



**AISLAMIENTO Y CULTIVO EXPERIMENTAL DE UNA CEPA MICROALGAL  
NATIVA DEL CARIBE COLOMBIANO**

**SILVIA CRISTINA CARRERA QUINTANA**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SANTA MARTA**

**2005**

**AISLAMIENTO Y CULTIVO EXPERIMENTAL DE UNA CEPA MICROALGAL  
NATIVA DEL CARIBE COLOMBIANO**



**SILVIA CRISTINA CARRERA QUINTANA**

**Trabajo de Grado para optar el título de Biólogo**

**DIRECTOR**

**Luz Adriana Velasco Cifuentes**

**D. Sc. Biólogo marino**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SANTA MARTA**

**2005**



Nota de aceptación

---

---

---

---

Jurado

---

Jurado

---

Jurado



**A Dios por su gran misericordia,  
A mi esposo, por su apoyo  
Incondicional y gran paciencia,  
A mis padres Agustín y Emperatriz,  
A mis hermanos y a mi Hija Daniela.**



## AGRADECIMIENTOS

El autor de este trabajo expresa sus más sinceros agradecimientos a las siguientes personas y entidades que de forma desinteresada, prestaron su colaboración y apoyo durante el desarrollo de esta tesis y sin el cual, no se habría podido realizar:

- Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena
- Instituto de Investigaciones Marinas y costeras. INVEMAR
- Grupo de Investigación Moluscos Marinos, Universidad del Magdalena
- Planta piloto pesquera de Taganga
- D. Sc. Luz Adriana Velasco, Docente de la Universidad del Magdalena
- Ingeniera pesquera Socorro Sánchez. Coinvestigadora
- M. Sc. Luis Alfonso Vidal
- Biólogo Darío Vega
- Ingeniera pesquera Sirlen Troncoso
- Walter Barbosa, Estudiante Universidad del Magdalena
- Edinson Giraldo, Estudiante Universidad del Magdalena
- Judith Barros, Estudiante Universidad del Magdalena
- Ernesto Acosta, Estudiante Universidad del Magdalena

BB  
00020  
Ej. 1



## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MATERIALES Y METODOS	7
2.1 DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO	7
2.2 TOMA DE MUESTRAS Y PARÁMETROS AMBIENTALES	8
2.3 AISLAMIENTO DE MICROALGAS	9
2.4 EXPERIMENTOS DE CULTIVO	11
2.4.1 Estimación de la densidad celular	12
2.4.2 Estimación de la biomasa	13
2.5 DETERMINACION DEL VALOR NUTRICIONAL DE LAS MICROALGAS	14
2.5.1 Contenido de materia orgánica	14
2.5.2 Determinación de proteínas	15
2.5.3 Determinación de lípidos	15
2.5.4 Determinación de carbohidratos	16
2.6 ANALISIS ESTADÍSTICO	16
3. RESULTADOS	18
3.1 AISLAMIENTO DE MICROALGAS	19
3.1.1 Cepas aisladas	18



3.1.2 Descripción de las cepas aisladas	18
3.1.2.1 <i>Amphora sp</i>	18
3.1.2.2 <i>Cylindrotheca closterium</i>	19
3.1.2.3 <i>Chaetoceros sp</i>	19
3.1.2.4 <i>Skeletonema sp</i>	19
3.2. EXPERIMENTOS DE CULTIVO	20
3.2.1 Cultivo de <i>Chaetoceros sp</i> en volúmenes de 15 mL	20
3.2.2 Cultivo de <i>Chaetoceros sp</i> y <i>Chaetoceros calcitrans</i> en volúmenes de 200 mL.	22
3.2.3. Cultivo de <i>Chaetoceros sp</i> en volúmenes de 1000 mL	28
3.3 ANALISIS DEL VALOR NUTRICIONAL DE LAS MICROALGAS	29
4. DISCUSIÓN	31
5. CONCLUSIONES	37
6. RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	



## LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Ubicación taxonómica de las especies de microalgas encontradas en la Bahía de Taganga.	18
Tabla 2. <i>Chaetoceros sp.</i> Ecuaciones de primer orden que muestran el mejor ajuste entre los valores de densidad celular (Y) y tiempo de cultivo (X) en volúmenes de 15 mL.	21
Tabla 3. <i>Chaetoceros sp.</i> Comparaciones entre las pendientes de las regresiones ajustadas a cada uno de los tratamientos de medio de cultivo y temperaturas probados.	22
Tabla 4. <i>Chaetoceros sp</i> y <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Ecuaciones de segundo orden que muestran el mejor ajuste entre los valores de densidad celular (Y) y tiempo de cultivo (X).	23
Tabla 5. <i>Chaetoceros sp</i> y <i>C. calcitrans</i> . Análisis de varianza para la determinación de efectos principales que influenciaron la A) densidad celular y B) biomasa.	26
Tabla 6. <i>Chaetoceros sp.</i> Prueba de comparación múltiple para definir las diferencias entre los tratamientos de medios de cultivo y temperaturas sobre A) el crecimiento celular y B) biomasa.	27

Tabla 7. <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Prueba de comparación múltiple para definir las diferencias entre los tratamientos de medios de cultivo y temperaturas sobre A) el crecimiento celular y B) biomasa.	27
Tabla 8 . <i>Chaetoceros sp</i> . Ecuaciones de primer orden que muestran el mejor ajuste entre los valores de densidad celular (Y) y tiempo de cultivo (X).	28
Tabla 9. <i>Chaetoceros sp</i> . Comparaciones entre las pendientes de las regresiones ajustadas a cada uno de los tratamientos de medio de cultivo y temperaturas probadas en volúmenes de 1000 mL.	29
Tabla 10. <i>Chaetoceros sp</i> y <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Contenido de materia orgánica, proteínas, lípidos y carbohidratos .	30
Tabla 11. <i>Chaetoceros sp</i> y <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Análisis de varianza sobre a) porcentaje de materia orgánica, b) proteínas, c) lípidos y d) carbohidratos	30
Tabla 12. Composición bioquímica como porcentaje de materia orgánica (%MO) de <i>Chaetoceros calcitrans</i>	36





## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Ubicación Geográfica de la Bahía de Taganga.	8
Figura 2. Cultivos iniciales de fitoplancton tomados de la bahía de Taganga e inoculados en medio de cultivo F/2 de Guillard + silicatos.	10
Figura 3. Métodos de aislamiento utilizados para la obtención de las microalgas: a) pipeteo capilar y b) diluciones seriadas.	10
Figura 4. Cámara Neubauer o hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad utilizada para determinar la densidad celular de las microalgas.	13
Figura 5. Microalga filtrada por medio de una bomba de vacío y sobre un filtro de fibra de vidrio de 0.45 $\mu\text{m}$ .	14
Figura 6. Determinación de proteínas. a) Extracción y b) cuantificación.	16
Figura 7. Diatomeas aisladas de la bahía de Taganga. a) <i>Chaetoceros sp</i> ; b) <i>Amphora sp</i> ; c) <i>Cylindrotheca closterium</i> y d) <i>Skeletonema costatum</i> .	20
Figura 8. <i>Chaetoceros sp</i> .Variación temporal de la densidad celular en los tres medios de cultivo en volúmenes de 15 mL.	21

Figura 9. *Chaetoceros sp.* Variación temporal de la densidad celular y biomasa en los tres medios de cultivo y temperaturas evaluadas en volúmenes de 200 mL. 29

Figura 10. *Chaetoceros calcitrans.* Variación temporal de la densidad celular y biomasa en los tres medios de cultivo y temperaturas evaluadas en volúmenes de 200 mL. 25

Figura 11. *Chaetoceros sp.* Variación temporal de la densidad celular en volúmenes de 1000mL. 29



## LISTA DE ANEXOS



	Pag.
Tabla 13. Soluciones madre utilizadas para la elaboración del medio de cultivo F/2 de Guillard.	52
Tabla 14. Composición química del medio de cultivo a base de humus.	53
Tabla 15. Composición química del medio de cultivo Triple 15.	53



## RESUMEN

Con el objetivo de aislar, cultivar experimentalmente y caracterizar nutricionalmente, una cepa microalgal nativa del Caribe Colombiano con potencial para ser usada como alimento en maricultura, se tomaron muestras de fitoplancton de la bahía de Taganga, en las que se le aplicaron dos técnicas de aislamiento: 1) pipeteo capilar y 2) diluciones seriadas. Con una especie de *Chaetoceros* aislada y con *Chaetoceros calcitrans* (especie foránea cultivada en laboratorios de producción de postlarvas de camarón) se hicieron experimentos de cultivo en el que se probaron tres medios de cultivo (F/2, triple 15 y humus) y dos temperaturas diferentes (24 y 28°C) sobre la densidad celular y producción de biomasa seca en volúmenes de 15, 220 y 1000 mL. Finalmente se realizó un análisis bromatológico a muestras tomadas de cultivos de ambas especies. La densidad celular y biomasa de *Chaetoceros sp* y *C. calcitrans* en todos los tratamientos presentó fase exponencial. Se demostró homogeneidad en la cinética algal de las dos especies de *Chaetoceros*, al igual que una influencia significativa de la temperatura y del medio de cultivo sobre la misma. A 24 °C el crecimiento de las dos especies de microalgas fue mayor, pero estas diferencias solo fueron significativas para *Chaetoceros sp*. Con respecto al medio de cultivo, la densidad y biomasa obtenida con el medio F/2 no produjo diferencias significativas con el medio triple 15 en volúmenes de 200 mL pero si fue significativamente superior a la del humus en volúmenes de 200 y 1000 mL. La composición proteica y lipídica de *Chaetoceros sp* fue estadísticamente mayor que la de *Chaetoceros calcitrans* demostrando que esta especie puede ser utilizada como alimento en maricultura por su alto valor nutricional.



## 1. INTRODUCCIÓN

En la última década, se han producido cambios importantes en las pesquerías mundiales, al intensificarse la explotación de recursos pesqueros en la plataforma continental, con mejores equipos de pesca, embarcaciones, métodos de detección y con la ampliación del mercado de estos organismos por parte de un contingente humano creciente. Este incremento en la producción y en el consumo ha estimulado notablemente el desarrollo de la acuicultura (Davis & Ukeles, 1961).

Uno de los factores limitantes para la acuicultura es la obtención y producción de alimento que cubra todos los requerimientos nutricionales de la especie objeto de cultivo (Gómez & Rosas, 1996). Se ha comprobado que el mejor alimento que se le puede ofrecer a las larvas de organismos marinos y a aquellos adultos que se alimentan por filtración son las microalgas vivas (Torretera & Tacón, 1989). A pesar de que un gran número de especies de algas pueden ser usadas positivamente como alimento de larvas, muy pocas han sido cultivadas con éxito en cantidades y concentraciones necesarias para alcanzar una producción comercial (Brown, 1972).

Las especies de algas aun cuando puedan ser muy semejantes, son diferentes en su calidad como alimento para los organismos a los que se destinan. En general se considera que para que las microalgas sirvan a los propósitos de acuicultura deben tener tamaños entre 2 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (Bayne & Newell, 1983; Alix *et al.*, 1996; Defosse & Hawkins, 1997; Navarro & Thompson, 1997; Raby *et al.*, 1997), no tener componentes tóxicos o de difícil digestión (Hildreth, 1980; Crosby *et al.*, 1989, Alix *et al.*, 1996; Pérez & Román, 1980), tener una pared celular fina y rica en ácidos grasos esenciales poliinsaturados (Soudant *et al.*, 1996; Wikfors *et al.*, 1996; Utting & Millican, 1997; Krupski *et al.*, 1998), producir una alta biomasa empleando técnicas

sencillas y económicas (Langdon & Waldock, 1981) y tener un alto contenido de proteínas y lípidos (Langdon, 1982).

Los géneros de microalgas usados en acuicultura a nivel mundial son: 1) *Chaetoceros* (Langdon & Waldock, 1981), 2) *Nannochloropsis* (Boussiba *et al.*, 1987; Ahmad, 1991; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Lubzens *et al.*, 1995;), 3) *Tetraselmis*; (Fábregas *et al.*, 1985), 4) *Thalassiosira*, 5) *Isochrysis*; (Cohen, 1985, Whyte, 1987), 6) *Chorella*. Otros géneros que son utilizados en menor escala son: *Platymonas*, *Rhodomonas*, *Phaeodactylum*, *Pavlova*, *Chromulina* y *Dicrateria*.

Según Sánchez, (2000), el aislamiento de microalgas tiene como objetivo obtener una población a partir de un solo individuo, es decir, clones. Para el aislamiento de microalgas se puede partir de una muestra de fitoplancton o de un cultivo contaminado y dependiendo de las condiciones de asepsia del laboratorio, se puede establecer un cultivo monoalgal (una sola especie de microalga), clonal (originado de una sola célula), o axénico (libre de cualquier otro microorganismo sea bacteriano o microalgal). Los principales métodos que se utilizan para aislar y purificar microalgas son: 1) pipeteo capilar, 2) rayado en placas de agar, 3) diluciones seriadas (Paniagua *et al.*, 1986).

Según Richmond (1989), durante el crecimiento de una población de microalgas se pueden distinguir cuatro fases o etapas de desarrollo: 1) fase de ajuste, en donde el cultivo no sufre un crecimiento neto debido a la adaptación que sufren las microalgas a las nuevas condiciones de cultivo; 2) fase exponencial, en la cual la biomasa se duplica sucesivamente en intervalos iguales de tiempo; 3) fase estacionaria, en donde las densidades poblacionales permanecen cuantitativamente constantes por un período de tiempo; y 4) fase de muerte, que puede darse por falta de nutrientes, deterioro de la calidad del agua o deficiencia de oxígeno.

El crecimiento de una población de microalgas responde a la interacción mutua de factores físicos (luz, temperatura, agitación) y químicos (nutrientes, salinidad, pH) (Balech & Ferrando, 1964). Entre los principales factores físicos

está la temperatura: la tasa de crecimiento se incrementa cuando aumenta la temperatura dentro de un rango óptimo, por encima del cual el crecimiento disminuye a cero si la temperatura continúa incrementándose. El efecto de la temperatura en el crecimiento de las microalgas obedece a la velocidad de las reacciones químicas. El rango óptimo para el crecimiento de la mayoría de las microalgas, las cuales son propias de medianas y altas latitudes en su mayoría, está entre 16 y 24 °C (Paniagua *et al.*, 1986). No obstante, su tolerancia a la temperatura varía según la especie o género, por ejemplo *Isochrysis sp*, no soporta temperaturas superiores a los 24 °C, mientras que formas más resistentes como *Chlorella sp*, crecen bien hasta 36 °C (Laing & Ayala, 1990). Generalmente la temperatura óptima es superior a la temperatura máxima a la cual se encuentra la microalga en el medio natural (Abalde & Fidalgo, 1995).



Los principales factores químicos que afectan el crecimiento microalgal son los macro y micronutrientes, dentro de los macronutrientes el carbono es muy importante, puesto que se incorpora en la biomasa (materia viva) de las microalgas. Las fuentes inorgánicas de éste nutriente son el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  cuyas concentraciones están en función del pH. El nitrógeno es el segundo elemento en importancia para las microalgas debido a que es necesario para la síntesis de la clorofila y por lo tanto en el proceso de fotosíntesis, sus fuentes inorgánicas son el nitrato, nitrito y amonio (Kaplan, *et al.*, 1986). En diferentes estudios se ha observado que puede existir una gran variabilidad en el crecimiento y en la composición bioquímica de las microalgas, cuando varía la concentración del nitrógeno (Kaplan *op. cit.*). El fósforo es el macronutriente por excelencia íntimamente relacionado con los procesos celulares de transferencia de energía y de síntesis de ácidos nucleicos, la fuente inorgánica comúnmente usada por las microalgas es el ortofosfato. Existen otros factores nutricionales inorgánicos como el Fe, Mg, Cu, Na que juegan un papel importante para la fisiología de las microalgas, al tener una íntima relación con las enzimas (Fabregas *et al.*, 1985).

Los medios de cultivo que mejores crecimientos propician son aquellos que tienen un apropiado balance entre macro y micronutrientes (Shelef & Soeder, 1980). En términos generales, se pueden distinguir dos grandes categorías, los

medios químicamente definidos y los de agua de mar enriquecida (Paniagua, *et al.*, 1986). Estos últimos son los mas utilizados, principalmente aquellos derivados del medio " f " de Guillard & Ryther (1962), como el f/2 y el h/2. Estos, aunque proporcionan un buen crecimiento de las algas, resultan muy costosos para la producción de grandes volúmenes, razón por la cual se han ensayado medios alternativos como el triple 15, extractos de tierra o macrófitas, aguas de deshecho tratada, biodigeridos de estiércol y harina de pescado entre otros (Paniagua & Buckle, 1981, Granados & Buckle, 1983; Buitrago, 1989; Newmark *et al.*, 1988).



En Latinoamérica se conocen algunos estudios de microalgas en condiciones de laboratorio relacionados con aislamiento (Lemos *et al.*, 1988, Pereira, 1983, condiciones de cultivo (Abalde *et al.*, 1984, Buitrago, 1989 James *et al.*, 1989; Iriarte & Buitrago, 1990; Fabregas *et al.*, 1997), evaluación de medios de cultivo (Alfonso *et al.*, 1988, Buitrago *et al.*, 1989; Fernández *et al.*, 1996, Gómez & Rosas, 1996, Gonzalez, *et al.*, 1999) y valor nutricional de algunas cepas de microalgas (Whyte, 1987, Fabregas *et al.*, 1989, Fernández *et al.*, 1989; Medina & Cordero, 1998; Ojea *et al.*, 1999 )

En Colombia se han realizado varios estudios que analizan el efecto de factores como medio de cultivo, temperatura, salinidad, pH y nutrientes, sobre el crecimiento o producción de biomasa en diferentes tipos de microalgas nativas y/o foráneas (Gutierrez & Kochane, 1983; Mancera & Criales, 1988; Newmark *et al.*, 1988; Vidal & Galán 1999; Sánchez 2000).

La industria acuícola a nivel mundial, incluyendo los países tropicales y dentro de ellos la colombiana, utilizan microalgas propias de altas latitudes como alimento vivo. No obstante se considera que el uso de especies nativas es preferible, ya que al estar adaptadas a ciertas condiciones físico-químicas del agua y climáticas de la región, ofrecen la oportunidad de ser un poco más flexibles ante ciertos parámetros de cultivo, como por ejemplo la temperatura (Leal, 1998). Mientras que para el cultivo de microalgas foráneas se requieren bajas temperaturas lo cual hace que su implementación masiva sea

extremadamente costosa, el cultivo de microalgas nativas no debería tener este requerimiento.

En la costa Caribe de Colombia se han encontrado varios de los géneros con uso potencial en acuicultura como son *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Oscillatoria*, *Dunaliella*, *Nitzschia*, *Cyclotella* (Caicedo, 1975; Rondón, 1991; Franco *et al*, 1992 ). Muestras preliminares en la Bahía de Taganga, Caribe colombiano, indicaron la presencia de microalgas del género *Chaetoceros*, el cual es ampliamente utilizado en la industria acuícola. El aislamiento y cultivo experimental de especies de este género así como la evaluación de su contenido nutricional, además de permitir ampliar el conocimiento sobre la bioecología, fisiología y bioquímica de las microalgas nativas, se constituye en un primer paso hacia el establecimiento de un cepario de microalgas nativas. La utilización de microalgas nativas por parte de las empresas productivas vinculadas al sector de maricultura podría mejorar su rendimiento si las microalgas nativas tienen tasas de crecimiento y valores nutricionales mayores o iguales a las microalgas foráneas de uso común cultivadas en exteriores.

Este trabajo se realizó con el objeto de evaluar el potencial de una microalga nativa para ser utilizada como alimento vivo en maricultura mediante la comparación de algunos parámetros de crecimiento y valor nutricional frente a los de una microalga foránea similar de uso común. Específicamente se determinó el efecto de factores como la temperatura y el medio de cultivo sobre el crecimiento algal y producción de biomasa en diferentes volúmenes de cultivo así como su contenido nutricional.



## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de fitoplancton fueron colectadas en la Bahía de Taganga la cual se encuentra ubicada en la ciudad de Santa Marta, Colombia (long. 74°13' W, lat.11°18' N) (Figura 1). Esta zona se caracteriza por tener dos épocas lluviosas, una que va desde mayo hasta junio, extendiéndose hasta agosto, y la otra que se inicia a principios de septiembre y termina a principios de diciembre junto con los vientos alisios. La estación seca se da desde finales de diciembre hasta términos de abril, en esta época esta zona es afecta por vientos fuertes que vienen del noreste provocando que las aguas de los niveles subsuperficiales sean llevadas hasta la superficie desde profundidades generalmente menores, produciéndose así un aporte de nutrientes a las aguas superficiales (surgencia), haciendo que la temperatura baje hasta 22-21°C; durante esta época del año es típico encontrar salinidades superiores a 36.5 (Bula, 1977; Salzwedel & Muller, 1983 y Ramírez, 1983). Normalmente las lecturas de disco sechi varían de 16-18 m, pero en época lluviosa, cuando el agua se encuentra un poco turbia, puede mostrar valores de 6-10 m. En general, esta Bahía se caracteriza por presentar valores de temperatura y salinidad constantes a lo largo de todo el año (Bula, 1977).



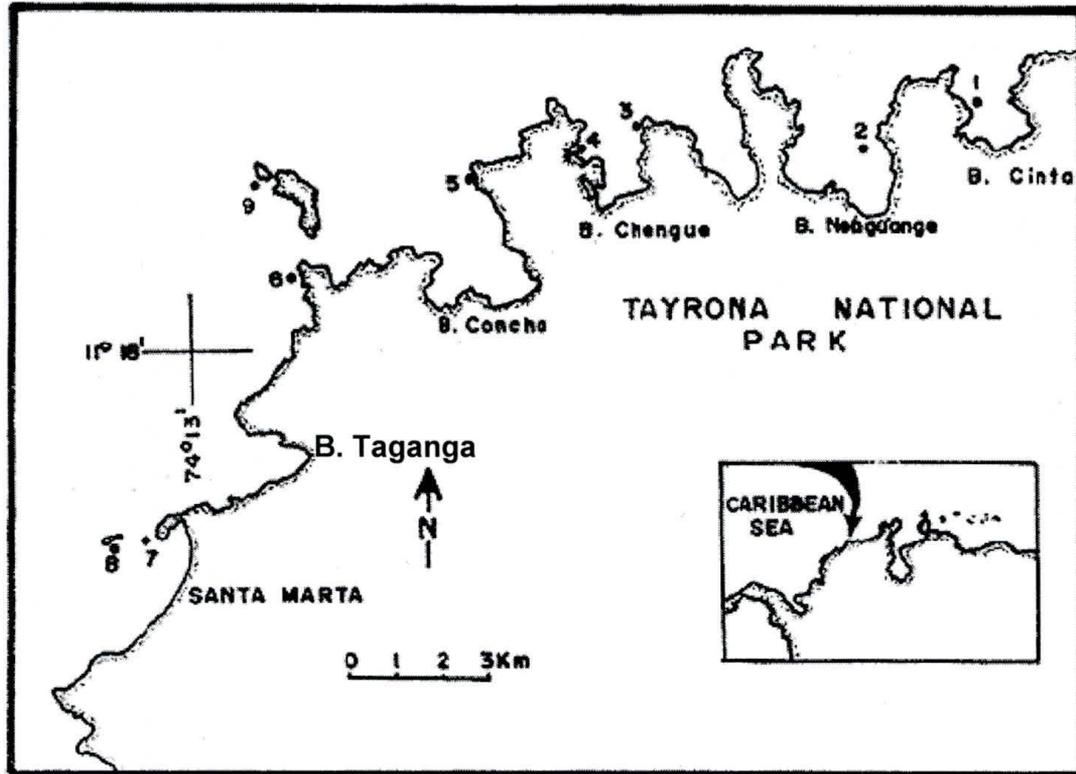


Figura 1. Ubicación geográfica de la Bahía de Taganga

## 2.2 TOMA DE MUESTRAS Y PARÁMETROS AMBIENTALES

La recolecta de las muestras de fitoplancton se realizó el 24 de marzo de 2004 entre las 2:00 y 4:00 pm, haciendo 4 arrastres subsuperficiales circulares (1 m) de 15 minutos, con una velocidad de 4 nudos y una malla de fitoplancton de 56  $\mu\text{m}$ . Las muestras se recolectaron en recipientes plásticos de 500 mL. Las condiciones ambientales de la bahía al momento del muestreo fueron: intensidad lumínica de 320 foot candles, viento con dirección noreste, corriente con dirección norte, altura de ola de 50 cm, agua con salinidad de 36, 26°C y 13 m de visibilidad con disco sechi.



## 2.3 AISLAMIENTO DE MICROALGAS

Una vez en el laboratorio, las muestras de fitoplancton fueron filtradas sucesivamente con tamices de 10 y 5  $\mu\text{m}$ , con el fin de eliminar el material particulado de mayor tamaño y dejar las microalgas menores de 10  $\mu\text{m}$ . Este filtrado fue inoculado en frascos de vidrio de 500 mL con medio de cultivo F/2 (Guillard, 1975; Anexo, Tabla 13), para propiciar el crecimiento de microalgas. Las muestras se mantuvieron en un estante por ocho días a una temperatura de  $24 \pm 0.5$  °C, salinidad de 35, aireación e iluminación artificial ( $45 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y luego se pasaron a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C (Figura 2). Semanalmente, durante dos meses, se identificaron las especies bajo el microscopio y se trataron de aislar mediante 2 métodos: 1) pipeteo capilar: mediante pipetas Pasteur modificadas en capilar se tomaron las células que se querían aislar del cultivo inicial bajo el microscopio invertido y se transfirieron a viales de 5 mL con medio de cultivo f/2 + silicatos (figura 3a). Las transferencias se llevaron a cabo en una atmósfera estéril con mechero de gas y se inoculaban 5 viales por cada microalga que se quería aislar. 2) diluciones seriadas: se transfirió por triplicado 1 mL del fondo y sobrenadante del cultivo inicial a tubos de ensayo con tapa rosca que contenían medio de cultivo esterilizado (15 mL) y se diluyó seriadamente en 4 tubos más tomando como inóculo 0.1 mL. (Figura 3b). Finalmente, de cada tubo de microalgas aislada por los dos métodos se tomaron gotas con una asa metálica previamente esterilizada y se sembraron en 5 cajas Petri con medio sólido (f/2 Guillard +agar) para obtener colonias separadas de cada una de las microalgas aisladas.

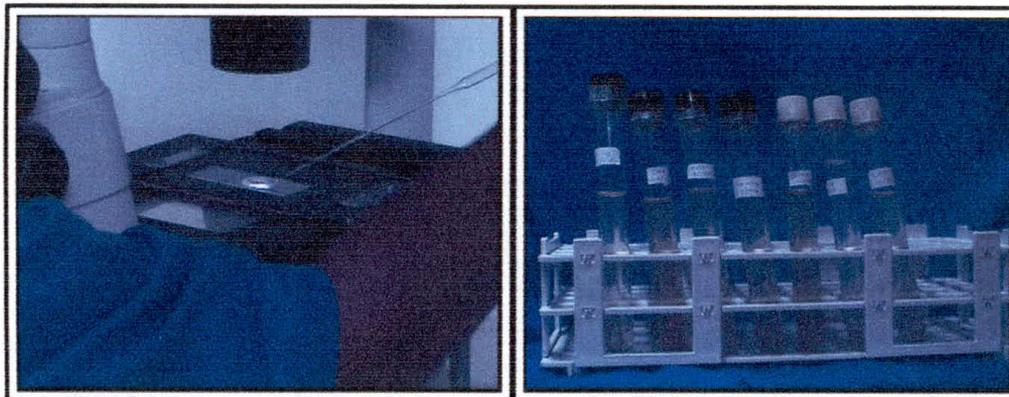
Los viales, placas de Petri y tubos de ensayo se mantuvieron a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C y se revisaron cada tercer día para verificar crecimiento microalgal. Con el fin de evitar la contaminación por agentes biológicos en los medios de cultivo, y en los cultivos microalgales todo el material utilizado se lavó con jabón quirúrgico Lavoderm de laboratorios Jerco, luego se les agregó ácido muriático al 5% para el caso de la vidriería y



posteriormente se colocaron a esterilizar mediante una estufa a 120 °C por 2 horas.



Figura 2. Cultivos iniciales de fitoplancton tomados de la bahía de Taganga e inoculados en medio de cultivo F/2 de Guillard + silicatos



a

b

Figura 3. Métodos de aislamiento utilizados para la obtención de las microalgas: a) pipeteo capilar b) diluciones seriadas.

## 2.4 EXPERIMENTOS DE CULTIVO

Para obtener los inóculos de la microalga nativa se procedió a tomar con una asa metálica las colonias con mejor color que crecieron en las cajas de Petri y se transfirieron a un tubo de ensayo con medio de cultivo f/2 + silicatos, luego se fue aumentando los volúmenes de cultivo de acuerdo a las necesidades de cada uno de los experimentos que se realizaron: 1) Cultivo de la especie nativa en volúmenes de 15 mL, en donde se evaluó la densidad celular durante 4 días. 2) Cultivo de la especie nativa y foránea en volúmenes de 200 mL, en donde se evaluó la densidad celular y crecimiento de biomasa de las dos especies durante 10 días y 3) Cultivo de la especie nativa en volúmenes de 1000 mL en donde se evaluó la densidad celular de la especie nativa durante 4 días.

Para evaluar el efecto de la temperatura y/o del medio de cultivo, sobre el crecimiento y producción de biomasa de la microalga nativa aislada y/o de una especie foránea se probaron por triplicado para cada especie 3 medios de cultivo: 1) extracto de humus (H), 2) fertilizante comercial triple 15 (T15) y 3) f/2 de Guillard (F/2) y 2 temperaturas diferentes: 1) temperatura a la cual se cultivan las microalgas foráneas ( $24 \pm 0.5$  °C) y 2) temperatura ambiental ( $28 \pm 1$  °C).

Todos los experimentos se mantuvieron en condiciones constantes de iluminación artificial ( $45 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) aireación, salinidad de 35 y cantidad de nitrógeno total ( $75 \text{ mg L}^{-1}$ ). El volumen perdido en cada frasco de cultivo por efectos del muestreo y evaporación fue reemplazado diariamente con agua destilada y esterilizada.

Las soluciones madre utilizadas para elaborar los medios de cultivo fueron preparadas con agua destilada y posteriormente esterilizadas en autoclave a  $121$  °C y 15 PSI de presión durante 15 minutos. Los medios de cultivo a base de humus y triple 15 se prepararon a una concentración de  $190 \text{ g L}^{-1}$  y  $500 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Luego de preparados se sometieron a un filtrado a través de filtros de fibra de vidrio (diámetro de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ ) hasta obtener soluciones incoloras que posteriormente se esterilizaron. La composición del

humus y del triple 15 empleados se especifica en anexo, tabla 14 y 15. Los inóculos utilizados procedían de un mismo cultivo algal y el volumen, en cada uno de los experimentos representaba el 10% del volumen del medio de cultivo a evaluar.

#### 2.4.1 Estimación de la densidad Celular:

La densidad celular en los tres experimentos se determinó diariamente a partir de muestras de aproximadamente 1 mL colectadas de cada réplica del cultivo. Cada muestra fue colocada sobre una placa Neubauer de 0.1 mm de profundidad (Figura 4) y contada por duplicado bajo un microscopio invertido. Para el caso de muestras demasiado concentradas se hicieron diluciones de 1:5. La densidad de células ( $D$ : cel mL<sup>-1</sup>) se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$D = C \times FD \times 10 \times 1000$$

Dónde:

C = Numero de células contadas

FD = factor de dilución

10 = factor de multiplicación debido a la profundidad del hematocitómetro

1000= factor de conversión a mL

FD=  $V_f / V_i$  donde:

$V_f$  = volumen final de la muestra diluida en mL

$V_i$  = volumen inicial de la muestra en mL

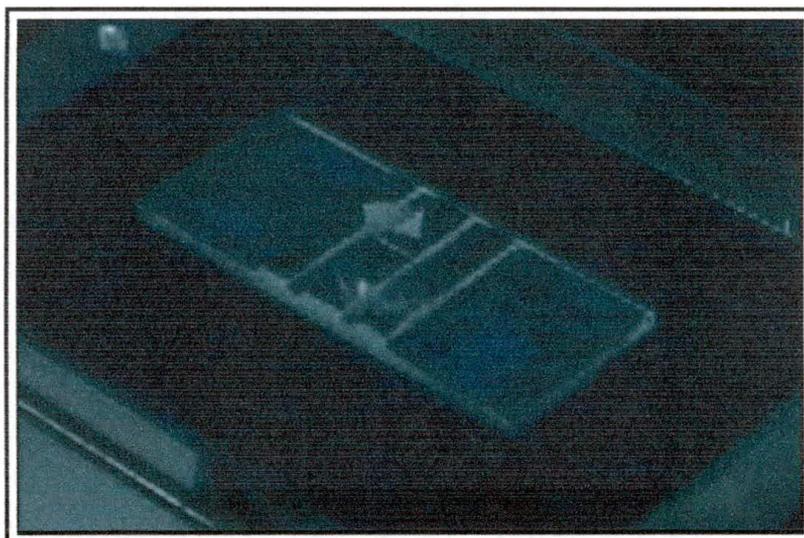


Figura 4. Cámara Neubauer o hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad utilizada para determinar la densidad celular de las microalgas.

#### 2.4.2 Estimación de la Biomasa:

La biomasa seca (BS) de las microalgas fue determinada siguiendo la metodología de Strickland & Parsons (1972), tomando 20 mL de muestra la cual fue filtrada mediante una bomba de vacío sobre un filtro de fibra de vidrio (diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) previamente lavado con agua destilada, calcinado a 450  $^{\circ}\text{C}$  x 3 horas y pesado (Figura 5). Los filtros con las muestras fueron lavados con formiato de amonio (30%) con el fin de eliminar las sales. Posteriormente se colocaron en una estufa a 70 $^{\circ}\text{C}$  por 48 horas y se pesaron. La biomasa seca se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{BS (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{peso seco del filtro + microalga}) - (\text{peso seco del filtro})}{\text{Volumen de muestra}}$$

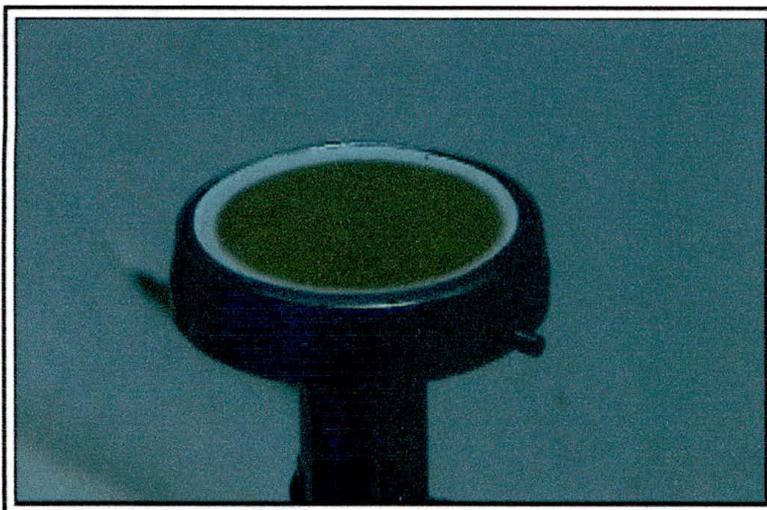


Figura 5 Microalga filtrada por medio de una bomba de vacío y sobre un filtro de fibra de vidrio de 0.45  $\mu\text{m}$ .

## 2.5 DETERMINACIÓN DEL VALOR NUTRICIONAL DE LAS MICROALGAS

El valor nutricional de la microalgas se determinó con base en su composición bioquímica. Para ello se realizó un cultivo de ambas especies en botellones plásticos transparentes de 3 L, por triplicado. Al 4 día de cultivo (fase exponencial), se colectaron 9 muestras de 20 mL de cada botellón, 3 para determinar el contenido de materia orgánica, 3 para proteínas y 3 para lípidos. Cada muestra fue filtrada sobre un filtro de fibra de vidrio (0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro) empleando una bomba de vacío.

### 2.5.1 Contenido de materia orgánica:

El contenido de materia orgánica se determinó gravimétricamente mediante la metodología de Strickland & Parson (1972). Las muestras de agua fueron tratadas de igual forma a lo estipulado en el análisis de biomasa seca pero, adicionalmente, a estas muestras se les determinó el peso ceniza colocándolos

de materia orgánica se determinó teniendo en cuenta las siguientes ecuaciones:

$$\text{PESO CENIZAS: (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{peso de cenizas + filtro}) - (\text{peso seco del filtro})}{\text{Volumen de cultivo}}$$

$$\text{PESO SECO ORGANICO: (mg mL}^{-1}\text{)} = (\text{biomasa seca}) - (\text{peso de ceniza})$$

### 2.5.2 Determinación de Proteínas:

La cuantificación de proteína total (CPT) se realizó por el método de Lowry *et al.*, (1951) el cual se basa en la determinación espectrofotométrica de la intensidad del color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteau después de un tratamiento con solución alcalina de cobre (Figura 6a). La curva estándar se preparó con sero-albúmina fracción V (BSA) a concentraciones entre 0 -124  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y una longitud de onda de 750 nm. La concentración de proteínas totales en las muestras de microalgas se calculo a partir de la ecuación:

$$\text{CPT (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 2.6303 + 434.92 \times \text{Absorbancia}$$

### 2.5.3 Determinación de Lípidos:

Para determinar la concentración de lípidos totales (CLT) se utilizó una modificación del protocolo de Dubinsky (1979) y del procedimiento de Bligh & Dyer (1959) descrito por Holland (1971) en el cual las células microalgales se suspenden en metanol:cloroformo 2:1 (v : v). La cuantificación se hizo por espectrofotometría con un longitud de onda de 590 nm (figura 6b) utilizando como reactivo estándar tripalmitina en concentraciones entre 0 -124  $\text{mg mL}^{-1}$ , la concentración de lípidos totales en las muestras de microalgas se calculo a partir de la ecuación determinada:

$$\text{CLT (mg mL}^{-1}\text{)} = 0.8704 \text{ Ln Absorbancia} + 1.317$$

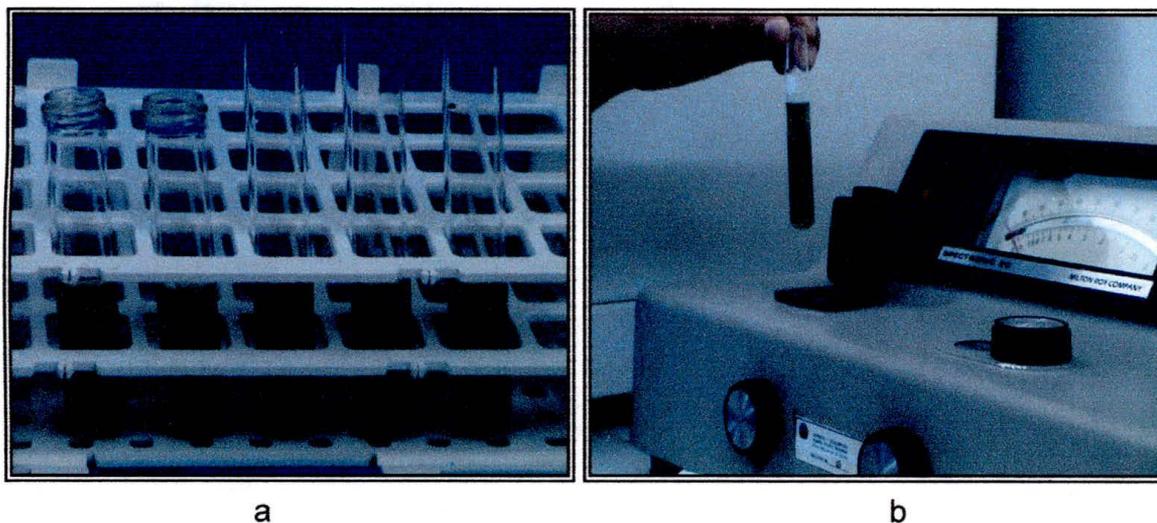


Figura 6. Determinación de proteínas. a) Extracción y b) cuantificación.

#### 2.5.4 Determinación de Carbohidratos:

La concentración de carbohidratos totales (CCT) se calculó de la diferencia entre el contenido orgánico de la muestra y la sumatoria de proteínas y lípidos (AOAC, 1990) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{CCT (mg mL}^{-1}\text{)} = \text{Peso orgánico (mg mL}^{-1}\text{)} - \text{CPT (mg mL}^{-1}\text{)} + \text{CLT (mg mL}^{-1}\text{)}$$

#### 2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis de regresión lineal y no lineal en cada tratamiento con el fin de establecer la relación que mejor explicara el cambio en la densidad y biomasa de los cultivos microalgales a lo largo del tiempo, con base en menores valores de  $p$ , mayores coeficientes de determinación ( $r^2$ ) y ajuste de los residuos a los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Las

pendientes de las regresiones lineales en los experimentos 1 y 3 fueron comparadas mediante el análisis de Comparison of regresión lines.

En el experimento 2 se hizo un análisis de varianza de efectos principales con los datos ranqueados (puesto que no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad), para establecer la influencia de la especie, del medio de cultivo y de la temperatura sobre la densidad y biomasa microalgal. Con estas dos últimas variables se realizaron análisis de covarianza, para establecer la existencia de diferencias significativas en cuanto a la densidad y biomasa microalgal de cada especie, entre los medios de cultivo y temperaturas probados.

Finalmente, se realizaron ANOVAS a una vía para comparar los contenidos de materia orgánica, proteínas, carbohidratos y lípidos de las cepas nativa y foránea verificando el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico Statgraphics y para las decisiones de significancia se empleó un  $\alpha$  de 0.05.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 AISLAMIENTO DE MICROALGAS

##### 3.1.1 Cepas aisladas

En el cultivo inicial de fitoplancton crecieron 7 especies de diatomeas (Tabla 1) de las cuales se lograron aislar 4, 3 por la técnica de diluciones seriadas, *Amphora sp*, *Cylindrotheca closterium* y *Chaetoceros sp* (Figura 7), y una con la técnica de pipeteo capilar, *Skeletonema sp* (Figura 7d).

Tabla 1. Ubicación taxonómica de las especies de microalgas encontradas en la Bahía de Taganga.

Clase	Orden	Genero	Especie
Bacillariophyceae	Pennales	<i>Amphora</i>	<i>Amphora sp</i>
		<i>Asterionella</i>	<i>Asterionella japonica</i>
		<i>Cylindrotheca</i>	<i>Cylindrotheca closterium</i>
		<i>Pseudonitzschia</i>	<i>Pseudonitzschia sp</i>
		<i>Synedra</i>	<i>Synedra sp</i>
	Centrales	<i>Chaetoceros</i>	<i>Chaetoceros sp</i>
		<i>Skeletonema</i>	<i>Skeletonema sp</i>

##### 3.1.2 Descripción de las especies aisladas

###### 3.1.2.1. *Amphora sp*

Diatomea generalmente de hábitos bentónicos en cultivo. Células individuales de 28  $\mu\text{m}$  de largo y 14  $\mu\text{m}$  de ancho, con frústulos finos elípticos-lanceolados,

moderadamente angostos con extremos rostrados. Rafe recto y valvas generalmente lunadas con puntas agudas, línea media cerrándose hacia el margen ventral. Crecen muy bien en medio líquido y sólido formando en este último agregados.

#### **3.1.2.2. *Cylindrotheca closterium***

Diatomea generalmente de hábitos bentónicos en cultivo. Células solitarias alargadas de 50-160  $\mu\text{m}$  de largo y 5  $\mu\text{m}$  de ancho, este tamaño le permitió mantenerse siempre en los cultivos iniciales después de ser tamizados, células con dos cloroplastos. Normalmente se encuentra dentro del grupo de la birrafídeas, puesto que disponen de rafe en las dos valvas. Crecen muy bien en medio líquido y sólido y al igual que *Amphora sp* forma agregados.

#### **3.1.2.3. *Chaetoceros sp***

Diatomea generalmente de hábitos planctónicos en cultivo. Las células de esta microalga son generalmente cuadradas o rectangulares con un solo cloroplasto, su tamaño varía entre tamaño aproximadamente de 4 y 7  $\mu\text{m}$ , con 4 setas que surgen de las esquinas de las valvas delgadas y rectas, en un ángulo aproximado de 45° con respecto al eje pervalvar. En medio sólido tiende a formar colonias circulares de color café a marrón y las células pierden sus setas.

#### **3.1.2.4. *Skeletonema sp***

Forma colonias filamentosas en forma de cadenas celulares rectas. Las células de esta microalga son de color café y miden aproximadamente 5-8  $\mu\text{m}$ , tienen valvas convexas unidas entre si por medio de largos procesos silíceos insertos en el margen valvar. Generalmente no crecen en medio sólido, pero si en medio líquido.

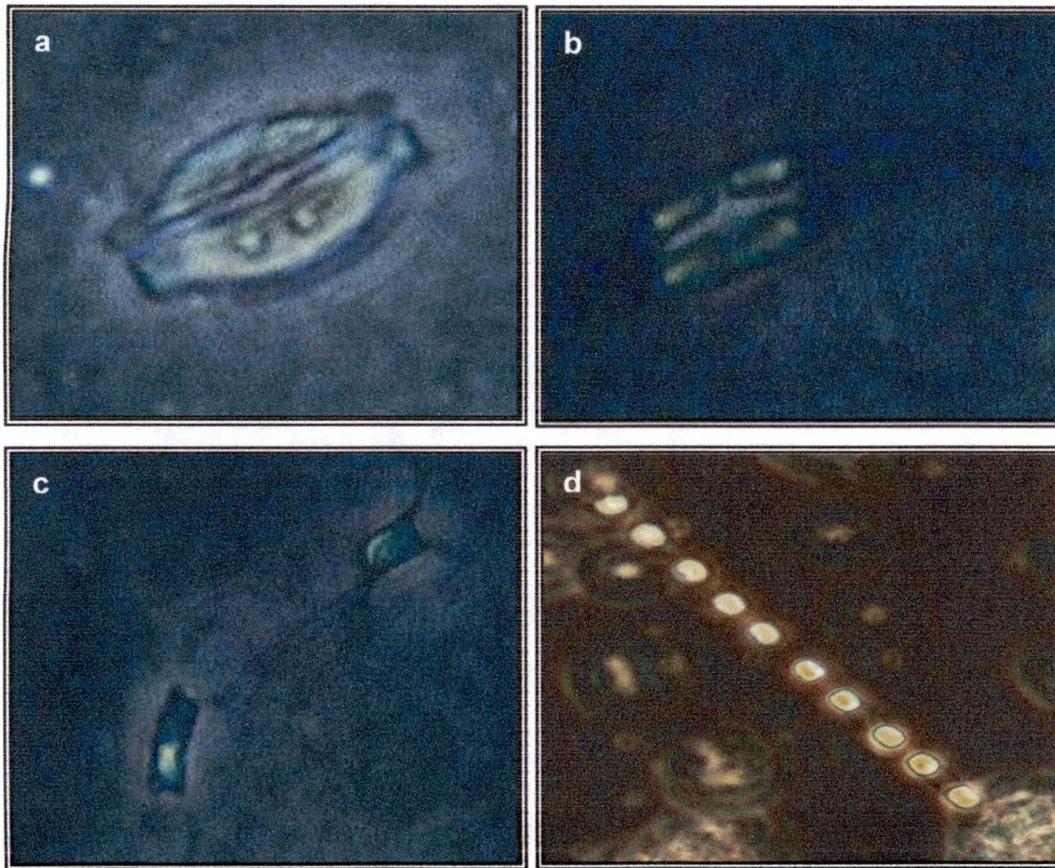


Figura 7. Diatomeas aisladas de la bahía de Taganga. a) *Amphora sp*; b) *Cylindrotheca closterium*; c) *Chaetoceros sp* y d) *Skeletonema sp*.

### 3.2 EXPERIMENTOS DE CULTIVO

Como especie nativa se seleccionó a *Chaetoceros sp* y como foránea a la especie *Chaetoceros calcitrans* para llevar a cabo los experimentos de cultivo.

#### 3.2.1 Cultivo de *Chaetoceros sp* en volúmenes de 15mL.

El incremento en la concentración celular de *Chaetoceros sp* en los primeros 4 días de cultivo se ajustaron a regresiones lineales en todo los tratamientos de temperatura y medio de cultivo probados (Tabla 2).

Tabla 2. *Chaetoceros sp.* Ecuaciones de primer orden que muestran el mejor ajuste entre los valores de densidad celular (Y) y tiempo de cultivo (X) en volúmenes de 15 mL.

Temperatura	Medio	Ecuación	r <sup>2</sup>	p
24 °C	F/2	Y = 245467X + 134467	0.9777	0.0000
	T 15	Y = 73683X + 106867	0.7332	0.0000
	H	Y = 176673X + 124847	0.9332	0.0000
28°C	F/2	Y = 206177X + 144860	0.9826	0.0000
	T 15	Y = 87703X + 156473	0.8837	0.0000
	H	Y = 1088000+ 126267	0.9849	0.0000

Las mayores densidades celulares se obtuvieron con el medio de cultivo F/2 en 24 °C y 28° C obteniéndose en 4 días valores de  $1,19 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y  $9 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 8). Con el medio triple 15 se registraron las mas bajas concentraciones celulares con valores de  $5,1 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> y  $4,98 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> a temperaturas de 24 y 28°C respectivamente.

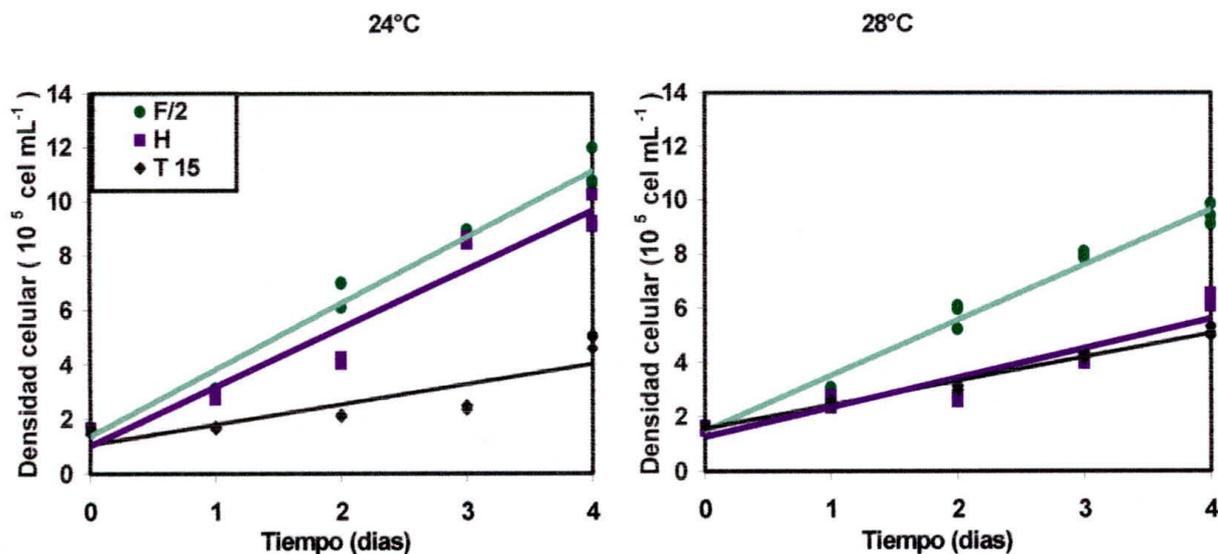


Figura 8. *Chaetoceros sp.* Variación temporal de la concentración celular en los tres medios de cultivo en volúmenes de 15 mL.

Las comparaciones entre las pendientes (Tabla 3) mostraron que a 24°C hay diferencias significativas entre los medios de cultivo F/2-triple 15 y entre humus-triple 15 y homogeneidad entre F/2-humus. En 28°C se presentó homogeneidad entre los medios humus-triple 15 y diferencias significativas entre F/2-humus y entre F/2-triple 15. Las pendientes de las curvas de los crecimientos algales de *Chaetoceros sp* a 28°C mantenidos en los medios F/2 y humus fue significativamente menor que las alcanzadas a 24°C en los mismos medios. En cambio, el crecimiento celular de esta diatomea en el fertilizante agrícola triple 15 fue estadísticamente similar en las dos temperaturas.

Tabla 3. *Chaetoceros sp.* Comparaciones entre las pendientes de las regresiones ajustadas a cada uno de los tratamientos de medio de cultivo y temperaturas probados.

Comparaciones de interés	Fuente	Suma de cuadrados	GL	Varianza	F	p
24, F/2 – 24, H	pendiente	1.3765E10	1	1.3765E10	2.55	0.1226
24, F/2 – 24, T15	pendiente	4.4264E11	1	4.4264E11	114.48	0.0000
24, T15 – 24, H	pendiente	3.0029E11	1	3.0029E11	49.24	0.0000
28, F/2 – 28, H	pendiente	1.4223E11	1	1.4223E11	53.34	0.0000
28, F/2 – 28, T15	pendiente	2.1053E11	1	2.1053E11	209.58	0.0000
28, T15 – 28, H	pendiente	6.67600E9	1	6.67600E9	3.45	0.0745
24, F/2 – 28, F/2	pendiente	2.3155E10	1	2.3155E10	9.43	0.0050
24, H – 28, H	pendiente	1.6972E11	1	1.6972E11	30.22	0.0000
24, T15 – 28, T15	pendiente	2.94840E9	1	2.94840E9	1.22	0.2893

### 3.2.2 Cultivo de *Chaetoceros sp* y *Chaetoceros calcitrans* en volúmenes de 200 mL

La densidad y biomasa celular de todos los tratamientos de cultivo probados con *Chaetoceros sp.* y *C. calcitrans* aumentaron exponencialmente con el tiempo en los primeros 7 días de cultivo (Figuras 9 y 10 ), posteriormente entre

los días 2 y 7 del cultivo se presentó una fase estacionaria en la cual no ocurrieron cambios en la densidad ni biomasa microalgal, la cual abarcó un período desde 1 hasta 3 días. Finalmente, ocurrió una fase de muerte (aproximadamente entre los días 6 y 8 de cultivo), en la cual la concentración y biomasa algal disminuyeron en un lapso de entre 1 y 3 días. Las ecuaciones que mejor se ajustaron a este comportamiento en los diferentes tratamientos, se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. *Chaetoceros sp* y *Chaetoceros calcitrans*. Ecuaciones de segundo orden que muestran el mejor ajuste entre los valores de densidad celular (Y) y tiempo de cultivo (X).

Especie	Temperatura	Medio	Ecuación	r <sup>2</sup>	p
<i>Chaetoceros sp</i>	24°C	F/2	Y= -1.79830X <sup>2</sup> +24.0443X+11.1911	0.9678	0.0000
		T 15	Y= -1.91230X <sup>2</sup> +22.8653X+7.11159	0.5800	0.0000
		H	Y= -1.07880X <sup>2</sup> +10.4705X+12.3928	0.4513	0.0001
	28°C	F/2	Y= -3.05594X <sup>2</sup> +30.0200X+5.64569	0.8242	0.0000
		T 15	Y= -2.90462X <sup>2</sup> +29.0296X+5.57459	0.7231	0.0000
		H	Y= -1.24117X <sup>2</sup> +14.5010X+7.13403	0.4650	0.0001
<i>C. calcitrans</i>	24°C	F/2	Y= -2.56506X <sup>2</sup> +29.0086X+10.0694	0.8036	0.0000
		T 15	Y= -2.90462X <sup>2</sup> +29.0296X+5.57459	0.7404	0.0000
		H	Y= -1.24117X <sup>2</sup> +14.5010X+7.13403	0.4650	0.0001
	28°C	F/2	Y= -1.05350X <sup>2</sup> +13.4333X+8.38095	0.9770	0.0000
		T 15	Y= -0.98065X <sup>2</sup> +11.8328X+7.65476	0.6846	0.0002
		H	Y= -0.35416X <sup>2</sup> +4.01310X+7.64280	0.3594	0.0035

*Chaetoceros sp* cultivado con el medio F/2 a 24 °C presentó las mayores densidades y biomasa en el día 7 de experimentación ( 9 x 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> y 3.81 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figura 9). En el mismo medio, pero a una temperatura de 28°C, presentó valores máximos de densidad (4.9 x 10<sup>6</sup> cel mL) y biomasa (2.38 mg mL<sup>-1</sup>) en el día 6 de experimentación. En el medio triple 15, la fase exponencial llegó hasta el quinto día con densidades de 6.1 x 10<sup>6</sup> y 3 x 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> y biomasa de 2.59 y 2.21 mg mL<sup>-1</sup>, en condiciones de 24 y 28 °C, respectivamente. Para el caso de los cultivos en humus a 24 °C, la mayor

densidad celular ( $2.2 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ ) y biomasa algal ( $1.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ) se presentaron en el segundo día de experimento. En el mismo medio y a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$  las mayores concentraciones y biomásas algales se obtuvieron en el día 3 de cultivo con valores de  $1.9 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  y  $0.82 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente.

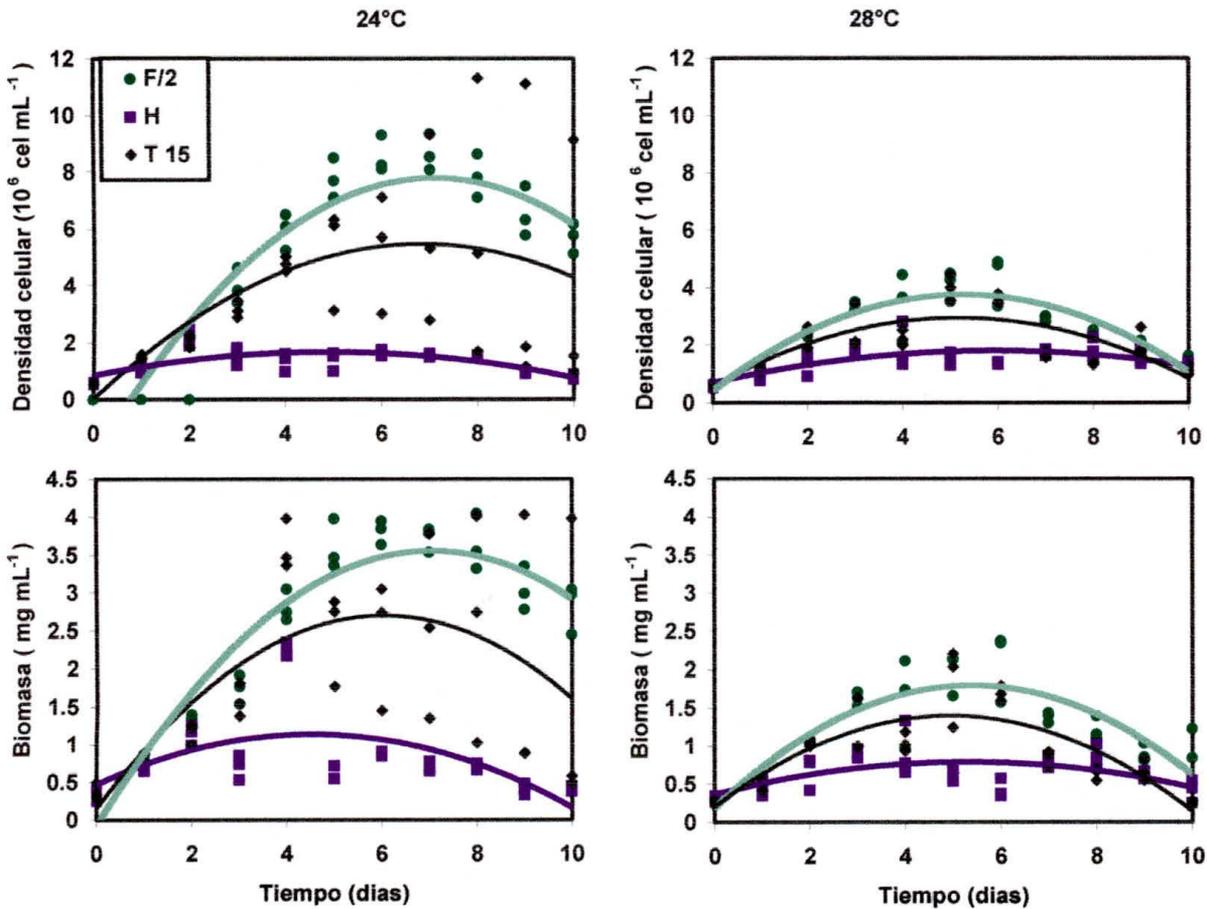


Figura 9. *Chaetoceros sp.* Variación temporal de la densidad celular y biomasa en los tres medios de cultivo y temperaturas evaluadas en volúmenes de 200 mL.

El crecimiento de *Chaetoceros calcitrans* mantenida en el medio F/2 a una temperatura de  $24^\circ\text{C}$  mostró la fase exponencial en los 5 primeros días de cultivo, alcanzando una densidad máxima de  $8,8 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  y una biomasa de  $3.58 \text{ mg mL}^{-1}$  (Figura 10). Con el mismo medio pero a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$  se presentaron valores máximos de densidad ( $6.1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ ) y

la fase exponencial llegó hasta el sexto día de cultivo con densidades de  $6.7 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  a  $24^\circ\text{C}$  y  $4.9 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  a  $28^\circ\text{C}$  así como biomاسas de 2.85 y  $1.68 \text{ mg mL}^{-1}$  en las dos temperaturas mencionadas. En el cultivo en humus a  $24^\circ\text{C}$  las mayores concentraciones celulares y biomاسas se presentaron en el segundo día de cultivo ( $1.9 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  y  $1.24 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivamente), mientras que a  $28^\circ\text{C}$  los mayores números de células ( $1.8 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ ) y peso seco ( $0.23 \text{ mg mL}^{-1}$ ) se obtuvieron en el día 3 de cultivo.

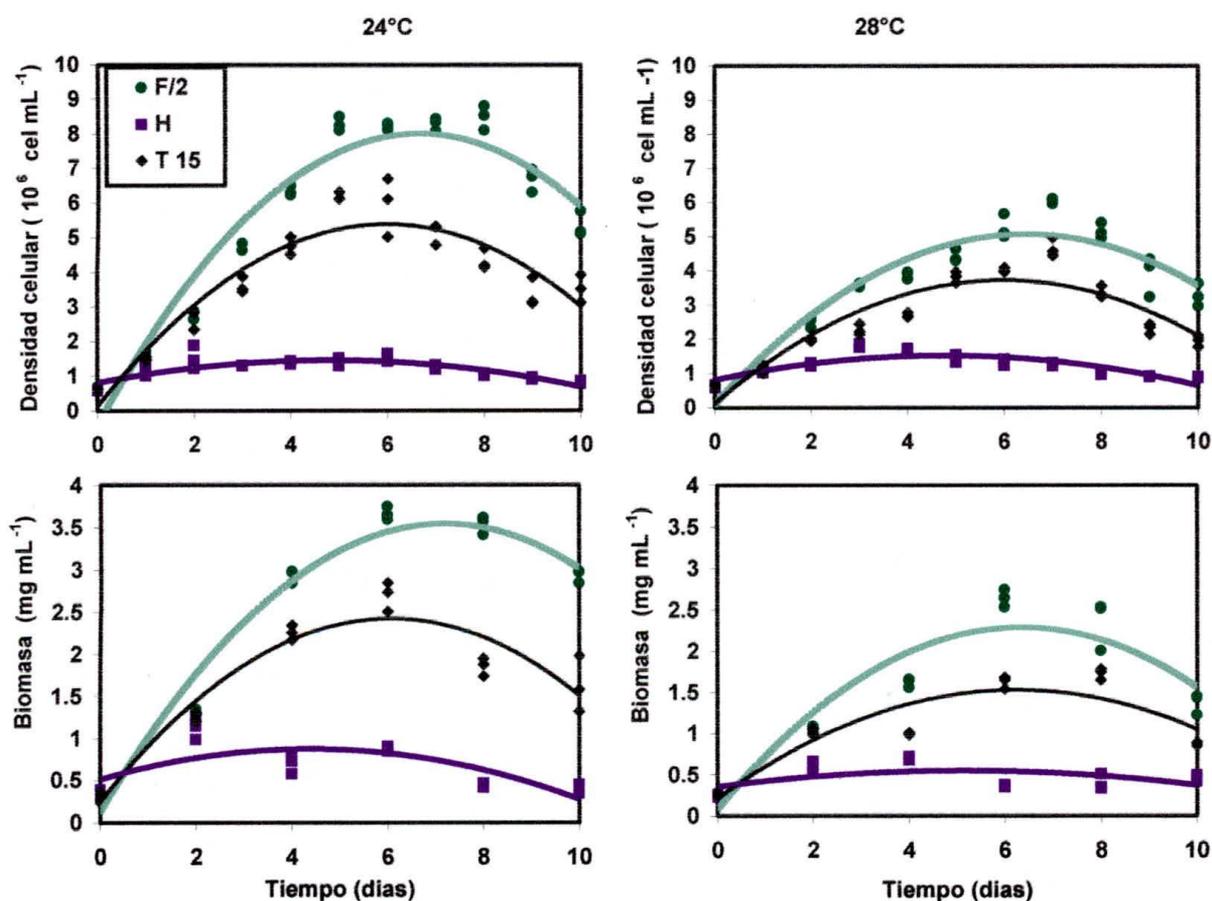


Figura 10. *Chaetoceros calcitrans*. Variación temporal de la densidad celular y biomasa en los tres medios de cultivo y temperaturas evaluadas en volúmenes de 200 mL.

El análisis de efectos principales reveló que la densidad y biomasa de los cultivos microalgales estuvieron influenciadas por la temperatura, el medio y el tiempo del cultivo, mientras que por la especie microalgal no (Tabla 5).

Tabla 5. *Chaetoceros sp* y *C. calcitrans*. Análisis de varianza para la determinación de efectos principales que influenciaron la A) densidad celular y B) biomasa

A					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	p
Especie	103040.0	1	10304.0	1.51	0.2201
Medio	1.78609E6	2	893045.0	30.77	0.0000
temperatura	1.54591	1	77295.6	11.32	0.0000
Día	580900	1	580900.0	85.06	0.0000
Error	2.6564	389	6828.95		

B					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	p
Especie	177.903	1	177.903	0.04	0.8419
Medio	708124.0	2	354062.0	79.29	0.0000
temperatura	147533.0	1	147533.0	33.04	0.0000
Día	191930.0	1	191930.0	42.98	0.0000
Error	1.33963E6	389	4465.43		

Las curvas de crecimiento de densidad y biomasa microalgal de ambas especies obtenidas con el medio F/2 se situaron por encima del medio T15, y las obtenidas con el medio a base de humus fueron siempre las menores. Las pruebas de comparación múltiple mostraron que no existen diferencias significativas entre la densidad y biomasa en los medios F/2 y T15 para ninguna de las especies dentro de las dos temperaturas probadas (Tablas 6 y 7). Así mismo, se establecieron diferencias estadísticas entre los parámetros de crecimiento de estos dos medios y el de humus en las dos especies exceptuando los tratamientos de alta temperatura suministrados a cada especie en donde estos dos medios produjeron resultados estadísticamente similares.

Aunque la densidad y biomasa de ambas especies fue aparentemente superior a temperatura baja en comparación a la alta, el análisis de varianza reveló que estas diferencias son significativas solamente para *Chaetoceros sp* cultivadas con los medios F/2 y T15.

Tabla 6. *Chaetoceros sp.* Prueba de comparación múltiple para definir las diferencias entre los tratamientos de medios de cultivo y temperaturas sobre A) el crecimiento celular y B) biomasa.

A				
Tratamiento	n	Media	LS sigma	Grupos homogéneos
H, 24	33	93.2424	11.4229	X
H, 28	33	97.6667	11.4229	X
T 15, 28	33	126.283	11.4229	XX
F/2, 28	33	167.985	11.4229	XX
T15, 24	33	197.348	11.4229	XX
F/2, 24	33	235.103	11.4229	X

B				
Med tem	n	Media	LS sigma	Grupos homogéneos
H, 24	33	93.2424	11.4229	X
H, 28	33	97.6667	11.4229	X
T 15, 28	33	126.283	11.4229	XX
F/2, 28	33	167.985	11.4229	XX
T15, 24	33	197.348	11.4229	XX
F/2, 24	33	235.103	11.4229	X

Tabla 7. *Chaetoceros Calcitrans*. Prueba de comparación múltiple para definir las diferencias entre los tratamientos de medios de cultivo y temperaturas sobre A) el crecimiento celular y B) biomasa.

A				
Med tem	n	Media	LS sigma	Grupos homogéneos
H, 24	33	90.7424	12.8996	X
H, 28	33	96.2476	12.8996	X
T 15, 28	33	213.348	12.8996	X
F/2, 28	33	244.545	12.8996	XX
T15, 24	33	261.818	12.8996	XX
F/2, 24	33	304.894	12.8996	X

B				
Med tem	n	Media	LS sigma	Grupos homogéneos
H, 24	33	58.1667	15.5018	X
H, 28	33	94.4444	15.5018	X
T 15, 28	33	161.667	15.5018	X
F/2, 28	33	187.861	15.5018	XX
T15, 24	33	196.861	15.5018	XX
F/2, 24	33	228.194	15.5018	X

### 3.2.3 Cultivo de *Chaetoceros sp* en volúmenes de 1000 mL

Desde el inicio del experimento las densidades celulares mostraron un crecimiento continuo hasta el día 4 de experimento (fase exponencial) ajustándose a regresiones lineales (Tabla 8), a excepción del cultivo con el medio humus en el que no se obtuvo un incremento en la densidad celular.

Tabla 8 .*Chaetoceros sp*. Ecuaciones de primer orden que muestran el mejor ajuste entre los valores de densidad celular (Y) y tiempo de cultivo (X).

Temperatura	Medio	Ecuación	r <sup>2</sup>	p
24°C	F/2	Y = 2.37 E <sup>6</sup> X + 91366	0.9686	0.0000
	T 15	Y = 1.88 E <sup>6</sup> X + 418300	0.9609	0.0000
28°C	F/2	Y = 1.82 E <sup>6</sup> X + 494200	0.9560	0.0000
	T 15	Y = 1.15 E <sup>6</sup> X + 726400	0.8492	0.0000

Al igual que en los dos experimentos anteriores las curvas de crecimiento dadas por el medio de cultivo F/2 y la temperatura de 24°C se presentan por encima de las obtenidas por el triple 15 con densidades máximas de 9 x 10<sup>6</sup>cel mL<sup>-1</sup> y 7 x 10<sup>6</sup>cel mL<sup>-1</sup> respectivamente mantenidas a 24°C y de 7 x 10<sup>6</sup>cel mL<sup>-1</sup> y 5 x 10<sup>6</sup>cel mL<sup>-1</sup> a 28° (Figura 11).

Los análisis de comparación de pendientes de las curvas de crecimiento celular mostraron diferencias estadísticas entre las dos temperaturas a diferencia del crecimiento celular en el medio de cultivo triple 15 que fue estadísticamente similar en 24 y 28°C ( tabla 8).

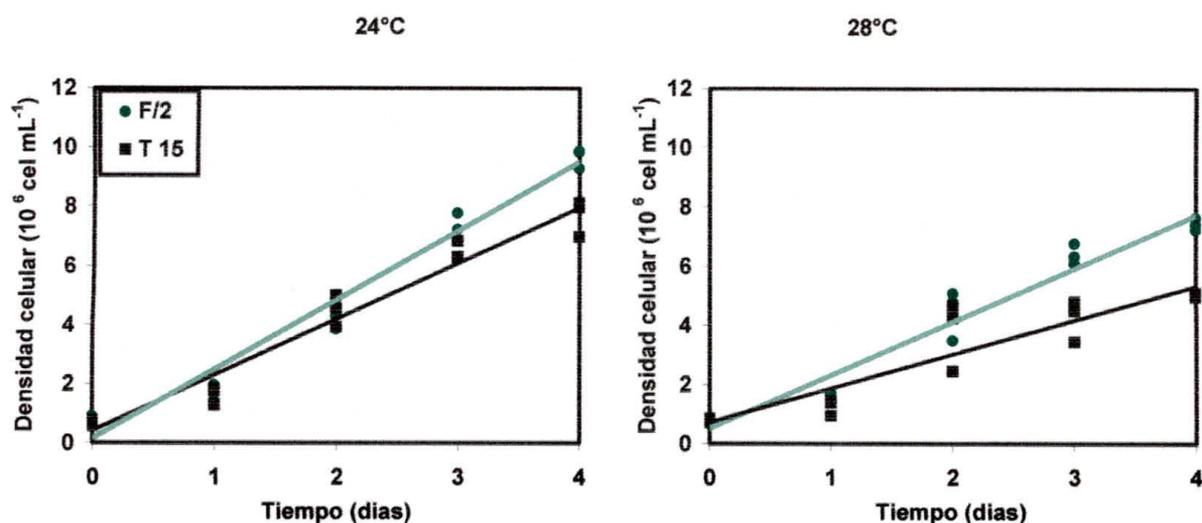


Figura 11. *Chaetoceros sp.* Variación temporal de la densidad celular en volúmenes de 1000 mL.

Tabla 9. *Chaetoceros sp.* Comparaciones entre las pendientes de las regresiones ajustadas a cada uno de los tratamientos de medio de cultivo y temperaturas probadas en volúmenes de 1000 mL.

Comparaciones de interés	Fuente	Suma de cuadrados	GL	Varianza	F	p
24, F/2 – 24, T15	Pendiente	3,151239E12	1	3,151239E12	9.30	0.0052
28, F/2 – 28, T15	Pendiente	6,7402E12	1	6.7402E12	15.04	0.0006
24, F/2 – 28, F/2	Pendiente	6.65128E12	1	6.65128E12	8.14	0.0068
24, T15 – 24, T15	Pendiente	2.84912E12	1	2.84912E12	2.19	0.0014

### 3.3 VALOR NUTRICIONAL DE LAS MICROALGAS

*Chaetoceros sp* presentó un contenido de proteínas y lípidos mayor que el de *Chaetoceros calcitrans*, mientras que ocurrió lo contrario con el contenido de materia orgánica y carbohidratos (Tabla 10); los anovas que se presentan en la tabla 11 permiten verificar que estas diferencias fueron estadísticamente significativas, exceptuando las encontradas en referencia al contenido de materia orgánica.

Tabla 10. Contenido de materia orgánica, proteínas, lípidos y carbohidratos de cultivos de las dos especies de *Chaetoceros*.

Especie	Materia orgánica (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
<i>Chaetoceros sp</i>	79.6	59	31	10
<i>C. calcitrans</i>	81	40.3	23	37

Tabla 11. *Chaetoceros sp* y *C. calcitrans*. Análisis de varianza sobre A) porcentaje de materia orgánica; B) proteínas; C) lípidos y D) carbohidratos .

A

Fuente	Suma de cuadrados	de GL	Cuadrado medio	F	p
Entre grupos	3.7291	1	3.7291	0.02	0.8926
Dentro de grupos	518.973	3	172.991		
Error	522.702				

B

Fuente	Suma de cuadrados	de GL	Cuadrado medio	F	p
Entre grupos	112.667	1	112.667	16.90	0.0147
Dentro de grupos	26.6667	4	6.66667		
Error	139.333				

C

Fuente	Suma de cuadrados	de GL	Cuadrado medio	F	p
Entre grupos	522.667	1	5.22.667	24.29	0.0073
Dentro de grupos	82.6667	4	20.6667		
Error	605.333				

D

Fuente	Suma de cuadrados	de GL	Cuadrado medio	F	p
Entre grupos	1120.67	1	11.20	49.08	0.0022
Dentro de grupos	91.3333	4	22.8333		
Error	1212.01				

#### 4. DISCUSIÓN

Los métodos que normalmente se emplean para el aislamiento de especies de microalgas, en general dependen del tamaño de la microalga, su motilidad, así como de su carácter filamentoso o unicelular (Buitrago, 1989). El método de aislamiento por diluciones seriadas es un método que se utiliza principalmente cuando, en el cultivo inicial, el crecimiento de las algas que se desean aislar supera el crecimiento de otras especies (Lemos *et al.*, 1988). Cuando una especie domina sobre las demás, se debe a su mayor supervivencia y/o tasa de reproducción, luego tiene mayor probabilidad de ser capturada en cada dilución y de incrementar su densidad celular. El aislamiento de las diatomeas *Amphora sp*, *Cylindrotheca closterium* y *Chaetoceros sp* fue posible mediante esta técnica, debido principalmente a que estas especies siempre fueron dominantes en los cultivos iniciales. *Cylindrotheca closterium* y *Amphora sp*, que se caracterizan por tener hábitos bentónicos (Vidal, 1995), predominaron en los precipitados de los cultivos iniciales si estos no se agitaban durante un tiempo. De otro lado, *Chaetoceros sp*, que presenta generalmente hábitos planctónicos (Vidal, 1995) gracias a su morfología que incluye la presencia de setas, fue la especie dominante en el sobrenadante de los cultivos. De esta forma, cuando se tomaron las muestras iniciales de precipitado y sobrenadante, para realizar las diluciones seriadas, las especies dominantes fueron las que se lograron aislar finalmente.

El hecho de que por la técnica de pipeteo capilar se pudiera aislar una sola diatomea, se debió principalmente, a que es una técnica que exige experiencia, y se utiliza para separar microalgas grandes (mayores de 10  $\mu\text{m}$ ). Resulta de gran dificultad capturar a través de un capilar una sola especie de una muestra compuesta por una diversidad de microorganismos sin que estos también sean succionados. Adicionalmente, cuando se logra tomar una célula y aislarla, el tiempo que requiere para producir una densidad detectable es muy largo y hay

un alto riesgo de que muera o se pierda. Aunque las células de *Skeletonema sp* miden aproximadamente 5 – 8  $\mu\text{m}$ , la especie aislada formaba cadenas, lo que en cierta medida posibilitó el aislamiento por esta técnica. En otros estudios se han logrado aislar diatomeas mediante las técnicas de rayado en placas de agar y diluciones sucesivas (Pereira, 1988). En este estudio la combinación de estos dos métodos permitió aislar a *Chaetoceros sp*, ya que cuando se siembran en medios sólidos tienden a formar colonias de color café a marrón por lo que fue fácil identificarlos y posteriormente mantenerlos aislados.

Las diatomeas *Amphora sp* y *Cylindrotheca closterium* aparte de ser bentónicas, suelen crecer muy bien en ambientes marinos y salobres (Vidal, 1995) lo que posiblemente favorecería su crecimiento en cultivos, sin embargo son especies que presentaron tamaños 7-10 veces mayores que los tamaños de especies como *Chaetoceros sp*. Esta especie al igual que *Skeletonema sp* aparte de tener tamaños aceptables para ser utilizadas en la acuicultura, son especies que se han utilizado para el alimento de larvas de moluscos y estadios larvarios de crustáceos de interés comercial (Rodhes & landers, 1972). Por estas razones, y teniendo en cuenta que en el cepario de la Universidad del Magdalena se cuenta con una especie de *Chaetoceros* foránea, se escogió a *Chaetoceros sp* para la realización de los experimentos planeados.

El crecimiento celular y la producción de biomasa de las dos especies de *Chaetoceros* estuvieron influenciados por el medio, temperatura y volumen de cultivo. Con respecto al medio de cultivo, los mayores valores se obtuvieron con F/2 en todos los volúmenes probados, seguido de los medios T 15 y H. Esto podría explicarse por varias razones: 1) El F/2 aparte de contener los macronutrientes esenciales para el crecimiento del fitoplancton (Nitrógeno y fósforo) contiene elementos menores (Mo, Cu, Zn, Fe, Co y Mn) considerados importantes en el crecimiento del fitoplancton porque pueden regular las disponibilidades de los macronutrientes (Menzel & Ryther, 1961). El hierro y magnesio por ejemplo son indispensables para la síntesis de pigmentos, cuando existe deficiencia de estos la concentración de clorofila *a* por célula se

reduce notablemente (Balech, & Ferrando, 1964). El cobre participa como los demás elementos trazas a nivel molecular, como cofactores de enzimas o bien como componentes estructurales de ellas, interviene también en la activación de la enzima aldolasa (Mcelroy, 1953). 2) La relación N:P inadecuada en los medios de cultivo diferentes al F/2. Redfield (1958) reporta que la relación ideal para el crecimiento del fitoplancton en agua marina es de 16:1, esta proporción regula o limita los nutrientes del medio. Takeda (1970) señala que la relación N:P óptima para el crecimiento de *Chaetoceros calcitrans* es de 13:1. La relación N:P del F/2 al inicio del cultivo fue de 12:1, valor muy similar a los señalados como ideales, pero para el caso de los otros medios, T15 y H, esta relación fue muy diferente, 1:1 y 8:1, respectivamente. 3) Inadecuada fuente de nitrógeno en algunos de los medios. Mac-Isaac & Dugale (1978) afirman que aunque las microalgas marinas pueden utilizar las diferentes formas de nitrógeno, solo el nitrógeno en forma de amonio es incorporado directamente a los aminoácidos de los tejidos celulares. El nitrógeno presente en los medios F/2 y H está en forma de nitratos mientras que el del T15 está en forma de amonio.

El F/2 aunque no contenía la mejor fuente de nitrógeno, si presentó la mejor relación N:P y la presencia de micronutrientes indispensables para el crecimiento celular. El T15 a diferencia, fue un medio que aunque no contenía la mejor relación N:P, ni la presencia de macronutrientes, presentó la mejor fuente de nitrógeno para las microalgas. Finalmente el medio de cultivo H aunque tenía una relación N:P cercana a la considerada ideal, no contenía los micronutrientes esenciales ni la fuente de nitrógeno apropiada.

Las microalgas asimilan el nitrógeno en forma de amonio en los primeros días de cultivo (Cedeño, 1980), ocasionando la disminución de pH del medio, lo cual puede paralizar o desacelerar el crecimiento algal (Delgado, 1993). Esto podría explicar las altas concentraciones celulares y producción de biomasa de los *Chaetoceros* en el medio T15 obtenidas al inicio de los cultivos. Newmark *et al.*, (1988) obtuvo densidades similares con el medio triple 15 en cultivos de *Chaetoceros gracilis* en volúmenes de 3L a una temperatura de 28-32°C, al

igual que González *et al.*, (1999) con *Chaetoceros calcitrans* en volúmenes de 1 L a una temperatura de 23°C.

Las concentraciones celulares obtenidas en el F/2 ( $6.1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) fueron similares a las reportadas por González, (1999) con cultivos de *Chaetoceros gracilis* y una especie de *Chaetoceros* no identificada en volúmenes de 1L mantenidas a una temperatura promedio de 22 °C.

La temperatura fue otro de los factores que afectaron el crecimiento algal tanto de la especie nativa como de la foránea. La especie nativa, *Chaetoceros sp*, presentó los mayores crecimientos y aumentos de biomasa en la menor temperatura (24 °C). Tal resultado contradice lo esperado en esta especie aislada de aguas cálidas y podría explicarse por 2 razones. 1) La metodología empleada para el aislamiento de microalgas pudo haber seleccionado una especie de *Chaetoceros* propia de bajas temperaturas. Debido a problemas logísticos, el cultivo inicial de las muestras colectadas en Taganga fue colocado a 24 °C por una semana y posteriormente se mantuvo a 28 °C, luego el *Chaetocero* aislado tuvo que estar bien adaptado para crecer y sobrevivir a la baja temperatura inicial y también para tolerar la alta temperatura a la que se sometió posteriormente. 2) Disminución de la disponibilidad de nutrientes a altas temperaturas. Durbin (1974) encontró que en cultivos de *Chaetoceros affinis* la disponibilidad del silicato es mayor cuándo la temperatura desciende. En cultivos de *Skeletonema sp* y *Asterionella formosa* el carbono, nitrógeno y fósforo aumentan cuando desciende la temperatura (Rhee & Gotham, 1981).

La especie foránea, *C. calcitrans*, presentó crecimientos y aumentos de biomasa similares en las dos temperaturas probadas. Tal resultado indica que esta especie tiene un rango de temperatura relativamente amplio en el cual su crecimiento es bueno. Luego es posible que esta sea una especie foránea propia de zonas de latitudes medias y que tenga la capacidad de adaptarse bien a los cambios de temperatura, o que sea una especie cosmopolita que puede encontrarse en ambientes tropicales y templados no siendo una especie foránea como actualmente se le considera. Pereira, (1988) reporta que el mejor crecimiento de diatomeas de la bahía de todos los Santos, Brasil se obtiene en

temperaturas de 25°C con respecto a 20, y 30°C. Ukeles (1961) estudiando una serie de algas microscópicas, especialmente diatomeas de clima templado encontró que todas crecen normalmente en una franja de temperatura de 18 a 22°C, sin embargo hay especies que pueden llegar a crecer exitosamente hasta en 28°C como *Chaetoceros calcitrans*.

En los cultivos de *Chaetoceros sp* realizados en volúmenes de 15 mL los patrones de respuesta en relación a los medios de cultivo y a la temperatura fueron diferentes a los descritos anteriormente. Los valores de crecimiento fueron mayores con el medio H y menores con el medio T15, estas dos situaciones se acentúan en los tratamientos de baja temperatura. Este fenómeno hace pensar que la falta de aireación pudo haber afectado la disponibilidad de nutrientes en estos tratamientos. La aireación produce un incremento de CO<sub>2</sub> en el cultivo haciendo que el pH se mantenga relativamente constante (Pereira, 1988), si no hay aireación en el cultivo el pH aumenta a través del tiempo si la fuente de nitrógeno son los nitratos o disminuye si la fuente de nitrógeno es el amonio. El pH alto que se habría dado en el medio H (medio que contiene nitratos) pudo ocasionar que se incrementara la disponibilidad de los nitratos y/o fosfatos del medio a base de H especialmente en la baja temperatura. De otro lado el pH bajo en el medio T15 (medio que contiene amonio) pudo ocasionar la parálisis o desaceleración del crecimiento, interrumpiendo muchos procesos celulares como lo sugiere Delgado (1993), especialmente a baja temperatura. Es muy probable que la temperatura y el pH óptimos en los que los nutrientes están disponibles para ser tomados por la microalgas no necesariamente coincidan con los valores en los cuales se obtiene un crecimiento algal óptimo.

Los mayores contenidos de proteínas y lípidos obtenidos en los cultivos de *Chaetoceros sp* en comparación con *Chaetoceros calcitrans* obtenidos en este estudio y otros estudios (Tabla 12) sugieren que la especie nativa tiene mayor valor nutricional que la foránea. Se considera deseable que una dieta utilizada para el crecimiento y maduración de un organismo tenga altos contenidos de proteínas y lípidos. Las proteínas son indispensables en la construcción de estructuras de tejidos blandos y además contiene aminoácidos esenciales; los

lípidos son considerados indispensables en la construcción de las membranas celulares y contienen ácidos grasos que en muchos organismos resultan importantes para el crecimiento; los carbohidratos, especialmente los monosacáridos brindan de forma directa y expedita energía a las células para cumplir sus funciones vitales (Schmidt-Nielsen, 1986; Eckert, 1992 )

Tabla 12. Composición bioquímica como porcentaje de materia orgánica (%MO) de *Chaetoceros Calcitrans* .

Observaciones	Medio	Proteínas (%MO)	Lípidos (%MO)	Carbohidratos (%MO)	Autor
	F/2	48.61	41.48	9.58	Parsons <i>et al.</i> , 1961
	F/2	36.10	20.70	43.20	Ben-Amotz <i>et al.</i> , 1987
Fase exponencial	F/2	31.24	21.57	47.18	Whyte, 1987
Fase estacionaria	F/2	37.54	29.95	32.51	Whyte, 1987
Fase exponencial	F/2	40.3	23	37	En este estudio
Fase exponencial	Walne	7.28	32.98	59.74	Fernández <i>et al.</i> , 1989
Fase de retardo	Walne	32.17	28.98	38.85	Fernández <i>et al.</i> , 1989
Fase estacionaria	Walne	39.2	24.89	35.91	Fernández <i>et al.</i> , 1989





## 5. CONCLUSIONES

Especies de fitoplancton pequeño unicelular ( $< 10 \mu\text{m}$ ) como las del género *Chaetoceros* pueden ser aisladas empleando el método de diluciones seriadas tomando como inóculo el sobrenadante de un cultivo inicial mixto en el cual especies de este género sean relativamente abundantes.

Especies de fitoplancton mediano o grande unicelular ( $> 10 \mu\text{m}$ ) como las de los géneros *Amphora* y *Cylindrotheca* pueden ser fácilmente aisladas empleando el método de diluciones seriadas tomando como inóculo el precipitado de un cultivo inicial mixto en el cual estas especies sean relativamente abundantes.

Especies de fitoplancton que formen cadenas como las del género *Skeletonema* pueden ser aisladas empleando el método de pipeteo capilar sobre una muestra de un cultivo inicial mixto en el cual las especies de este género sean detectadas.

Los parámetros de crecimiento y producción de biomasa de la especie nativa, *Chaetoceros sp*, fueron estadísticamente similares a los de la especie foránea *Chaetoceros calcitrans* bajo las diferentes condiciones de temperatura y medio de cultivo probados en volúmenes de 200 mL.

El medio comercial triple 15 puede ser utilizado como alternativa para el cultivo de *Chaetoceros sp* en volúmenes de 200 mL ya que en estas condiciones no se verificaron diferencias significativas en los valores de densidad y biomasa algal con respecto al medio de cultivo F/2.

Las dos especies de *Chaetoceros* respondieron negativamente al medio comercial a base de humus en los volúmenes de 200 y 1000 mL posiblemente

debido a que la relación N:P, la fuente de nitrógeno y la composición de los micronutrientes no fueron los mas adecuados.

El crecimiento y la producción de biomasa de la especie nativa, *Chaetoceros sp* cultivada a una baja temperatura (24°C) fueron estadísticamente superiores a las obtenidas en altas temperatura (28°C) en todos los volúmenes probados.

La especie foránea *Chaetoceros calcitrans* cultivada en ambientes con altas temperaturas (28°C) presentó la misma cinética algal que cuando se cultiva a bajas temperaturas (24°C).

El incremento en la densidad algal de *Chaetoceros sp* varió en relación al volumen de cultivo.

La concentración de proteínas y lípidos de la diatomea *Chaetoceros sp* fue superior a la encontrada en *C. calcitrans*, indicando que nutricionalmente la especie nativa tiene un mayor valor que la foránea como fuente directa de elementos necesarios para el crecimiento somático y gonadal.



## 6. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar el crecimiento celular de la especie nativa aislada en volúmenes de cultivo superiores a los utilizados en este trabajo ya que se ha comprobado que las respuestas en cuanto a crecimiento y/o producción de biomasa varían con el volumen del cultivo.

Teniendo en cuenta que la calidad nutricional de las células microalgales esta influenciada por la composición del medio y en muchos casos por la fase de crecimiento en que se encuentran, se recomienda realizar estudios posteriores en donde se evalúe la composición bioquímica de las microalgas estudiadas en los medios de cultivo ensayados y en otras fases de crecimiento celular.

Es conveniente profundizar mas sobre los requerimientos nutricionales de la especie de *Chaetoceros* aislada con el fin de conocer los nutrientes que se agotan mucho mas rápido y los limitantes del crecimiento celular.





## BIBLIOGRAFÍA

Abalde, J & Fidalgo, P. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Laboratorio de microalgas Universidad de la Curuña. 209p.

Ahmad, A. T. 1991. Optimum feeding rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* on the marine alga *Nannochloropsis* sp. J. World Aquacult. Soc. 22: 230-234.

Albentosa, M; Perez C.; Labarta, U.; Fernández, M. 1995. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. En: Aquaculture 1996 vol. 148, n.1, pp. 11-23.

Alfonso, S & Leal, S. 1999. Creación y mantenimiento de un cepario de microalgas. Centro de Investigaciones Marinas Universidad de la Habana. 24 p.

Alix, J.H., M.S. Dixon, B.C. Smith & H. Wikfors. 1996. Scallop larval feeding experiments: Some surprises and unanswered questions. J. Shellfish Res., 15(2): 451

Analitical Organization American Chemist. 1990. AOAC 13<sup>th</sup> edition, Washington, D.C, 1875p

Balech, E. & H.J. Ferrando. 1964. Fitoplancton Marino. Editorial Univ. de Buenos Aires. Eudeba. Pp. 98 – 108.

Bayne, B.L. & R.C. Newell. 1983. Physiological energetic of marine molluscs. In: A.S.M. de Saleuddin & K.M. Wilbur (Eds). The Mollusca, vol. 4. Physiology, part 1. Academic Press, New York, 407-515 pp.

- Ben-Amotz, A.; Fishler, R. & Scheneller, A. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.* 95: 31-36.
- Bligh, E.G. & Dyer, J.W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911- 917.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, I. & Richmond, A. 1987. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 12: 37-47.
- Brown, H. 1972. Experimental techniques for preserving diatoms used as food for larval *Penaeus aztecus*. *Proc. Nat. Shell fish. Ass.* 62:21-24.
- Buitrago, E. 1989. Evaluación de tres medios nutritivos empleados con el cultivo masivo de *Isochrysis aff. Galbana* (Green). En: Boletín oceánico de Venezuela, Universidad de Oriente. Vol 28(1-2): 197-202..Ed. Dr. E.K. Ganesa.
- Bula-Meyer, G. 1977. Algas marinas bénticas indicadoras de un área afectada por aguas de surgencia frente a la costa Caribe de Colombia. *Anal. Inst. Inves. Mar. Pta. Betín.* 13: 45-71
- Caicedo, I. 1975. Productividad Primaria y Fitoplancton en la Bahía de Neguange Parque Nacional Natural Tayrona. Fundación .Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogota. 58 p.
- Cedeño, G. 1980. Influencia del nitrógeno en el crecimiento y biosíntesis de aminoácidos en *Tetraselmis sp.* En: *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente.* 19 (1): 3-7
- Cohen, E Arad ,Malis S., and Adda, M. 1985. The potential production of sulphated polysaccharides from *Porphyridium*. *Plant and Soil* 89: 117-128.

- Coll, J: 1983. Acuicultura marina animal. Cultivo de microalgas. Madrid, mundi prensa: 328-358
- Crosby, M.P. C.J. Langdon & R.I.E. Newell. 1989. Importance of refractory plant material to the carbon budget of the oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Biol., 100: 343-352.
- Darley, W. 1987. Biología de las algas, enfoque fisiológico. Limusa S.A. México. 236p
- Davis, H.C & Ukeles, R. 1961. Mass culture of phytoplankton as food for metazoans. Science 143 (3478): 562-564
- Defosse, J.M. & A.J.S. Hawkins. 1997. Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. Mar. Biol., 129: 139-147.
- Delgado, G. 1993. Guía para el cultivo de microalgas. Instituto nacional de pesca. Guayaquil. Ecuador.
- Dharmaraj, S & K, Shanmugasundaram. 1995: Influence of microalgae food on growth of larvae and spat-set in pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). En : The fourth Indian Fisheries Forum, Proceedings 24-28 November 1996, (ed) Kerala J, Kochi. India Asia Fisheries Society. 1999 pp. 189-191.
- Dubinsky, Z. 1979. Increase of lipid yields from some alga by acid extraction. Phytochemistry. 18: 51-52.
- Durbin, H. 1974. Studies on the autoecology of the marine diatom *Thalassiosira nordenskiöldii*. The influence of day length, light, intensity and temperature on growth. J. Phycol. 10: 220-225.
- Fabregas, J., Abalde, J and Herrero, C. 1989. Biochemical composition and growth of the Marine Microalgae *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different

ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate.  
En: Aquaculture 83: 289-304

Fabregas, J; Herrero, C; Cabezas, B. & Abalde, J. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. En: Aquaculture 49: 231-244.

Fabregas, J; Patiño, M; Corder, B & Otero, A. 1997. Optimal renewal rate and nutrient concentration for production of the marine *Phaedactylum tricornutum* in semicontinuous cultures. Applied and environmental microbiologia. En: aquaculture 62 (1): 266-268.

Fernández, A & Fenucci J.L. 1996. Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae) utilizando distintos medio de cultivo. En: memorias, Acuicultura en Latinoamérica, IX congreso latinoamericano de acuicultura. Coquimbo, Chile. 111-115p.

Fernández, A & Fenucci J.L. 1996. Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae) con distinta concentración de silicato. En: memorias, Acuicultura en Latinoamérica, IX congreso latinoamericano de acuicultura. Coquimbo, Chile. 116-119p.

Fernández-Reiriz, M. J; Labarta, U. and Ferreiro, M. J. 1993. Effects of commercial enrichment diets on the nutritional values of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 112: 195-206.

Fernández-Reiriz, M. J; Perez-Camacho, A; Ferreiro, M.J; Blanco, J; Planas, M; Campos, M.J and Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids of seven of marine microalgae. En: aquaculture, 83: 17-37.

Fogg, G. E. 1965. Algal cultures and phytoplankton ecology University of Wisconsin press Londres. 175 p.

Franco, A; Avendaño, D; Bernal, W & Uribe, M. 1992. Contribución al conocimiento del plancton de Isla Tesoro, Parque Nacional Natural Corales del Rosario, Caribe Colombiano. En: VIII Seminario Nacional de ciencias y tecnología. Congreso Centroamericano y del caribe de ciencias del Mar. Santa Marta, Colombia.

Gómez, O. & Rosas, J. 1996. cultivo de las microalgas marinas *Chlorella sp* y *Tetraselmis chuii* con diferentes fertilizantes. En: memorias, Acuicultura en Latinoamérica, IX congreso latinoamericano de acuicultura. Coquimbo, Chile. 99-102 p.

Gómez, O. & Rosas, J. 1996. Cultivo de la microalga marina *Tetraselmis chuii* con fertilizantes agrícolas. En: memorias, Acuicultura en Latinoamérica, IX congreso latinoamericano de acuicultura. Coquimbo, Chile. 103-107p.

González, B; Buitrago, E & Frontado, K. 1999. Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. Fundación la Salle de Ciencias Naturales. N° 151: 75-84 p.

Granados, C & F. Bückle. 1983. cultivo de las microalgas *monochrysis lutheri* y *skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. En: Anales del instituto de ciencias del mar y tecnología. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California (México).

Guillard, R.R.L & Ryther, J.M. 1962. Studies en marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* and *Detonula confervaceae*. Gran. Can J. microbial. 8 : 229-239.

Gutierrez, G.R & Kochane, I. 1993. Cultivo experimental y fisiología de la microalga *Skeletonema costatum*. Tesis de pregrado. Facultad de Biología marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Cartagena. 67 p.

Hildreth, D.I. 1980. The passage of two species of microalgae through the gut of *Mytilus edulis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 48: 17-22.

Hernández, C. 1986. Productividad primaria y dinámica de fitoplancton en la Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Grado en Magister Scientiae.

Iriarte, F & Buitrago, E. 1990. Determinación de la concentración y fuentes optimas de nitrógeno en cultivos de *Chlorella sp*, usados como inoculo de cultivos masivos. En: Larvicultura de Camarones peneidos , vol I. 39p 280p

James, C; Hinty, S and Salman, A.E. 1989. Growth and fatty acid and amino acid composition of Microalgae under different temperature regimes. En: aquaculture 77: 337-351.

Kaplan, D. ; Richmond, A ; Dubinsky, Z y S. Aaronson. 1986. Algal nutrition. En: Handbook of microalgal mass culture. Richmond A. (Eds). Press inc. Boca Raton, Florida. 43-67p

Krupski, M.A., K.W. Tetrault & R.M. Patricio. 1998. The effects of an experimental algal Laing, I. & A. Psimopoulous. 1998. Hatchery cultivation of king scallop (*Pecten maximus*) spat with cultured and bloomed algal diets. Aquaculture, 169: 55-68.

Laing, I. Y F. Ayala. 1990. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. En: Introduction to Applied Phycology. Akatsuka, I (Eds). SPB Academic Publishing B. The Hague. 447p

Langdon C. J. 1982. New techniques and their application to studies of bivalve nutrition. In: G.D. Pruder, C.J Langdon, and D.E. Conklin (Editors), proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition. Biochemical and Physiological approaches to shellfish nutrition. Louisiana state university press, Baton Rouge, La, pp. 305 – 320.

- Langdon C. J. & Waldock, M. J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. J. Mar. Biol. 61: 431-448.
- Latama, G. 1999. Metamorphosis, growth, and survival of top shell larvae *Trochus niloticus* in cultures with four species of microalgae. En: Proceedings of the ninth Workshop of the Tropical Marine Mollusc Programme TMMP, Indonesia, 1929, August 1998 part 1 Hylleberg, J (ed). 1999 vol. 19. n.1 pp. 61-63
- Leal, E. L. 1998. Manual de cultivo para microalgas. Laboratorio de biotecnología de microalgas. Bioma. Universidad del Atlántico. Barranquilla. 118p.
- Lemos, M.B.N; Nascimento, J.A; Pereira, S.A & Smith, D.H. 1988. Aislamiento y selección de clorófitas como alimento para larvas de camarón. En: An.VI simposio Latinoamericano de acuicultura y V simposio. Brasileiro de acuicultura. Florianapolis , SC-Brasil de 17-22 Abril/1998.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O. & Sukenik, A. 1995. Potential advantages of frozen algae *Nannochloropsis* sp. for rotifer *Brachionus plicatilis* culture. Aquaculture 133: 295-309.
- Mac-Isaac, J.J & Dugale. R.C. 1978. Interactions of nitrate and ammonia uptake by natural populations of marine phytoplankton. Deep. Sea. Res. 16: 45-57.
- Mancera , E. & Criales, M. 1988. Influencia de la salinidad y la intensidad lumínica en cultivos experimentales de *Dunaliella salina* (DUNAL) Teodorosco 1905. (Chlorophyceae: volvocales), En: Memorias VII seminario nacional ciencias y tecnología del mar, Cali-1990.
- Mcelroy, W.D. & A. Nanon. 1953. Mechanisms of action of micronutrients elements in enzyme systems. Ann. Rev. Plant. Physiol., 1-30.

Medina, R & Cordero, E.B. 1998. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, under batch culture with a commercial culture media. Instituto de Industrias, Universidad del Mar Puerto Angel, Oaxaca Mexico; Ciencia-y-mar 1998 vol. 2, no. 6, pp. 19-25

Menzel, D.W & J. H. Ryther. 1961. Nutrients limiting the production of phytoplankton in the sargassu sea with especial reference to iron. Deep. Sea. Res. 7: 276-281.

Navarro, J.M. & R.J. Thompson. 1997. Biodeposition by the horse mussel *Modiolus modiolus* (Dillwyn) during the spring diatom bloom. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 209: 1-13.

Newmark, F, Criales; M. & Blanco, J.1988. Estandarización del cultivo de seis cepas de microalgas con cuatro medios de crecimiento. En: Red Nacional de Acuicultura. 149-161. Mem III reunión. Cali-Colombia. Nov, 1989. Eds. Iván Rey & Rocío Fuentes.

Ojea, J.; Novoa, S; Patino, D.M. & Rodriguez, J.L. 1999. Evaluation of the nutrition quality of phytoplankton in three culture system employed on mollusk hatchery Centro de Cultivos Marinos. CIMA Xunta de Galicia. Muelle de Porcillan s/n 27700 Ribadeo. 7. National Congress of Aquaculture. pp. 317-322

Paniagua, J., Buckle, F., Granados, C. & D. Loya. 1986. Manual de metodología y alternativas para el cultivo de microalgas. Cicese. México.

Paniagua, J & Buckle, F.1981. cultivo en condiciones controladas de *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con extractos de macrófitas marinas (fitoplancton). En: Anales del instituto de ciencias del mar y tecnología. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California (México).

Parsons, T.R; Stephens, K & R, Strickland, J. 1961. ON the chemical composition of 11 species of marine phytoplankters. J. fish. Res. Board. 18: 1101-1016.

Pereira ,B. 1988. Aislamiento y mejores condiciones de cultivo de diatomeas de la Bahía de Todos los Santos. En: An.VI simp. Latinoamericano de acuicultura y V simposio. Brasileiro de acuicultura. Florianapolis , SC-Brasil de 17-22 Abril/1998.

Perez, A & Roman, G .1980 .La reproducción en los moluscos bivalvos. En: Bol. Esp. Oscean. 5: p 155-183.

Raby, D., M. Mingelbier, J.J., Dodson, B. Klein, Y., Lagadeuc & L. Legendre. 1997. Food- particle size and selection by bivalve larvae in a temperature embayment. Mar. Biol., 128: 665-672.

Ramirez, G. 1983. Características fisicoquímicas de la Bahía de Santa Marta. (agosto 1980 hasta julio 1981). Anal. Inst. Inves. Mar. Pta. Betín. 13: 111-121

Redfield, A.C. 1958. The biological control of chemical factors in yhe environment, am. Sci. 46: 45-57.

Rhee, G.Y & R. Gotham, 1981. Optimum N:P ratios and coexistence in planktonic algae. J. Phycol. 16:486-489

Rhodes, E.W & Landers, W. 1972. Growth of oyster larvae, *Crassostrea virginica* of various sizes in different concentrations of the Chrysophyte, *Isochrysis galbans*. En: NOAA, NMFS, Middle Atl. COSAT. Fish Cent. Milford, CT USA.

Rios, P. 2001. Crecimiento en poblaciones de *Artemia franciscana* y *A. persimilis* (Crustacea: Anostraca) en condiciones controladas En: Revista de Biología Tropical [Rev-Biol-Trop]. Universidad austral de Chile. vol. 49, no. 2, pp. 629-634

Richmond, A. 1989. Cell response to environmental factors. En: HandBook of microalgal mass culture. Richmond A. (eds). Pres ind. Boca raton .Florida. 68-99 p.

Romberger, H.P. & Epifanio, C.E. 1980. Comparative effects of diet consisting of one or two algae species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 32: 11-18.

Rondon, E. 1991. Estimación de la productividad fitoplanctónica en Ciénagas del complejo Pajárales, Caribe Colombiano. Pontificia Universidad Javeriana.

Salzwedel, H & K, Muller. 1983. A summary of meteorological and hydrological data from the bay Santa Marta, Colombia Caribbean. *Anal. Inst. Inves. Mar. Pta. Betín*.13: 67-83.

Sánchez, A. 1998. Cultivos: Producción de microalgas. En : Memorias curso especializado de nutrición en acuicultura. Universidad de Córdoba, Montería. 313-322 p.

Sanchez, G. 2000. Crecimiento de la diatomea *Actinocyclus normanii*, bajo diferentes concentraciones de los nutrientes fósforo y sílice, en condiciones de laboratorio. En: Memorias II curso teórico-practico Microalgas y cianobacterias: Aislamiento, cultivo y fisioecología. Marzo 2001, INVEMAR, Santa Marta.

Scott, M & Mann, R. 1982. the effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankter *Thalassiosira pseudonana* (3H) on its food value to the bivalve *Tapes japonica*.En: *aquaculture* 26: 95-105.

Shelef, G. & Soeder, C.J. 1980. Algae biomas. Production and use elseiner / North – Holland Biomedical press. Amsterdam. 852 p.

Soudant, P., Marty, J., Moal, R., Robert, C., Quere; J.R., & J.F. Samain. 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture*, 143(3-4): 361-378.

Strickland, J.D.H. & T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis, 2nd. ed. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada 167, 310p.

Torrentera, B. & Tacón, A. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en la acuicultura. Documento de campo N. 12. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, FAO. Brasil. 87p

Utting, S.D. & P.F. Millican. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155: 47-56.

Vidal. L.A & A; Galán. 1999. Bioensayo con *Actinocyclus normanii* (Bacillariophyta) para determinar condiciones de su mantenimientos en laboratorios. En: Instituto de Investigaciones Marinas y costera, INVEMAR .

Vidal. L. A; & M, Carbonel. 1977. Diatomeas y Dinoflagelados de la Bahía de Cartagena, Vol. III. Fundación Universidad de Bogota, "Jorge Tadeo Lozano". Tesis Licenciatura Biología Marina, 1977.

Vidal, L. A. 1995. Estudio del Fitoplancton en el sistema lagunar estuarino tropical Ciénaga grande de Santa Marta, Colombia durante el año de 1987. tesis de grado. Magíster scientiae. Universidad National de Colombia. Bogotá. 208 p.

Whyte, J. N. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in Mari culture of bivalves. En: *Aquaculture*. Vol. 60: p 231-241.

Wikfors, G.H., G.W. Patterson, P. Gosh, R.A. Lewin, B.C. Smith & J.H. Alix. 1996. Growth of post set oysters, *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp. *Aquaculture*, 143: 411-419

# ANEXOS

Tabla 13. Soluciones madre utilizadas para la elaboración del medio de cultivo F/2.

CONSTITUYENTES	FORMULA	g L <sup>-1</sup> DE AGUA DESTILADA
1. Nutrientes mayores		
1.1. Nitrato de sodio, granulado y refinado	NaNO <sub>3</sub>	75
1.2. Fosfato de sodio monobásico	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5
1.3. Silicato de sodio metasoluble *	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	30
2. Metales traza		
2.1 Solución primaria		
2.1.1. Sulfato Cúprico, cristales finos	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.98
2.1.2. Sulfato de Zinc, cristales finos	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.2
2.1.3. Cloruro de Cobalto, cristales finos	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.0
2.1.4. Cloruro Manganoso, cristales finos	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	18.0
2.1.5. Molibdato de Sodio, cristales finos	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.63
2.2 Solución secundaria		g/1000mL de agua destilada
2.2.1. Cloruro férrico	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3.15
2.2.2. EDTA disódico	Na <sub>2</sub> EDTA	4.36
2.2.3 Metales Trazas o Alternativamente		1 ml de c/u de las soluciones. 2.1.1 a 2.1.5
2.2.1 EDTA férrico	Fe EDTA	5.00
2.2.2. Metales Trazas		1 ml de c/u de las soluciones 2.1.1 a 2.1.5
3. Vitaminas		g/100 ml de agua destilada
3.1 Solución primaria		
3.1.1. Biotina cristalizada	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	1.0
3.1.2. Cianocobalamina	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> P	0.1
3.2 Solución secundaria		cantidad en 100 ml de agua destilada
3.2.1. Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	1 ml de solución 3.1.1
3.2.2. Cianocobalamina (B12)	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> P	1 ml de la solución 3.1.2
3.2.3. Tiamina Clorhídrica (B1)	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS	20 mg



Tabla 14. Composición química del medio de cultivo a base de humus

<b>Constituyente</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Nitratos	40.1
Potasio	35.75
Fosfatos	5.15
Magnesio	20.45
Boro	0.6

Tabla 15. Composición química del medio de cultivo Triple 15

<b>Constituyente</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Nitrógeno total	15
Nitrógeno amoniacal	8.5
Nitrógeno nítrico	6.5
Fósforo asimilable	15
Potasio soluble en agua	15
Cloruro de potasio	15