resultaron perjudiciales para *Dunaliella* DU-X-1 y DU-X-2. Esto es importante, ya que el control del pH del medio de cultivo es relativamente difícil y, sobre todo en el caso de cultivos masivo, representa además un costo notable debido a que el suministro de CO₂, tiene que ser dosificado por medio de sensores que regulan el flujo de CO₂ según las variaciones del pH, que dependen de la cantidad de biomasa presente en el cultivo y de su actividad fotosintética. En nuestro caso, el control fue de tipo manual y discontinuo (por lo menos dos veces al día); ésto es aceptable en condiciones de laboratorio, pero no sería congruente con actividades comerciales de acuicultura, en las cuales el costo de la mano de obra representa una parte importante del costo total del producto final (según informaciones personales de los responsables de varios laboratorios comerciales, entre el 40 y 60% del costo total de operación). Además, se requiere de un sistema de distribución muy eficiente para mejorar la disolución del CO₂, cuyo costo de mercado es elevado.

A parte de lo anterior, el cultivo de ambas cepas presentó otros problemas, uno de ellos asociado a la adhesión de una parte de la biomasa a las paredes del recipiente. Por este motivo los cultivos requieren de un mantenimiento continuo, basado sobre todo en frecuentes cambios

a recipientes limpios, lo cual representa un aumento considerable del costo de producción, debido sobre todo al mayor tiempo que la mano de obra tiene que dedicar a esta actividad y a las actividades de limpieza de los recipientes.

Además, la producción de la biomasa fue relativamente baja, sobre todo debido a la baja tasa de duplicación de ambas cepas, que en condiciones óptimas pueden dividirse un máximo de una vez por día pero que, cuando el cultivo alcanza concentraciones compatibles con los fines productivos, permiten una cosecha diaria que no es superior al 25-30% del total del cultivo. Esta baja tasa de división, aparte de las desventajas ya mencionadas, representa también un factor de riesgo ya que, como lo señalan diferentes autores (Goldman y Rhyter, 1976; Goldman *et al.* 1982) las especies halotolerantes de *Dunaliella* no pueden competir con otras especies de microalgas en condiciones de baja salinidad que, aún acercándose al valor óptimo para su crecimiento, permiten que otras especies de crecimiento más rápido puedan competir exitosamente con esta microalga.

Desde el punto de vista dietético, por lo menos para *Artemia*, el uso de *Dunaliella* no presenta ventajas si se compara con otras especies de cultivo más fácil, de crecimiento más rápido y menos exigentes por lo que se refiere al tipo de medio, con los cuales se obtienen tasas de crecimiento y velocidades de maduración equivalentes a las obtenidas en el presente trabajo (Sánchez Saavedra, com. pers., Arriaga Haro, com. pers.). Es importante hacer notar que no solamente *Dunaliella* requiere de una fuente de nitrógeno oxidado (Borowitzka y Borowitzka, 1988) lo cual representa, por lo menos en México, un aumento del costo del medio ya que no se comercializan fertilizantes basados exclusivamente en nitratos (Anónimo, 1984), que como se ha visto son la fuente más aceptable de nitrógeno para *Dunaliella*. Además, solamente una fracción de nitrógeno no superior al 20% del total presente en el medio es incorporado como proteína en la biomasa. Por otro lado es evidente que estas cepas requieren de medios que contienen una alta cantidad de nitrógeno, ya que al reducir a la mitad la concentración de este elemento se obtuvo una producción de biomasa aproximadamente equivalente a la mitad de lo

que se obtuvo con el medio completo. Esto hace pensar que la constante media de saturación (concentración a la cual la velocidad de absorción de un nutriente es la mitad de la velocidad máxima de absorción) (Fogg y Thake, 1987) no se aleja de la mitad de la concentración de nitrógeno presente en el medio "f", que equivale aproximadamente a 0.9 mg-at de nitrógeno (12.6 mg de nitrógeno por litro).

La última consideración se refiere a la escasa factibilidad de preservar la biomasa para su uso posterior como alimento o para inóculos, que era un punto que se consideró muy importante al inicio del presente estudio.

A raíz de los resultados obtenidos y de las consideraciones anteriores se lograron las siguientes conclusiones.

V. CONCLUSIONES.

Los objetivos generales y específicos del presente trabajo fueron logrados en su totalidad ya que se demostró que es factible cultivar en forma semimasiva las dos especies de *Dunaliella* que se probaron; se ensayó una técnica de preservación por congelamiento, la biomasa fresca y preservada fue utilizada para bioensayos con *Artemia* y se estimó además la viabilidad de *Dunaliella* congelada con diferentes tiempos de almacenamiento. Los resultados indican que:

- 1.- Según el presente estudio, la utilización de *Dunaliella* DU-X-2 como alimento fresco no presenta ventajas significativas sobre otras microalgas más fáciles a cultivar y de productividad superior.
- 2.- El cultivo de *Dunaliella* DU-X-1 y DU-X-2 resulta en un aumento en el costo de producción debido a la baja cantidad de biomasa que es factible producir diariamente por unidad productiva, requiriéndose además un medio de cultivo más caro y un mayor tiempo de cuidado del cultivo, lo que representa un mayor costo en mano de obra.
- 3.- Es factible congelar las dos cepas de *Dunaliella* que se estudiaron sin perjudicar sustancialmente, a corto plazo, la viabilidad de las células.
- 4.- Es posible utilizar como inóculos las dos cepas DU-X-1 y DU-X-2 de *Dunaliella* preservada por congelamiento, pero solamente después de un almacenamiento de una o como máximo dos semanas. Por este motivo esta técnica no es rentable desde el punto de vista económico.
- 5.- El almacenamiento en congelador de DU-X-2 causa cambios importantes en la concentración de sus fracciones bioquímicas sobre todo de los lípidos y de los carbohidratos; esto resulta en una disminución de su valor nutritivo y es probablemente el motivo del retardo de crecimiento que se notó en los cultivos iniciados con microalgas criopreservadas y almacenadas en congelación.

LITERATURA CITADA.

- Aquacop. 1983. Algal food cultures at the Centre Oceanologique du Pacifique. En: Mcvey, J. P. (Ed). CRC Handbook of mariculture: crustacean aquaculture. CRC Press, Boca Raton. 3-14.
- Anónimo. 1984. Los fertilizantes y su aplicación. Fertilizantes Mexicanos. Dirección General. Gerencia de campo. Documento interno. 37 P.
- Ben-Amotz, A. y M. Avron. 1973. The role of glicerol in the osmotic regulation in the halophilic alga, *Dunaliella parva*. Plant. Physiol. 51: 875-878.
- Ben-Amotz, A y M. Avron. 1978. On the mechanism of osmoregulation in *Dunaliella*. En: Caplan, S. R. y M. Ginzburg (Eds). Energetics and structure of halophilic microorganisms. Elsevier-North Holland. Biomedical Press. New York. 529-536.
- Biedenbach, J. M., L.L. Smith y A. L. Lawrence. 1990. Use of a new spray-dried algal product in penaeid larviculture. Aquaculture. 86:249-257.
- Borowitzka, M. A. 1986. Micro-algae as source of fine chemicals. Microbiological Sciences. 3(12):372-375.
- Borowitzka, M. A. y L. J. Borowitzka. 1988. *Dunaliella*. En: Borowitska A.M. y J.L. Borowitzka (Eds). Microalgal biotechnology. Cambridge University Press. New York. 27-58 p.
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-917.
- Builtrago, E. B. 1992. Concentración y preservación de microalgas como reserva de alimento de organismos marinos cultivables. En: CYTED-D Larvicultura de camarones Peneidos. Volumen I. Producción de postlarvas, cultivo y evaluación de microalgas como alimento. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma II-Acuicultura. México, D.F. 281 p.
-

- Bunt, J. S. 1968. Some characteristics of micro-algae isolated from Antarctic sea ice. *Antarctic Res. Series.* 11:1-14.
- Chiaverini, J. 1972. *Techniques d'extraction et d'analyse des lipides.* Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-sur-mer. Notes de travail No. 12. 12p.
- Cordero Esquivel, B., D. Voltolina y F. Correa Sandoval. 1992. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comparative Biochemistry and Physiology.* (en prensa).
- Correa Sandoval, F. y L. F. Bückle Ramírez. 1993. Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Rev. Biol. Trop.* 41:103-111.
- Claus, C., F. Benijts y G. Vandeputte. 1979. The biochemical composition of the larvae of two strains of *Artemia salina* (L.) reared on two different algal foods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 36:171-183.
- De Pauw, N. 1981. Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. *European Mariculture Society. Special Number* 7:35-69.
- De Pauw, N., J. Verboven y C. Claus. 1983. Large-scale microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. *Aquaculture Engineering.* 2:27-47.
- De Pauw, N., J. Morales y G. Persoone. 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture: progress and constraints. *Hydrobiologia.* 116/117:121-134.
- Dorsey, T. E., P. W. McDonald y O. A. Roels. 1977. A heated biuret-Folin protein assay which gives equal absorbance with different proteins. *Anal. Biochem.* 78:156-164.
- Dubois, M., K. Gilles., J. Hamilton, P. Rebers y F. Smith. 1956. A colorimetric method for the determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- El Betouhim, T. y D. Kahan. 1963. *Tisbe pori* n. sp. (Copepoda, Harpacticoidea) from the mediterranean coast of Israel and its cultivation in the laboratory. *Mar. Biol.*, 16:201-209.
-

- Fabregas, J., J. Abalde., C. Herrero., B. Cabeza y M. Veiga. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*. 42:207-215.
- Fabregas, J., Herrero, C., B. Cabeza y J. Abalde. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher with high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 49:231-244.
- Fabregas, J., C. Herrero, J. Abalde, R. Liaño y B. Cabezas. 1986. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* Butcher with high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 53:187-199.
- Fabregas, J., J. Abalde., B. Cabeza y C. Herrero. 1989. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* Butcher by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite y urea. *Aquacultural Engineering*. 8:223-239.
- Farber Lorda, J. 1986. Etudes biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique *Euphausia superba* et *Thysanoessa macrura* recolet au cours de la Campagne Fibex (Février 1981). Thèse de Doctorat de la Université d'Aix-Marseille II. 214 p.
- Ferguson, C. F. y J. K. B. Raymont. 1974. Biochemical studies on marine zooplankton. XII. Further investigations on *Euphausia superba* Dana. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 54:719-725.
- Fernández Reiriz, M. J., A. Perez Camacho., M. J. Ferreiro., J. Blanco., M. Planas., M. J. Campos y U. Labarta. 1989. Biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*. 83:17-37.
- Fogg, G.E. y B. Thake. 1987. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press. 269 pp.
- Gibor, A. 1956. The culture of brine algae. *Biological Bulletin*. Woods Hole. 3:223-2239.
- Goldman, J. C. y J. H. Ryther. 1976. Temperature-influenced species competition in mass cultures of marine phytoplankton. *Biotechnology and Bioengineering*. 18:1125-1144.
-

- Goldman, J. C., C. B. Riley y M. R. Dennett. 1982. The effect of pH in intensive microalgal cultures. II. Species competition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57:15-24.
- González Rodríguez, E y S. Y. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. *Aquaculture.* 36:245-256.
- Grant, B. R. 1968. The effect of carbon dioxide concentration and buffer systems on nitrate and nitrite assimilation by *Dunaliella tertiolecta* J. *General Microbiol.* 54:327-336.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Rhyther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Hellebust, J. A. 1985. Mechanisms of response to salinity in halotolerant microalgae. *Plant and Soil.* 89:69-81.
- Herrero, C., J. Fabregas y J. Abalde. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacultural Engineering.* 10:99-110.
- Holm-Hansen, O. 1963. Viability of blue-green and green algae after freezing. *Physiol. Plantarum* 16:530-540.
- Holm-Hansen, O. 1973. Preservation by freezing and freeze-drying. II. General equipment and methods. En: Stein, J.R. (Ed). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements.* Cambridge University Press, Cambridge. 196-204 p.
- Jones, D. A. Mundford y P. Gabbott. 1974. Microcapsules as artificial food particles for aquatic filter feeders. *Nature (London).* 247:233-235
- Jones, D. A., D. L. Holland y S. Jabbore. 1984. Current status of microencapsulated diets for aquaculture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 10:275-288.
-

- Kurmaly, K., D. A. Jones., A. B. Yule y J. East. 1989. Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa 1 to postlarva 1, on live feeds, artificial diets and on combinations of both. *Aquaculture*. 81:27-45.
- Laing, I., A. Child y A. Janke. 1990. Nutritional value of dried algal diets for larvae of manila clams (*Tapes philippinarum*). *J. Mar. Biol. Ass.* 70:1-12.
- Laing, I. y P. Millican. 1992. Indoor nursery cultivation of juvenile bivalve molluscs using a diet of dried algae. *Aquaculture*. 102:231-243.
- Lee, R.F., J. C. Hirota y A. M. Barnett. 1971. Distribution and importance of wax esters in marine copepods and other zooplankton. *Deep-Sea Res.* 18:1147-1165.
- López Elías, J.A. 1990. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados; evaluación de técnicas analíticas y de producción. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. Tesis de Maestría en Ciencias. 163 p.
- López Elías, J. A. y D. Voltolina. 1992. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*, México (en prensa).
- Lowry, O., N. J. Rosebrough., A. L. Farr y H. I. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Malara , G. y R. Charra. 1972a. Dosage des glucides particuliers selon la methode de Dubois. Univ. de Paris. Station Zoologique. Villefranche-sur-mer. Notes de travail. No. 6. 12 p.
- Malara , G. y R. Charra. 1972b. Dosage des proteines particuliers selon la methode de Lowry. Univ. de Paris. Station Zoologique. Villefranche-sur-mer. Notes de travail. No. 5. 11p.
- Mason, D.T. 1963. The growth response of *Artemia salina* to various feeding regimes. *Crustaceana*. 5:138-150.
-

- McLachlan, J. 1960. The culture of *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) -A euryhaline organism. Can. J. Microbiol. 6:367-379.
- Nell, J.A. y W.A. O'Connor. 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as food source for Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley) larvae. Aquaculture. 99:277-284.
- Oliveira, L., T. Bisalputra y N. J. Antia. 1980. Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. New Phytol. 85:385-392.
- Pande, S. U., R. Parvin Khan y T. A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. Anal. Biochem. 6:415-423.
- Raymont, J. E. G., R. T. Strinivasagam y J. K. B. Raymont. 1969. Biochemical studies on marine zooplankton. IV. Investigations on *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars). Deep-Sea Res. 16:141-156.
- San Francisco Bay Brand, Inc. 1988. Tips on cyst decapsulation. 2 p.
- Siegel, B. Z., S. M. Siegel, T. Speitel, J. Waber y R. Stocker. 1984. Brine organisms and the questions of habitat-specific adaptation. Origins of life. 14:757-770.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: Stein, J. R. (Ed). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press. Cambridge. 394p.
- Spectorova, L. V., O. I. Goronkova., L. P. Nosova y O. N. Albitskaya. 1982. High-density culture of marine microalgae-promising items for mariculture. I. Mineral feeding regime and installations for culturing *Dunaliella tertiolecta* Butch. Aquaculture. 26:289-302.
- Stein, J. R. 1973. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press. Cambridge. 394 p.
-

- Teorodesco, E. C. 1906. Observations morphologiques et biologiques sur le genre *Dunaliella*.
Revue générale de Botanique. 18:353-371.
- The Great Lakes Environmental, Inc. 1989. Inclined plate clarifier. 463 Vista, Addison, IL.
60101.
- Trujillo Valle, M. L. y D. Voltolina. 1993. Cultivos de microalgas para la acuicultura. En: De
la Lanza Espino y C. Cáceres Martínez (Eds.). Lagunas costeras y el litoral mexicano.
UNAM, México y Univ. Auton. de B. C. S., La Paz (en prensa).
- Ukeles, R. 1965. A simple method for mass culture of marine algae. *Limnol. Oceanogr.* 10(3):
492-495.
- Ukeles, R. 1977. Culture of algae for feeding larvae and juveniles molluscs in controlled
aquaculture. Reports of the 3rd Meeting of the ICES Working group on mariculture.
Brest, France. ICES C.M. 1977/E: 23. 11p.
- Voltolina, D., M. de L. Trujillo Valle y M. I. González Leonardo. 1991. La colección de cepas
de microalgas del Departamento de Acuicultura del C.I.C.E.S.E. Centro de Investigación
Científica y de Educación Superior de Ensenada. Comunicaciones Académicas.
CTATC-9101. 50 p.
- Walne, P.R. 1974. Culture of bivalve molluscs. 50 years' experience at Conwy. Fishing News
(Books) Ltd., England. 173p.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of
phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture.* 60:231-241.
-