



**República de Cuba**

**UNIVERSIDAD DE CIENFUEGOS.  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**TÍTULO: Crecimiento, composición proximal y  
orgánica de una diatomea bentónica en diferentes  
medios de cultivo.**

**Tesis en opción al título de Ingeniero Agropecuario.**

**Autor: Nayivis Nuñez Vázquez.**

**Tutor(es): MC. Sylvia Leal Lorenzo.**

**MC. Rafael Curbelo Hernández**

**Cienfuegos, 2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores: MSc. Sylvia Leal Lorenzo y MSc. Rafael Curbelo Hernández, por su empeño y dedicación desde el primer momento por mostrarme con mucha modestia sus conocimientos, por todo el tiempo de entrega en el trabajo diario, por la amistad que fueron capaces de brindarme, por todo muchas gracias.

A mi familia.

A todos los profesores de la Sede Universitaria Municipal de Cumanayagua que durante los seis años de la carrera ofrecieron lo mejor de si en pos de nuestro aprendizaje y formación general.

A la Red Temática “Desarrollo y manejo sustentable de sistemas de producción acuícola” a través del proyecto “Caracterización de organismos acuáticos con potencial para la biorremediación de efluentes acuícolas”, integrada por grupos de investigación y cuerpos académicos de México y Cuba y aprobadas por el PROMEP de la Secretaría de Educación Pública de México, por el apoyo material en el desarrollo de los experimentos.

A mis compañeros de trabajo que con su esfuerzo y comprensión pude asistir a todos los encuentros y desearon que esta tesis llegara a buen término.

A todos muchas gracias.

## **DEDICATORIA**

**A mi familia especialmente mis hijos y esposo.**



## RESUMEN

La alimentación de las primeras postlarvas de camarón con diatomeas bentónicas ocupa actualmente la atención de algunos investigadores debido al buen criterio que tienen de ellas los larvicultores. El objetivo del presente trabajo fue hallar las concentraciones que alcanza la diatomea bentónica *Navicula* sp. con diferentes variantes del medio Guillard y diferentes fertilizantes agrícolas, así como la composición orgánica y proximal que posee en la fase exponencial del cultivo. La especie se aisló en la Empresa de Producción de Postlarvas "Yaguacam", en Cienfuegos, Cuba. Los medios de cultivo que se experimentaron fueron cuatro variantes del medio Guillard, partiendo de las fórmulas tradicionales f y h (Guillard, 1975) y se probaron los fertilizantes agrícolas urea y nutrilake. Se hallaron las curvas y tasas de crecimiento y se determinó la composición orgánica y proximal en la fase exponencial. Las mayores concentraciones se alcanzaron con el medio h y doble proporción de silicatos al 3er día de cultivo y con nutrilake al 4to día. El peso seco mayor fue con el medio f/2, que difirió significativamente del resto ( $p \leq 0.001$ ). La composición proximal fue superior en los medios h y h/2. Esto pudiera deberse a que estos medios incorporan una fuente adicional de nitrógeno que favorece el valor nutricional de la microalga. La urea exhibió porcentajes más altos que el medio Guillard f y redujo el costo del medio anual un 16.9% respecto al medio f, no obstante los valores obtenidos están en el rango reportado por otros autores. La especie *Navicula* sp. ofrece buenas concentraciones para su cultivo masivo y presenta un valor nutricional adecuado para utilizarla en la alimentación de postlarvas de camarón.

Palabras clave: diatomeas bentónicas; medios de cultivo; fertilizantes; composición proximal; *Navicula* sp.

# ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	2
Problema de investigación.....	4
Hipótesis de Investigación.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
<b>CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
1.1 Las microalgas.....	6
1.2. Cultivo de diatomeas bentónicas.....	9
<b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOS</b> .....	13
2.1. Ubicación taxonómica .....	13
2.2. Medios de cultivo .....	13
2.3. Tasa de crecimiento.....	14
2.4. Composición proximal.....	15
2.5. Biomasa y contenido orgánico.....	15
2.6. Análisis estadístico.....	16
2.7. Análisis económico.....	16
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS</b> .....	17
3.1. Concentración celular.....	17
3.2. Tasa de crecimiento.....	19
3.3. Composición proximal y orgánica.....	22
<b>CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN</b> .....	25
4.1 Análisis económico.....	32
<b>CONCLUSIONES</b> .....	33
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	34
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la gran diversidad que ocupa la agricultura está la agronomía marina. Esta fue descrita por primera vez en 1979, durante el IX Congreso Internacional de Algas Marinas por el Dr. Maxwell Doty, de la Universidad de Hawaii, el cual acuñó y definió la agronomía marina como: “La producción de organismos vegetales en medios marinos y salobres para usos comerciales”, entendiendo como organismos vegetales tanto a las algas como a las plantas (fanerógamas) submarinas y costeras.

En Europa, desde hace unos años, se define la agronomía marina como el cultivo y aprovechamiento industrial de los vegetales acuáticos, principalmente macroalgas, microalgas y cianobacterias (Oxa, 2005). Según este mismo autor también en Chile se ha desarrollado la agricultura marina relacionada principalmente en el cultivo de microalgas y cianobacterias, realizándose las mayores inversiones en Sudamérica.

Las algas se consideran uno de los grupos de organismos de mayor variabilidad en términos de tamaño, forma, función ecológica y composición bioquímica (Vonshak, 1993).

Basadas en su contribución a la productividad primaria global, dentro de las microalgas, las diatomeas son los organismos fotosintéticos más importantes, dominan el fitoplancton en aguas frías y ricas en nutrientes tales como las surgencias. También se han detectado en ambientes extremos como el hielo polar o granos de arena de las playas, e incluso se han aislado muestras de células suspendidas en el aire (Graham y Wilcox, 2000).

El estudio de las microalgas planctónicas y su uso en la acuicultura, así como lo referido a los cambios en la composición proximal y de ácidos grasos, son numerosos (Brown *et al.*, 1996; Leonardos y Lucas, 2000; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006; Milke *et al.*, 2008) a diferencia de estudios llevados a cabo en microalgas bentónicas (Acien Fernández *et al.*, 2000, Liang *et al.*, 2001, 2002; Mercado *et al.*, 2004).

Las investigaciones sobre el cultivo de fitoplancton se han encaminado a procesos productivos con el fin de garantizar una producción continua, de alto crecimiento, que

*proporcione, ya sea una fuente de proteína vegetal que satisfaga los requerimientos de los organismos en cultivo o que se logren grandes cantidades de biomasa para la obtención de bioproductos. La tendencia actual es basar las investigaciones básicas en resolver problemas concretos que existan en los procesos productivos, con el fin de obtener altos rendimientos a menores costos.*

Las formas de cultivo y el valor nutricional de algunas especies de diatomeas bentónicas recibe la atención de los investigadores debido al papel que juegan en la alimentación de algunos organismos acuáticos. La mayor cantidad de estudios, relacionados con alimentación, refieren su utilización para moluscos, especialmente el abulón (Simental y Sánchez-Saavedra, 2003; Sánchez-Saavedra, 2006).

El número de medios de cultivo encontrados en la literatura es amplio. En términos generales, se pueden distinguir dos grandes categorías: los medios químicamente definidos y los medios de agua de mar enriquecida. La selección de un medio de cultivo adecuado es el primer paso y probablemente el más importante para el éxito de un cultivo de microalgas.

Para volúmenes menores a 5L el medio que más se usa es el f/2 de Guillard (Guillard y Ryther, 1962), ya que resulta económico y muy completo en composición de nutrientes, y cuando los cultivos alcanzan volúmenes masivos hay que emplear fórmulas de fertilización que abaraten los costos.

En la actualidad es de gran importancia generar conocimiento acerca del comportamiento de diatomeas bentónicas autóctonas en diferentes medios de cultivos y fertilizantes agrícolas, de forma tal que resulte económico y nos permita obtener cantidades sustanciales de biomasa, para evaluar su potencial en el cultivo de organismos acuáticos.

Esta investigación representa una **Novedad Científica**, ya que está vinculada a todos los estudios básicos, que se harán por primera vez para la ciencia del cultivo de esta especie de diatomea con vistas a alimentar postlarvas de camarón, además de que aporta una metodología basada en criterios científicos. El estudio de los diferentes

medios de cultivo y sus parámetros poblacionales, así como la caracterización de la calidad y la cantidad de la biomasa producida de ellos, propiciarán el enriquecimiento del conocimiento humano sobre estas microalgas,

El **Aporte teórico** se basa en los conocimientos que ofrece a la comunidad científica mundial sobre esta especie, tratada en cultivo para otros fines. Los resultados de esta tesis son de aplicación inmediata para la docencia de postgrado, ya lo que facilitaría medios más económicos para su cultivo.

La **Importancia práctica** radica en la obtención de metodologías de cultivo, no existentes hasta el momento, que ayudan a optimizar la explotación del cultivo de microalgas en Cuba.

Problema: ¿Qué comportamiento tendrá la diatomea bentónica *Navicula* sp. en diferentes variantes del medio de cultivo Guillard (h y f) y con fertilizantes agrícolas?

Teniendo en cuenta estos antecedentes para el presente estudio se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

La diatomea bentónica *Navicula* sp. puede cultivarse con diferentes variantes del medio de cultivo Guillard y fertilizantes agrícolas.

Para dar respuesta a la hipótesis de trabajo nos trazamos los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar los parámetros poblacionales, composición proximal y orgánica de la diatomea bentónica *Navicula* sp. en diferentes medios de cultivo.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de diferentes variantes del medio de cultivo Guillard, con simple y doble proporción de silicatos, sobre el crecimiento poblacional, la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) y orgánica (peso seco y peso orgánico), de la diatomea bentónica *Navicula* sp.

2. Evaluar el efecto de la sustitución de la fuente de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$ ) en el medio de cultivo Guillard f por los fertilizantes agrícolas urea y nutrilake, en el crecimiento poblacional, la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) y orgánica (peso seco y peso orgánico), de la diatomea bentónica *Navicula* sp.

## CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Las microalgas

Desde células simples con tamaños de pocos micrómetros hasta ejemplares marinos con longitudes de 50 m, las algas son organismos que habitan el planeta en casi todos los ecosistemas de la biosfera. Ellas tienen gran importancia ya que contribuyen aproximadamente con el 40-50% del oxígeno de la atmósfera y constituyen la fuente original del carbono comprendido en los yacimientos de petróleo (Andersen, 2005).

Con el advenimiento de la biotecnología el estudio de las algas se ha intensificado, para explorar los beneficios de estos organismos (Graham y Wilcox, 2000). Las técnicas de DNA ribosomal han provisto la evidencia que existen de ocho a nueve divisiones de algas. Dentro de los procariontes se encuentra la división Cyanobacteria y en los eucariontes las divisiones: Glaucophyta, Euglenophyta, Criptophyta, Haptophyta, Dinophyta, Ochrophyta, Rhodophyta y Chlorophyta (Graham y Wilcox, 2000). Las diatomeas pertenecen a la división Ochrophyta.

En términos de diversificación evolutiva, las diatomeas han sido extremadamente exitosas. En el medio ambiente se pueden encontrar como células simples o formando cadenas de células, con 285 géneros, se han reconocido entre 10,000 y 12,000 especies (Norton *et al.*, 1996). Por su amplia diversidad las diatomeas compiten solo con las algas verdes. Algunos expertos creen que muchas especies de diatomeas permanecen sin ser descritas, motivo por el cual son probablemente los organismos eucariontes más numerosos en el ambiente acuático (Norton *et al.*, 1996).

Las diatomeas se dividen en dos órdenes, las centrales, que tienen una simetría radial, y las pennadas, con valvas estriadas arregladas en relación a una línea y que tienden a

una simetría bilateral (Hasle y Syvertsen, 1997). Una característica distintiva de las células de las diatomeas es la pared de sílice, la cual, dependiendo del tipo de ornamentación, sirve a los taxónomos para identificar especies. Los frústulos de las diatomeas consisten en dos mitades ensambladas, la hipoteca y la epiteca. Las valvas son penetradas por poros de varios tamaños y tipos, los cuales sirven como vías de intercambio de gases celulares, nutrientes y otros materiales (Graham y Wilcox, 2000).

La reproducción de las diatomeas está asociada a la producción de valvas, la división celular (mitosis) siempre ocurre en el plano de la valva. Esta característica limita a las diatomeas a mantenerse siempre como una sola célula, ya que no comparten paredes celulares, por lo que no es posible la existencia de diatomeas multicelulares. Algunas diatomeas forman colonias filamentosas en las cuales, los frústulos se unen por medio de conectores silicios, pero no existe una continuidad citoplasmática como ocurre en algunas algas verdes y cafés (Cook y Graham, 1999).

Las proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales constituyen aproximadamente el 90% del peso seco de las células. En cultivos de microalgas utilizadas en acuicultura se observan los contenidos de proteínas (indicados en peso seco) entre el 10 y 57%, de carbohidratos entre 4 y 37%, de lípidos entre 2.8 y 28% y de cenizas entre 7 y 57%, obteniéndose que el 90% de los aminoácidos están en las proteínas, por lo tanto la mayor parte de los aminoácidos esenciales para camarón se encuentran en las microalgas (Olivera, 2002). Aún cuando los aminoácidos esenciales para el camarón se encuentran bien establecidos, todavía falta mucha información acerca de los requerimientos específicos de aminoácidos individuales para las diferentes especies (Carrillo *et al.*, 2001).

---

Brown *et al.*, (1997) plantean que las microalgas son usadas en maricultivo como alimento vivo de algunos estadios de crecimiento de moluscos, para estadios larvales de crustáceos y algunas especies de peces y organismos zooplanctónicos. Como son nutricionalmente suficientes, las microalgas pueden suplir una mezcla balanceada de nutrientes.

Ellos han estudiado la composición bioquímica de alrededor de 40 especies de microalgas pertenecientes a 7 clases taxonómicas, definidas como las mejores en adaptarse a las condiciones de Australia. Las microalgas varían sus proporciones de proteínas (6-52%), carbohidratos (5-23%) y de lípidos (7-23%) donde todas las especies tienen una composición similar de aminoácidos. Los polisacáridos fueron variables en su composición de azúcares encontrándose la mayor proporción en la glucosa (21-87%). Las diatomeas y otros grupos fueron ricas en ácidos grasos poliinsaturados (20:5(n-3) y 22:6(n-3)), importantes para las larvas de los peces marinos. Todas las especies tenían relativamente altas las concentraciones de ácido ascórbico (1-16 mg/g de peso seco) y riboflavina (20-40  $\mu$ g/g).

La variación de la composición química de las microalgas depende de factores como intensidad luminosa, salinidad, pH, temperatura y concentración de nutrientes. Los minerales también son importantes ya que intervienen como cofactores en las rutas metabólicas de la célula. Fábregas *et al.*, (1989) señalan que la variabilidad bioquímica de las microalgas puede ser utilizada para producir células con un contenido bioquímico previamente determinado.

La buena calidad del fitoplancton, entendiéndose estado fisiológico y composición química de las mismas es extremadamente importante para la alimentación de organismos en cultivo (Martínez, 1987).

---

## 1.2 Cultivo de diatomeas bentónicas

Exámenes microscópicos revelan que las diatomeas bentónicas proporcionan una matriz básica para un complejo de microorganismos denominados perifiton, que incluye diatomeas, bacterias, rotíferos, protozoarios, etc. Análisis nutricionales han demostrado que un conjunto de diatomeas bentónicas y el perifiton asociado es rico en ácidos grasos poliinsaturados y constituyen una fuente de alto valor para la alimentación de las postlarvas de camarón (Peterson y Curiel, 2002), por lo que cultivos no axénicos de diatomeas bentónicas pueden tener sus ventajas, ya que las bacterias tiene una actividad enzimática extracelular importante (Xing *et al.*, 2007)

Por otra parte, Griffith *et al.*, (1992) plantean que las diatomeas pennales de los géneros *Amphora*, *Cymbella* y *Navicula* son productores primarios predominantes en sedimentos costeros marinos y de agua dulce contribuyendo a la producción de detritus y su valor potencial, en su contenido nutricional, está dado por el contenido lipídico. Tadros y Johansen (1988) demostraron que dos especies de *Navicula* generalmente tienen altos porcentajes de lípidos y poseen más del 47% cuando crecen en condiciones de máximo estrés.

Los métodos de cultivo de diatomeas bentónicas son los mismos que los utilizados para otras especies de microalgas que se emplean en la alimentación de camarones. Para su utilización se pueden hacer florecimientos en los tanques que serán empleados para la cría, como lo aplican en Aquatec, Ltda. de Brasil. Otros cultivadores aplican superficies artificiales, que partiendo de un inóculo inicial, son colonizadas y logran una buena densidad para la alimentación de las postlarvas (Peterson y Curiel, 2002). No obstante está poco estudiado y citado el cultivo y uso de las diatomeas bentónicas para alimentar las primeras postlarvas de camarón en cultivo.

---

En nuestro país, Almaguer *et al*, (2004) aislaron dos especies de diatomeas bentónicas, identificadas como *Amphora cf. marina* y *A. cf. terroris* que pudieran utilizarse con fines

de alimentación de postlarvas de camarón. Estos autores estudiaron niveles de clorofila a y c en los cultivos de estas especies por la dificultad de utilizar la enumeración directa. Al respecto, consideraron que los niveles de clorofila a resultaron indicadores de crecimiento del cultivo, aunque no exista una relación directa de la concentración de clorofila a con la cuantificación en términos numéricos de las células, es decir, no se puede establecer una relación: concentración de clorofila a/ concentración celular, y viceversa porque el contenido de pigmentos varía con las condiciones del cultivo. Similares resultados fueron obtenidos por Leal *et al.*, (2010) con otra especie *Amphora*.

No obstante Alfonso (1999) afirma que la correspondencia entre la concentración celular y las determinaciones de la cantidad de pigmentos y otros componentes no es constante ya que éstos dependen de diferentes factores como el estado fisiológico de la célula y la fase de crecimiento del cultivo, así como de las condiciones físico-químicas a que están sometidas las células.

La cuantificación de las diatomeas bentónicas por conteo directo se dificulta por los productos exocelulares que secretan para formar sus colonias y adherirse al sustrato. Ante la dificultad de la cuantificación que presentan estas diatomeas, Voltolina (1991) estudia diferentes técnicas de dispersión de la diatomea bentónica *Amphora coffeaeformis* debido a que la evaluación que se hace de los cultivos es inapropiada, originada por la separación incompleta de las microalgas de los recipientes experimentales o por la distribución de las células en las muestras. Destaca que este problema aparece a menudo en trabajos de diatomeas bentónicas como manuales metodológicos, donde sólo se menciona la técnica de dispersión sin ninguna indicación o advertencia. Este autor concluye que el mejor tratamiento para suspender las

diatomeas bentónicas en el medio es con tratamiento ultrasónico, que es un método seguro y eficiente para este fin, ya que no daña las células.

Sin embargo, Almaguer *et al.*, (2004) propone que en la producción de cultivos masivos para la alimentación de larvas en niveles comerciales, el desarrollo de los mismos debe estimarse por la intensidad de la coloración que van adquiriendo en el tiempo, realizando pruebas previas y con el correspondiente entrenamiento del cultivador, teoría que puede manejarse como subjetiva y no ofrece información al cultivador.

Tratándose de un proceso productivo continuo y a gran escala, para las diatomeas bentónicas no es práctico realizar determinaciones de pigmentos u otras técnicas de colorimetría. Tampoco es práctico utilizar otras técnicas más sofisticadas para la dispersión de las células para después contarlas, como la expuesta por Voltolina (1991) de aplicación de ultrasonido de baja frecuencia que no daña las células, ya que se hace muy laborioso e incosteable a escala comercial.

Recientemente Leal *et al.*, (2012) demostraron que para centros de producción continua que se emplee *Amphora* y cuando se quiere viabilizar los resultados por conteo directo, lo más rápido y económico es aplicarle a la muestra pentano 5%, que, aunque no logra disolver en su totalidad los grumos de estas microalgas, se puede realizar el conteo con confiabilidad. Este método no es aplicable a todas las especies de microalgas bentónicas porque no todas tienen la misma adhesión al sustrato ni entre ellas (Roberts *et al.*, 2000).

El estudio de diferentes medios de cultivos en la diatomeas bentónicas se remonta a la última década donde Simental-Trinidad *et al.*, (2001), estudiaron el crecimiento poblacional, porcentaje de proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas de tres especies

de diatomeas bentónicas, cultivadas en medio f/2 y un medio agrícola convencional. Los que proponen el medio agrícola que es menos costoso y se obtiene en las microalgas la misma composición bioquímica que con el f/2.

Otro trabajo lo es el de Plasencia *et al.* (2004) que estudiaron la especie *Amphora* cf. *marina* utilizando una zeolita como enriquecedor del medio de cultivo. También Curbelo *et al.* (2004) aislaron, identificaron y cultivaron *Navicula* sp. tomada de aguas de un banco de progenitores de camarón y probaron diferentes relaciones N:P del medio Guillard h y distintas salinidades, encontrando que esta especie crece bien con una relación N:P de 15:1 del medio Guillard h y a una salinidad de 35 ups.

Leal *et al.*, (2010) probó el efecto de la doble proporción de silicatos en diferentes medios de cultivos en la diatomea bentónica *Amphora* sp. y determinó que cuando se le duplica la cantidad de silicato a los medios estudiados, la densidad celular aumenta considerablemente y el medio Guillard f/2 resultó ser el más productivo y económico que los demás medios y demostró que las cantidades de sílice en este medio son insuficientes para el cultivo de esta diatomea, tales estudios pudieran realizarse en otros géneros de diatomeas bentónicas de interés para el alimento de organismos acuáticos, ya que en un inicio los medios fueron diseñados para microlagas planctónicas de menor tamaño respecto a las bentónicas.

---

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de cultivo de fitoplancton del Centro de Producción de Postlarvas de Camarón “Yaguacam”, del Ministerio de la Industria Alimenticia, en la Provincia de Cienfuegos, Cuba. Para la determinación de la composición proximal y orgánica de los diferentes medios, fueron enviadas las muestras congeladas a la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa, México, durante el mes de enero de 2011, donde fueron procesadas.

### 2.1 Ubicación taxonómica

El estudio de especies autóctonas constituye un aporte al conocimiento necesario y oportuno por lo que la especie objeto de estudio fue aislada de los estanques de reproductores del Centro de Desove “Yaguacam”, los cuales poseen paredes de cemento y suelo arcilloso, con un área 0.38 ha. La ubicación taxonómica de la especie de diatomea bentónica *Navicula* sp. según Jiménez (1976) y Moreno *et al.*, (1996) es la siguiente :

PHYLUM Crysophyta  
DIVISIÓN Cromophyta  
CLASE Bacilliarophyceae  
ORDEN Pennales o Pennatae  
SUBORDEN Biraphidineae  
FAMILIA Cymbellaceae  
GÉNERO *Navicula*

### 2.2 Medios de cultivo

Se diseñaron 3 experimentos con diferentes medios de cultivo cada uno. Se realizaron cuatro réplicas por cada tratamiento y cada experimento duró 5 días. El primero consistió en evaluar cuatro variantes del medio de cultivo Guillard (h/2, h, f/2 y f) (Guillard, 1975). En el segundo experimento se añadió el doble de la proporción de silicatos a los mismos medios del primer experimento, a los que se les llamó: h/2s, hs, f/2s y fs, y el tercero consistió en probar la sustitución de la fuente de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub>) del medio de cultivo

Guillard F (tratamiento 1), por los fertilizantes nitrogenados de grado agrícola, urea (46-0-0) a razón de 150 mg.L<sup>-1</sup> (tratamiento 2) y Nutrilake (15-0-0) a 200 mg.L<sup>-1</sup> (tratamiento 3).

Se partió de un inóculo de 10 mL y se siguió la técnica del aumento progresivo del volumen, con medio de cultivo Guillard f/2, al que se le adicionó hidroximetilaminometano (Tris-HCL) para regular el pH del medio, en una proporción de 1 mmol.L<sup>-1</sup> de medio de cultivo. Los inóculos para los experimentos (en 250 mL) crecieron en las variantes de los medios a que se cultivarían. La concentración inicial fue de 43 x 10<sup>3</sup> cél.mL<sup>-1</sup> para los experimentos 1 y 2 y para el 3 de 59 x 10<sup>3</sup> cel.mL<sup>-1</sup>. Todos se incubaron en condiciones controladas de luz (47 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) y salinidad (35 g.L<sup>-1</sup>) y ubicados en una habitación climatizada por tres aires acondicionados donde la temperatura se mantuvo en 24.5 ± 1°C con aireación continua. El agua de mar se filtro por 5, 1, 0.35 y luz ultravioleta.

Para comparar los tratamientos se halló la concentración celular (x10<sup>3</sup> cél.mL<sup>-1</sup>) de los cultivos por conteo directo con hematocitómetro Neubauer, desprendiendo las células que forman las biopelículas con una varilla de vidrio y con un burbujeo fuerte.

### 2.3 Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento ( $\mu_o$ ) expresa el número de divisiones celulares o de duplicaciones diarias de la biomasa, la que se determinó según la fórmula:

$$\mu_o = [\ln (X_2/X_1) / \ln 2] / t_2-t_1$$

donde  $X_2$  y  $X_1$  es la concentración celular en los tiempos  $t_2$  y  $t_1$  respectivamente. Además se determinó la tasa de crecimiento acumulada como la sumatoria de la tasa de crecimiento de cada día de cultivo, en los experimentos realizados (Arredondo y Voltolina, 2007).

## 2.4 Composición proximal

La composición proximal se determinó en la fase exponencial de los cultivos, los que se concentraron en microfiltros de fibra de vidrio GFC de 25 mm. Las muestras se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para determinar la cantidad de proteínas se siguió el método de Lowry *et al.* (1951), para los carbohidratos el de Dubois *et al.* (1956) y para los lípidos el de Bligh y Dyer (1959) modificado para microalgas. La cantidad de cultivo filtrada fue entre 15 y 20 mL para las proteínas y entre 30 y 40 mL para lípidos y carbohidratos. De cada réplica se hicieron 3 filtros para cada determinación lo que daba un total de 12 muestras por tratamiento.

## 2.5 Biomasa y contenido orgánico

Para conocer la biomasa y el contenido orgánico, las muestras también se colectaron en fase exponencial. Se tomaron 200 mL de cultivo y se concentraron en microfiltros de fibra de vidrio GFC de 47 mm de diámetro, los cuales fueron previamente lavados con agua destilada, incinerados en una mufla Felisa a  $400^{\circ}\text{C}$  por 4 horas y se desecaron hasta llevarlos a peso constante. Las muestras se lavaron con formiato de amonio al 3% para quitarle los residuos de sales (Miranda-Baeza *et al.*, 2007) y se incubaron en una estufa Shell Lab a  $60^{\circ}\text{C}$  hasta obtener valores de peso seco constante. Al igual que para la composición proximal, se tomaron 3 muestras de cada réplica, lo que sumaban 12 por tratamiento.

Para determinar el contenido de cenizas, las muestras se incineraron a  $460^{\circ}\text{C}$  en una mufla por 24 horas y por diferencias entre el peso seco y el de cenizas se obtuvo el contenido orgánico.

### 3.6 Análisis estadístico

A los diferentes datos que se obtuvieron se les determinó la normalidad por el estadígrafo de Kolmogorov – Smirnov y la homogeneidad de varianzas por la prueba de Bartlett (Sheskin, 2007).

Se determinó la existencia de diferencias entre los tratamientos de cada experimento mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para los datos obtenidos en el crecimiento poblacional para cada día de cultivo, tasa de crecimiento, además para la composición proximal y orgánica. Para la estadística no paramétrica se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, Anova de una vía en rangos.

Para los casos de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) se aplicó la prueba de Tukey HDS de comparación múltiple de medias Sheskin (2007). Toda la información se procesó en el software SigmaStat 3.5.

### 3.7 Análisis económico

El análisis económico se realizó al experimento 3, donde solamente intervienen las tres fuentes de nitrógeno empleadas:  $\text{NaNO}_3$ , Urea y Nutrilake, de la solución 1 de trabajo del medio Guillard (Guillard, 1975),(Tabla1), ya que el resto de los componentes del medio y las condiciones de cultivo son iguales. Se tuvo en cuenta para esto los precios por kilogramo en moneda nacional (CUP) y en moneda libremente convertible (CUC).

Se sumaron los volúmenes a producir diariamente de *Navicula* sp., los que fueron multiplicados por las cantidades de fertilizante que se emplearon en cada medio. Posterior se calcularon las cantidades en CUP y CUC de acuerdo a los precios de cada producto (Tabla 2). Este valor fue extrapolado al gasto mensual y anual de cada uno.

Tabla 1. Diferentes fuentes de nitrógeno de la solución 1 de trabajo del medio Guillard, en el experimento 3.

Tratamientos	NaNO <sub>3</sub>	Urea	Nutrilake	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O
1(f)	150 mg.L-1	-	-	10 mg.L-1
2(urea)	-	150 mg.L-1	--	10 mg.L-1
3(nutrilake)	-	-	200 mg.L-1	10 mg.L-1

Usar 1 ml.L<sup>-1</sup> de agua de mar a emplear

Tabla 2. Precio de los fertilizantes empleados en el experimento 3.

Precio	NaNO <sub>3</sub>	Urea	Nutrilake
CUP/kg	6.489	0.297	5.499
CUC/kg	42.440	-	7.622

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS

### 3.1. Concentración celular

En el primer experimento, los cuatro medios estudiados en la diatomea bentónica *Navicula* sp. revelaron la ausencia de una fase de latencia, con densidades similares entre ellos por encima de las  $700 \times 10^3 \text{ cel.mL}^{-1}$ , (Fig. 1). Aunque se pudo apreciar que los máximos de crecimiento de esta microalga se alcanzaron al 2do día para el medio h y al 3ero para el F diferente significativamente ( $P < 0.05$ ) del medio f/2 y h/2 (Tabla 3).

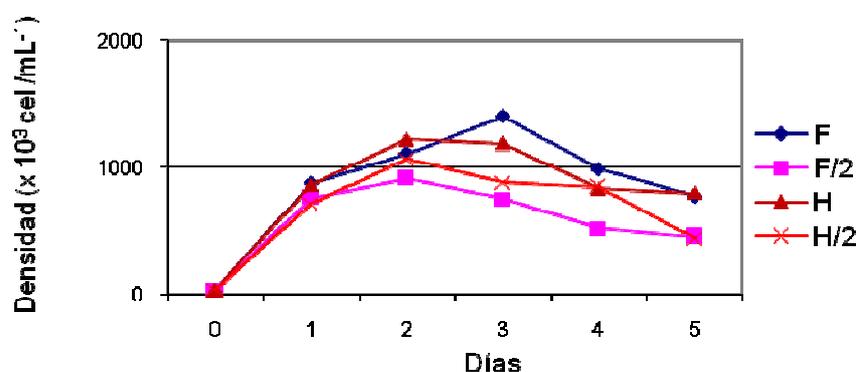


Fig. 1. Curvas de crecimiento de *Navicula* sp. con diferentes variantes del medio Guillard.

Tabla 3. Concentración de los cultivos de *Navicula* sp. con diferentes variantes del medio Guillard los días 2, 3 y 4 (en cel/mL) ( $\pm$  ES). Letras diferentes en la misma columna difieren entre sí,  $a > b > c$ .

	Día 2	Día 3	Día 4
f	1112 188 <sup>a</sup> $\pm$ 52.088	1405 000 <sup>a</sup> $\pm$ 73.053	938 125 <sup>a</sup> $\pm$ 95.752
f/2	914 375 <sup>a</sup> $\pm$ 50.245	752 188 <sup>c</sup> $\pm$ 123.186	578 438 <sup>b</sup> $\pm$ 106.657
h	1222 813 <sup>a</sup> $\pm$ 179.206	1188 750 <sup>ab</sup> $\pm$ 110.554	834 063 <sup>ab</sup> $\pm$ 47.889
h/2	1066 250 <sup>a</sup> $\pm$ 18.186	882 188 <sup>bc</sup> $\pm$ 74.976	846 250 <sup>ab</sup> $\pm$ 38.256
Probabilidad	P = 0.185 <sup>ns</sup>	P = 0.002 *	P = 0.037 *

Con la adición de la doble proporción de silicato en los medios evaluados se obtuvo el valor máximo de crecimiento al 3er día de cultivo para el medio h, (Fig. 2) con diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) del resto (Tabla 4). En este experimento se observó una declinación brusca a partir del 3er día. Fue evidente como la doble proporción de silicato en el medio hs favoreció el crecimiento de *Navicula* sp.

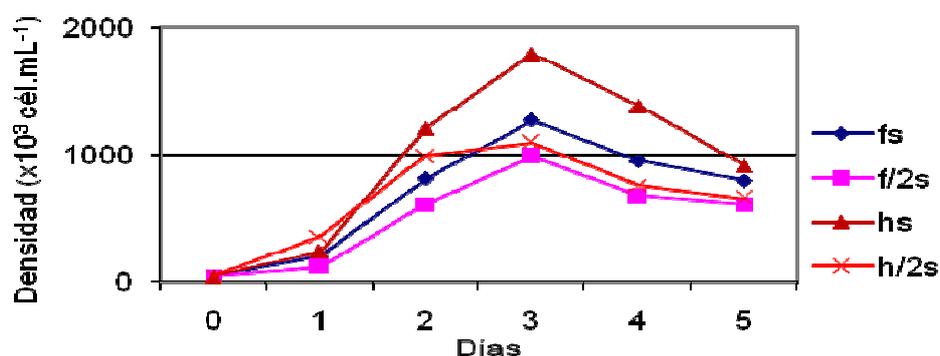


Fig. 2. Curvas de crecimiento de *Navicula* sp. con diferentes variantes del medio Guillard y doble proporción de silicatos.

Tabla 4. Concentración de los cultivos de *Navicula* sp. con diferentes variantes del medio Guillard y doble proporción de silicato, los días 2, 3 y 4 (en cel/mL) ( $\pm$  ES). Letras diferentes en la misma columna difieren entre sí,  $a > b > c$ .

	Día 2	Día 3	Día 4
fs	809 063 <sup>b</sup> $\pm$ 63.879	1 271 563 <sup>bc</sup> $\pm$ 74.064	953 438 <sup>b</sup> $\pm$ 36.241
f/2s	610 000 <sup>c</sup> $\pm$ 49.663	988 438 <sup>c</sup> $\pm$ 25.266	680 938 <sup>c</sup> $\pm$ 50.707
hs	1 207 500 <sup>a</sup> $\pm$ 34.888	1 794 063 <sup>a</sup> $\pm$ 96.453	1 384 063 <sup>a</sup> $\pm$ 90.530
h/2s	992 813 <sup>b</sup> $\pm$ 32.313	1 095 938 <sup>c</sup> $\pm$ 45.796	757 188 <sup>bc</sup> $\pm$ 20.472
Probabilidad	$P < 0.001$ *	$P < 0.001$ *	$P < 0.001$ *

El empleo de los fertilizantes agrícolas urea y nutrilake en la sustitución de la fuente de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$ ) en el medio de cultivo Guillard f reveló que nutrilake al 4to logró el mayor valor de densidad de  $994 \times 10^3$  cel. $\text{mL}^{-1}$ , diferente significativamente del resto, ( $P < 0.05$ , Fig. 3, Tabla 5).

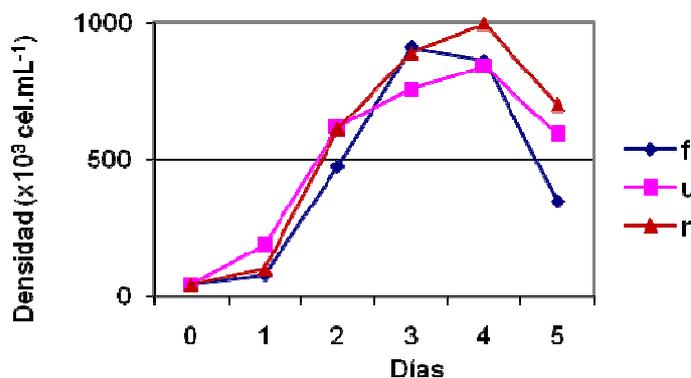


Fig. 3. Curva de crecimiento de *Navicula* sp. en el medio Guillard f y los fertilizantes agrícolas (urea y nutrilake) u: urea, n: nutrilake.

El empleo de fertilizantes agrícolas en este experimento demostró una fase exponencial hasta el 4to día lo que no fue observado del mismo modo para el medio f.

Tabla 5. Concentración de los cultivos de *Navicula* sp. con fertilizantes agrícolas en el medio Guillard f, los días 1, 2, 3 y 4 (en cel/mL) ( $\pm$  ES). Letras diferentes en la misma columna difieren entre sí, a>b.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
fs	78 125 <sup>b</sup> $\pm$ 4.371	474 375 <sup>b</sup> $\pm$ 22.549	907 188 <sup>a</sup> $\pm$ 26.301	859 375 <sup>b</sup> $\pm$ 46.865
Urea	185 313 <sup>a</sup> $\pm$ 16.688	620 625 <sup>a</sup> $\pm$ 17.813	755 625 <sup>b</sup> $\pm$ 47.605	840 625 <sup>b</sup> $\pm$ 21.044
Nutrilake	98 438 <sup>b</sup> $\pm$ 4.371	609 688 <sup>a</sup> $\pm$ 9.497	888 438 <sup>b</sup> $\pm$ 22.870	993 750 <sup>a</sup> $\pm$ 43.226
Probabilidad	P = 0.001 *	P = 0.001 *	P = 0.023 *	P = 0.013 *

### 3.2. Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento ( $\mu_0$ ) que se estimó para los medios de cultivo en el experimento 1, tuvo su valor máximo ( $\mu_0=4.35$ ) en el medio f para el 1er día, sin diferencias significativas del resto (Tabla 6). Los valores acumulados de la tasa de

---

crecimiento no tuvieron diferencias significativas entre los medios f y h y si difirieron de f/2 y h/2 ( $P>0.05$ ).

En los medios con doble proporción de silicato el número de duplicaciones diarias de la biomasa fue más alto para el 1er día en el medio h/2s de 3.05, valor que difiere significativamente del resto de los tratamientos. Sin embargo el 2do día mostró el valor máximo para el f2s ( $\mu_0=2.40$ ), con diferencias significativas solo del h/2s ( $P<0.05$ ). A diferencia de los medios con simple proporción de silicato (3er día), los valores negativos son evidentes a partir del 4to día. El máximo de la tasa de crecimiento acumulada fue para el medio hs de 4.40 sin diferencias significativas del medio fs y si del resto, (Tabla 6).

La sustitución del nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) en el medio Guillard f por los fertilizantes agrícolas urea y nutrilake, reveló un valor máximo de duplicaciones diarias de la biomasa para la urea de 1.64, diferente significativamente del resto ( $P<0.05$ ), (Tabla 5). Sin embargo al 2do día, los medios f y nutrilake exhibieron los máximos de tasa de crecimiento para esta especie ( $\mu_0=2.60$  y 2.64 respectivamente) superiores a los alcanzados el 1er día de cultivo. La urea mantiene valores estables de duplicaciones diarias para los dos primeros días de cultivo.

El medio f tuvo su valor negativo el 4to día a diferencia de los medios con fertilizantes agrícolas al 5to. La tasa de crecimiento acumulada exhibió valores máximos para el medio con nutrilake de 3.56, similar a la urea, ambas con diferencias significativas ( $P<0.05$ ) del medio f.

Tabla 6. Tasa de crecimiento ( $\mu_0$ : divisiones por día) y tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu_0$ ) media ( $\pm$ ES), para *Navicula* sp. en los tres experimentos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), ( $a > b > c$ ).

Experimentos	Tiempo de cultivo						
	1	2	3	4	5	$\Sigma\mu_0$	
1	f	4.35 <sup>a</sup> $\pm 0.133$	0.34 <sup>a</sup> $\pm 0.159$	0.34 <sup>a</sup> $\pm 0.134$	-0.51 <sup>a</sup> $\pm 0.260$	-0.38 <sup>a</sup> $\pm 0.260$	4.14 <sup>a</sup> $\pm 0.384$
	f/2	4.00 <sup>a</sup> $\pm 0.453$	0.28 <sup>a</sup> $\pm 0.377$	-0.34 <sup>b</sup> $\pm 0.336$	-0.51 <sup>a</sup> $\pm 0.161$	-0.17 <sup>a</sup> $\pm 0.222$	3.39 <sup>b</sup> $\pm 0.213$
	h	4.31 <sup>a</sup> $\pm 0.218$	0.48 <sup>a</sup> $\pm 0.572$	-0.42 <sup>ab</sup> $\pm 0.205$	-0.50 <sup>a</sup> $\pm 0.356$	-0.06 <sup>a</sup> $\pm 0.189$	4.21 <sup>a</sup> $\pm 0.151$
	h/2	4.05 <sup>a</sup> $\pm 0.207$	0.59 <sup>a</sup> $\pm 0.243$	-0.29 <sup>b</sup> $\pm 0.222$	-0.05 <sup>a</sup> $\pm 0.130$	-0.98 <sup>a</sup> $\pm 0.373$	3.31 <sup>b</sup> $\pm 0.431$
	P=	0.239	0.660	0.006*	0.031	0.002*	0.002*
2	fs	2.17 <sup>b</sup> $\pm 0.347$	2.06 <sup>a</sup> $\pm 0.182$	0.66 <sup>a</sup> $\pm 0.140$	-0.41 <sup>a</sup> $\pm 0.120$	-0.27 <sup>a</sup> $\pm 0.275$	4.20 <sup>ab</sup> $\pm 0.190$
	f/2s	1.41 <sup>c</sup> $\pm 0.273$	2.40 <sup>a</sup> $\pm 0.297$	0.71 <sup>a</sup> $\pm 0.240$	-0.55 <sup>a</sup> $\pm 0.286$	-0.17 <sup>a</sup> $\pm 0.519$	3.80 <sup>b</sup> $\pm 0.326$
	hs	2.43 <sup>b</sup> $\pm 0.160$	2.38 <sup>a</sup> $\pm 0.153$	0.57 <sup>a</sup> $\pm 0.147$	-0.38 <sup>a</sup> $\pm 0.335$	-0.60 <sup>a</sup> $\pm 0.130$	4.40 <sup>a</sup> $\pm 0.158$
	h/2s	3.05 <sup>a</sup> $\pm 0.106$	1.49 <sup>b</sup> $\pm 0.073$	0.14 <sup>b</sup> $\pm 0.173$	-0.53 <sup>a</sup> $\pm 0.068$	-0.22 <sup>a</sup> $\pm 0.148$	3.92 <sup>b</sup> $\pm 0.182$
	P=	0.005*	0.013*	0.017*	0.349	0.204	0.010*
3	f	0.40 <sup>b</sup> $\pm 0.194$	2.60 <sup>a</sup> $\pm 0.302$	0.94 <sup>a</sup> $\pm 0.115$	-0.08 <sup>a</sup> $\pm 0.076$	-1.32 <sup>b</sup> $\pm 0.208$	2.54 <sup>b</sup> $\pm 0.166$
	Urea	1.64 <sup>a</sup> $\pm 0.240$	1.76 <sup>b</sup> $\pm 0.320$	0.28 <sup>c</sup> $\pm 0.142$	0.16 <sup>a</sup> $\pm 0.254$	-0.52 <sup>a</sup> $\pm 0.220$	3.31 <sup>a</sup> $\pm 0.209$
	Nutrilake	0.74 <sup>b</sup> $\pm 0.126$	2.64 <sup>a</sup> $\pm 0.160$	0.54 <sup>b</sup> $\pm 0.103$	0.16 <sup>a</sup> $\pm 0.132$	-0.51 <sup>a</sup> $\pm 0.190$	3.56 <sup>a</sup> $\pm 0.154$
	P=	<0.001*	0.002*	<0.001*	0.131	<0.001*	<0.001*

### 3.3. Composición proximal y orgánica

Los valores de la composición proximal de *Navicula* sp. que se obtuvieron en las diferentes variantes del medio Guillard, se favorecieron en los medios h y h/2, sin diferencias entre ellos ( $P > 0.05$ , Tabla 7).

Tabla 7. Composición proximal y orgánica ( $\pm$  ES) de *Navicula* sp. en diferentes variantes del medio Guillard. Letras diferentes en la misma columna difieren entre sí, ( $P < 0.05$ ),  $a > b > c$ . PO: Peso orgánico, PS: Peso seco.

Tratamientos	PO (pg.cel <sup>-1</sup> )	PS (pg.cel <sup>-1</sup> )	Proteínas (%PS)	Lípidos (%PS)	Carbohidratos (%PS)
f	97.517 <sup>a</sup> $\pm 4.065$	148.658 <sup>b</sup> $\pm 5.715$	18.237 <sup>c</sup> $\pm 0.554$	17.471 <sup>b</sup> $\pm 0.728$	9.416 <sup>b</sup> $\pm 0.253$
f/2	127.800 <sup>a</sup> $\pm 8.003$	211.504 <sup>a</sup> $\pm 22.633$	21.265 <sup>bc</sup> $\pm 1.139$	19.291 <sup>b</sup> $\pm 0.915$	9.236 <sup>b</sup> $\pm 0.422$
h	97.115 <sup>a</sup> $\pm 3.012$	138.934 <sup>c</sup> $\pm 6.584$	25.773 <sup>a</sup> $\pm 0.703$	25.103 <sup>a</sup> $\pm 0.591$	13.326 <sup>a</sup> $\pm 0.490$
h/2	75.896 <sup>b</sup> $\pm 1.943$	115.640 <sup>d</sup> $\pm 4.160$	23.182 <sup>ab</sup> $\pm 0.938$	26.122 <sup>a</sup> $\pm 1.004$	12.655 <sup>a</sup> $\pm 0.532$
Probabilidad	$P \leq 0.001^*$	$P \leq 0.001^*$	$P < 0.001^*$	$P < 0.001^*$	$P < 0.001^*$

Los valores máximos de peso orgánico (127.800 pg.cel<sup>-1</sup>) y peso seco (211.504 pg.cel<sup>-1</sup>) se alcanzaron para el medio f/2, diferentes significativamente del h/2 para el peso orgánico y del resto para el peso seco, ( $P < 0.05$ , Tabla 7).

La adición de la doble proporción de silicato al medio aumentó de forma significativa el contenido de proteínas y carbohidratos en los medios con amonio, sin diferencias entre ellos. El contenido de lípidos solo se incrementó en el medio h/2s, diferente estadísticamente del resto ( $P < 0.05$ ). Por lo que este medio favorece el valor nutricional de *Navicula* sp. (Tabla 8).

Tabla 8. Composición proximal y orgánica ( $\pm$  ES) de *Navicula* sp. en diferentes variantes del medio Guillard con doble proporción de silicato. Letras diferentes en la misma columna difieren entre si, ( $P < 0.05$ ),  $a > b > c$ . PO: Peso orgánico, PS: Peso seco.

Tratamientos	P O (pg.cel <sup>-1</sup> )	P S (pg.cel <sup>-1</sup> )	Proteínas (%PS)	Lípidos (%PS)	Carbohidratos (%PS)
fs	56.929 <sup>b</sup> $\pm 0.910$	101.413 <sup>b</sup> $\pm 3.210$	18.704 <sup>b</sup> $\pm 0.796$	11.134 <sup>c</sup> $\pm 0.585$	9.546 <sup>b</sup> $\pm 0.383$
f/2s	71.486 <sup>a</sup> $\pm 2.243$	114.726 <sup>a</sup> $\pm 4.759$	17.331 <sup>b</sup> $\pm 0.833$	16.006 <sup>b</sup> $\pm 0.864$	9.448 <sup>b</sup> $\pm 0.398$
hs	56.161 <sup>b</sup> $\pm 1.573$	87.992 <sup>c</sup> $\pm 2.517$	23.371 <sup>a</sup> $\pm 0.690$	18.594 <sup>b</sup> $\pm 0.561$	11.495 <sup>a</sup> $\pm 0.481$
h/2s	72.949 <sup>a</sup> $\pm 1.623$	108.043 <sup>ab</sup> $\pm 2.654$	24.062 <sup>a</sup> $\pm 0.795$	23.285 <sup>a</sup> $\pm 1.374$	11.020 <sup>ab</sup> $\pm 0.641$
Probabilidad	$P \leq 0.001^*$	$P \leq 0.001^*$	$P < 0.001^*$	$P \leq 0.001^*$	$P < 0.007^*$

El peso orgánico tuvo un máximo de 72.949 pg.cel<sup>-1</sup> para el medio h/2s, similar al f/2s y diferente significativamente del resto ( $P < 0.05$ ), correspondiendo estos con los medios menos enriquecidos y concentrados al 4to día de cultivo. De igual manera el peso seco alcanzó su máximo para el f/2s de 114.726 pg.cel<sup>-1</sup> similar al h/2s y diferente significativamente del resto ( $P < 0.05$ ). Evidentemente el peso orgánico y seco de esta microalga aumentó con la doble proporción de silicatos en los medios menos enriquecidos.

De los medios con fertilizantes agrícolas estudiados, la urea reveló los máximos valores de peso orgánico (97.906 pg.cel<sup>-1</sup>) y peso seco (152.331 pg.cel<sup>-1</sup>) con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), del resto para el primero y respecto al medio f para el segundo. Así como también la urea obtuvo los máximos en el contenido de lípidos y carbohidratos, similar respecto al f. El contenido de proteínas osciló entre 17 y 19% sin diferencias entre los tratamientos (Tabla 9).

Tabla 9. Composición proximal y orgánica ( $\pm$  ES) de *Navicula* sp. con los fertilizantes agrícolas urea y nutrilake en sustitución de la fuente de nitrógeno en el medio Guillard F. Letras diferentes en la misma columna difieren entre sí, ( $P < 0.05$ ).  $a > b > c$ , PO: Peso orgánico, PS: Peso seco.

Tratamientos	P O (pg.cel <sup>-1</sup> )	P S (pg.cel <sup>-1</sup> )	Proteínas (%PS)	Lípidos (%PS)	Carbohidratos (%PS)
f	68.762 <sup>c</sup> $\pm 1.089$	107.62 <sup>b</sup> $\pm 1.848$	18.636 <sup>a</sup> $\pm 0.644$	17.276 <sup>a</sup> $\pm 0.579$	12.461 <sup>ab</sup> $\pm 0.317$
urea	97.906 <sup>a</sup> $\pm 4.330$	152.331 <sup>a</sup> $\pm 8.252$	19.796 <sup>a</sup> $\pm 0.708$	16.782 <sup>a</sup> $\pm 0.512$	12.758 <sup>a</sup> $\pm 0.548$
nutrilake	77.848 <sup>b</sup> $\pm 1.851$	133.830 <sup>a</sup> $\pm 5.730$	17.843 <sup>a</sup> $\pm 0.988$	13.434 <sup>b</sup> $\pm 0.529$	11.005 <sup>b</sup> $\pm 0.552$
Probabilidad	$P \leq 0.001^*$	$P \leq 0.001^*$	$P = 0.232$	$P < 0.001^*$	$P = 0.034^*$

---

## CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

La diatomea bentónica *Navicula sp.* se utiliza en el cultivo larvario de camarón (Curbelo, *et al.*, 2006), por lo que un medio que promueva un rápido crecimiento y buena calidad nutricional permite reducir el tiempo de cultivo y hacer un uso eficiente de las instalaciones en los laboratorios productores de postlarvas.

Cuando se evaluaron los medios de cultivo con simple proporción de silicatos, la especie sometida a estudio creció mejor en los medios h y f entre el segundo y tercer día. Esto era de esperarse debido a que los medios de cultivo h/2 y f/2 contienen la mitad de las concentraciones de los nutrientes de los otros dos. Resultados similares encontró Curbelo *et al.* (2006) para *Navicula sp.* al 4to día de cultivo con el medio h y Leal *et al.* (2010) para *Amphora sp.*

Sin embargo, Simental-Trinidad *et al.* (2001) encontraron para *Nitzschia laevis* el mejor crecimiento entre el sexto y octavo día de cultivo utilizando fertilizantes agrícolas. Si bien el fertilizante comercial es bueno utilizarlo porque abarata el costo de producción, el tiempo de cultivo se lo incrementa, por lo que no resulta rentable sostener un cultivo con fines productivos, máxime si es para emplearse en la alimentación de pequeños organismos, donde la manipulación de tantos días de cultivo puede ser fuente de contaminación.

A diferencia de otras diatomeas bentónicas estudiadas, *Navicula sp.* mostró una velocidad de crecimiento alta, la que alcanzó la fase de crecimiento lento al 3er día. Al respecto Curbelo *et al.* (2004), con una especie del mismo género reportó cuatro días para la misma fase y densidades por encima de  $2000 \times 10^3 \text{ ceL.mL}^{-1}$  mayores a la reportada en el presente estudio. Esto se le atribuye a que el tamaño del inóculo inicial fue diferente y es un factor que condiciona el crecimiento acelerado del cultivo. Otros autores como Leal *et al.* (2010) obtuvieron entre el 4to y el 6to día valores cercanos a las  $1\ 000 \times 10^3 \text{ ceL.mL}^{-1}$  en el medio h para *Amphora sp.*

Cuando se utilizó la doble proporción de silicatos en los medios estudiados, se vio favorecido el medio hs. Esto puede deberse a que este medio es una variante del f/2 descrito por Guillard, que duplica los nutrientes mayores y menores además de incluir  $53 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloruro de amonio (1,0 mM). La incorporación de amonio (N –  $\text{NH}_4$ ) al medio trae consigo la modificación de las concentraciones de nutrientes debido a que incorpora una fuente adicional de nitrógeno y propicia un cambio en la relación N:P (Curbelo *et al.*, 2004) que favorece, en este caso, el crecimiento de la microalga.

Del mismo modo, éste comportamiento en el crecimiento ante una fuente de nitrógeno en forma de amonio ha sido observado con otras especies de microalgas como *Amphora cf. marina* (Plasencia *et al.*, 2004), *Rhodomonas* sp. (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005) y *Amphora* sp. (Curbelo, 2010).

En la Clase Bacillariophyceae, la presencia de silicatos es muy importante por ser un elemento indispensable en la formación de los frústulos (Curbelo, 2010). Las diatomeas bentónicas tienden a tener más cenizas debido al volumen de sílice de los frústulos que es relativamente espeso (Affan *et al.*, 2007). Otros autores como Raniello *et al.*, (2007) encontraron que la adición de una doble concentración de silicatos en el medio f/2 mejoró la tasa de crecimiento exponencial y produjo mayor densidad de células en la diatomea bentónica *Cocconeis neothumensis*.

Por otra parte, Curbelo (2010) refiere en *Amphora* sp. que, además de mejorar de forma significativa la tasa de crecimiento y la densidad celular, un desfase en la etapa exponencial de cultivo, de cuatro días con silicato sencillo a cinco cuando se empleó doble, resulta recomendable por ser más económico y por eso propone el uso de f/2s. Esto no se observa en el presente estudio, probablemente, porque los requerimientos de sílice para esta diatomea bentónica no son tan exigentes como otras anteriormente descritas.

La línea de productos Nutrilake (Nutralake y Nutrilake-P) ha sido probada en todo el mundo como la única línea de fertilizantes especialmente diseñada para la acuicultura,

mostrando ventajas como promotor del fitobentos, regulador ecológico y promotor del crecimiento de microalgas bentónicas en estanques de camarón. Debido a su presencia de sodio produce un efecto alcalinizante permitiendo mantener el pH adecuado para el desarrollo del cultivo y el aprovechamiento del fósforo. Aportan el 100% del N en forma nítrica lo que implica su disponibilidad inmediata por parte de las microalgas. El aporte de silicato soluble y algunos minerales como Mg, I<sub>2</sub>, Bo y K ayuda a las necesidades de estos elementos en las microalgas. Su uso más recomendado ha sido para estanques, sin embargo Leal *et al.* (2007) lo recomiendan para todo el proceso del aumento progresivo de volumen a partir de 5 L, en diatomeas planctónicas como *Chaetoceros* spp. y *Thalassiosira weissflogii* a razón de 200 mg.L<sup>-1</sup>. Todo esto fundamenta las mayores densidades encontradas en el presente trabajo, con *Navicula* sp., al 4to día de cultivo.

Las mayores tasas de crecimiento en los cultivos con silicato simple fueron el primer día, lo que coincide con lo observado por Simental y Sánchez-Saavedra (2003) y Curbelo (2010) y los medio h y f tuvieron tasas de crecimiento acumulada superiores que nos demuestran el mejor aprovechamiento de estos medios, con mayor concentración de los distintos nutrientes, por parte de esta especie.

Hay que destacar que no todas las especies, incluso dentro del mismo género, tienen la misma tasa de crecimiento. Así, Simental y Sánchez-Saavedra (2003) reportaron tasas de crecimiento máximas de 2.9 para *Nitzschia laevis*, de 4.44 para *Nitzschia thermalis* var. *minor* y de 5.3 para *Navicula incerta*, cultivadas en medio f/2.

Cuando se adicionó doble proporción de silicatos, la tasa de crecimiento acumulado resultó similar a las obtenidas para el primer experimento, siendo los medios h y f superiores y significativamente diferentes de los otros, sin embargo, la tasa de crecimiento diario fue gradual los dos primeros días lo que lleva a pensar en una adaptación de la célula ante un medio que tiene doble concentración de un nutriente.

Valores inferiores a los encontrados en el presente trabajo los reporta Affan *et al.*, (2006) para *Grammatophora marina* y Khatoon *et al.* (2010) para *Amphora* sp., *Navicula* sp. y *Cymbella* sp.

Las condiciones a que se sometieron los cultivos en el presente trabajo fueron buenas para lograr una fase de latencia muy corta con una tasa de crecimiento alta, que resulta beneficioso cuando se quieren obtener grandes cantidades de biomasa en el menor tiempo posible.

Los valores negativos de la tasa de crecimiento están dados por la disminución de la concentración celular del cultivo. Con el uso del silicato sencillo estos valores se presentaron a partir del 3er día en los medios con simple proporción de silicatos, esto puede deberse a la alta productividad de biomasa microalgal el 1er día de cultivo, lo que evidenció limitación de nutrientes al 3er día, que pudiera ser el silicato, ya que con la adición de su doble proporción estos valores se observaron al 4to, lo que hizo desfazar el valor de  $\mu_0$  un día más. Con la incorporación de fertilizantes comerciales como fuente de nitrógeno al medio f fue evidente la presencia de estos valores negativos al 5to día, lo que demostró un efecto positivo sobre la tasa de crecimiento.

Cuando hacemos cultivos de microalgas con fines de alimentación es importante obtener buenas concentraciones, pero no se puede descuidar el valor nutricional de la especie que estamos ofreciendo como alimento.

El valor nutricional de un alga es un factor importante para las dietas de los animales marinos (Knucklet *et al.*, 2002), sin embargo, diversos son los factores que inciden en el, dentro de los cuales se incluyen la temperatura de cultivo (Thompson *et al.*, 1992), el medio de cultivo y la composición de nutrientes (Fabregas *et al.*, 1986; Wilkfors, 1986), el fotoperíodo (Sicko-Goad y Andersen, 1991), la intensidad de la luz y longitud de onda (Figueroa *et al.*, 1996; Sánchez– Saavedra y Voltolina, 1996); variables que se pueden manejar en dependencia de los propósitos de trabajo.

---

La acumulación de proteínas en *Navicula* sp. que se obtuvieron en el experimento con simple y doble proporción de silicatos de este estudio se vieron favorecidos, además del nitrato, por la presencia de amonio en los medios h/2, h, h/2s y hs. Estos resultados son inferiores a los que encontraron Simental-Trinidad *et al.*, (2001) en *Navicula incerta* (35%) y *Nitzschia thermalis* (34%), Gordon *et al.* (2006) en *Nitzschia leavis* (38%), *Navicula cf. lenzii* y *Amphora luciae* (32%) y Curbelo (2010) para *Amphora* sp. (30%), todas durante la fase de crecimiento exponencial en el medio f/2. Como puede verse se trata de especies diferentes y no necesariamente deben coincidir en los valores.

Sin embargo, Courtois *et al.*, (2012) encontraron valores de proteínas menores a los reportados en el presente estudio, para *Navicula incerta* (13%), determinados al 2do día de cultivo.

Khatoon *et al.*, (2010) reportó entre un 40 y 50% de proteínas para *Navicula* sp. a salinidades entre 15 y 25 g.L<sup>-1</sup>, lo que confirma que las microalgas se pueden manipular en dependencia de los intereses del cultivador.

El contenido de lípidos en los medios f y f/2 en este estudio fue similar al obtenido por Simental-Trinidad *et al.* (2001) para *Nitzschia laevis* y por Leal *et al.* (2010) para *Amphora* sp., ambas especies cultivadas en el medio f/2. Sin embargo, los primeros autores reportaron para *N. thermalis* var. *minor* en medio f/2, cantidades de lípidos menores (21%) a los obtenidos en este trabajo en el medio h (25%) y para *Navicula incerta* en el mismo medio de 13%.

Otro reporte sobre lípidos totales en ciertos géneros y especies de diatomeas bentónicas es el de Barashkov (1972), el cual logró porcentajes, en *Navicula* sp., entre 35 - 44%, valores superiores a los nuestros y para *Nitzschia closterium* entre 24 – 28%, similares a los medios h y h/2 en este estudio, lo que confirma que no todas las especies tienen la misma composición bioquímica, así se cultiven en las mismas condiciones.

Courtois *et al.* (2012), reportó para *Navicula incerta* 6% de lípidos al 2do día de cultivo, lo que fue muy inferior a los que se alcanzaron para *Navicula* sp. en los medios con simple y doble proporción de silicatos al 3ro y 4to día respectivamente. Dada la importancia que tiene el contenido lipídico del alimento para suministrarlo a postlarvas de camarón, es necesario tener en cuenta el día de cosecha y las condiciones del cultivo con vista a lograr una microalga que le aporte a la larva los ácidos grasos que requiere para esta etapa.

Estudios realizados en *Navicula* sp. revelaron porcentajes de lípidos entre 20 y 25% para salinidades entre 15 y 25 g.L<sup>-1</sup> (Khatoon *et al.*, 2010) y para cultivos controlados (26%) y no controlados (38%) en *Amhora* sp. (Peña, 2007).

El contenido de carbohidratos de *Navicula* sp. en los diferentes medios fue similar a los obtenidos por Simental- Trinidad *et al.* (2001), que encontraron entre 7 y 13% para *Nitzschia thermalis*, *N. laevis* y *Navicula incerta*, al 4to día de cultivo y mayores de Curbelo (2010) en otra especie de diatomea bentónica.

Diferentes autores plantean que las microalgas, durante la fase de crecimiento logarítmica retardada, contienen de 30 a 40% de proteínas, de 10 a 20% de lípidos y de 5 a 15% de carbohidratos (Brown *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1999). Estos reportes se corresponden con los valores que logró Flores-Vergara (1998) y Curbelo (2010) para diatomeas bentónicas y los que se obtuvieron en este estudio para los ocho medios estudiados.

Otros autores como Affan *et al.*, (2006) obtuvieron para *Grammatophora marina*, proteínas (5%), lípidos (15,82%) y carbohidratos (5.65%) y Affan *et al.* (2007) para *N. incerta*, 7% de proteínas, 1,7% de lípidos y 12,8% de carbohidratos, después de dos semanas de cultivo. Estos valores no se corresponden a los reportes de proteínas citados anteriormente, ya que a ese tiempo de cultivo hay limitación de nitrógeno y su ausencia en el medio y puede ser la causa de la disminución del contenido de proteínas, además en este caso, la fase de cultivo predominante es la de declinación o

muerte regresiva. En cambio la cantidad de carbohidratos se mantiene en el rango según los reportes anteriores, lo que parece indicar que el porcentaje de carbohidratos en las diatomeas bentónicas se mantiene constante en la fase de declinación.

El contenido de proteínas (17-19%), lípidos (13-17%) y carbohidratos (11-12%) en los medios con fertilizantes agrícolas fue máximo en presencia de urea. Estos resultados

son menores a los que obtuvo Simental- Trinidad *et al.* (2001) para las proteínas en un medio no convencional al 4to día, lo cual se debió a que emplearon en la misma fórmula de fertilización tres fuentes de nitrógeno: nitrato, amonio y urea, lo que según Simental y Sánchez-Saavedra (2003) pueden considerarse buenos nutrientes para estas microalgas. Esto hace que se considere el empleo de diferentes fuentes de nitrógeno ya que pudo condicionar el porcentaje de proteínas en la especie *Navicula incerta* por encima de 30%. Sin embargo, el contenido de lípidos fue ligeramente superior en nuestro estudio al de ellos, aunque los porcentajes de carbohidratos que obtuvieron ellos fueron similares respecto al medio con urea.

En los medios con simple proporción de silicatos los valores máximos de peso orgánico y peso seco se favorecieron en el medio menos rico en nutrientes (f/2), sin embargo con la adición del silicato doble a los medios estudiados estos valores se vieron incrementados con la riqueza de los medios. Hay que destacar que los máximos valores de peso orgánico y seco coinciden con los de menor concentración microalgal en los tres experimentos y viceversa.

Este comportamiento de la no correspondencia entre los valores de concentración y peso orgánico y seco en las diatomeas bentónicas ha sido observado por otros autores (Curbelo, 2010), debido posiblemente a la adición de la doble proporción de silicatos al medio, lo que contrasta de los resultados de este trabajo, donde los experimentos donde no se adicionó la doble proporción de silicatos tienen este mismo comportamiento, y esto puede deberse a que las cantidades de sílice que se emplearon

en los experimentos 1 y 3 satisfacen los requerimientos nutricionales de esta microalga en nuestras condiciones.

Al respecto Simental y Sánchez-Saavedra (2001) plantean que la alta densidad celular en los cultivos implica en las diatomeas pérdida en el tamaño celular y con ello la disminución en la producción de biomasa y señalaron que el alto contenido de cenizas que producen las diatomeas bentónicas en cultivo podrían ser originadas por los requisitos de sílice para la formación de los frústulos.

Werner (1977), plantea que muchas diatomeas pueden ser capaces de captar y almacenar de forma continua determinadas cantidades de sílice en sus vacuolas, por lo que las diatomeas tienen una gran dependencia del sílice para la generación de los frústulos.

Los resultados de este trabajo coinciden con los de un estudio realizado con las diatomeas *Navicula salinarum* y *Thalassiosira weissflogii* por Vrieling *et al.* (1999) donde reportaron que el contenido de este mineral en las células puede variar y depende de las condiciones del cultivo, por lo tanto la relación peso total: peso orgánico puede presentar cambios y no necesariamente tiene que existir una correspondencia entre ellos, lo cual se apreció en estos resultados, donde el menor valor de la biomasa correspondió con el mayor valor de peso orgánico y seco en todos los medios que se estudiaron.

### **5.3 Análisis económico**

El aumento progresivo de volúmenes hasta 25 L de esta especie es de 179.5 L y como se emplea de la solución de trabajo de sales  $1\text{ml.L}^{-1}$  de agua de mar, el frasco de 1 L dura aproximadamente 6 días de trabajo, lo que nos lleva a preparar 2.5 L mensuales de esta solución.

El análisis económico de los tres medios reveló que es más económico emplear como fuente de nitrógeno en el medio Guillard f a la urea, ya que reduce los costos en \$ 30.00 CUP y \$ 205.68 CUC por cada litro de medio a preparar anualmente (Tabla 6), además de ser de los dos fertilizantes agrícolas el más rico en nutrientes.

Tabla 6. Costo y ahorro anual de las diferentes fuentes de nitrógeno en el medio Guillard F, de 1 L de la solución de sales, empleadas en el cultivo de la diatomea bentónica *Navicula* sp.

Fuentes de Nitrógeno	Proporción (mg.L-1)	Costo (1L)		Ahorro (Anual)	
		(CUC)	(USD)	(CUC)	(USD)
NaNO <sub>3</sub> (p.a.)	150	31.44	205.68	-	-
Urea (comercial)	150	1.45	-	30.00	205.68
Nutrilake (comercial)	200	35.46	49.17	-4.02	156.51

Si el costo anual del medio de cultivo Guillard f está valorado en \$ 3 330.605 CUP y \$ 1 279.9257 USD, se ahorra por este concepto el 0.9% de la primera moneda y el 16 % de la segunda.

Existen estudios relacionados con el empleo de fertilizantes agrícolas ya sea en medios de cultivos o en fórmulas de fertilización para abaratar los costos de producción (González-Rodríguez y Maestrini, 1984; López-Elías y Voltolina, 1993; Gracida-Valdepeña, 1999). El más reciente es el de Simental y Sánchez-Saavedra (2003), los que emplearon un medio no convencional y lo compararon con el tradicional f/2, en el cultivo de las diatomeas bentónicas *Nitzschia laevis*, *Nitzschia thermalis* var. *minor* y *Navicula incerta*, los que concluyen que el medio no convencional, con fertilizantes agrícolas, no afecta la producción de biomasa microalgal y reducen el costo del medio con fertilizantes agrícolas 12.5% menos que el f/2 de Guillard tradicional.

En este caso se reduce más el costo del medio ya que sólo se sustituyó el nitrato de sodio que es un reactivo químico para análisis y su precio es alto en el mercado a

través de terceros países, comparado con la urea que es de grado agrícola y se obtiene directamente del país que la produce.

Si la reducción del costo del medio de cultivo fue de 16.9 % solo con la sustitución de la fuente de nitrógeno, se pueden probar otros componentes del medio Guillard por fertilizantes agrícolas para minimizar aún más el costo del medio.

## CONCLUSIONES

1. La simple proporción de silicatos favorece los valores de concentración en el medio Guillard f, la tasa de crecimiento y tasa de crecimiento acumulada para los medios más enriquecidos (f y h).
2. La composición proximal aumentó en los medios con amonio h y h/2, al igual que la composición orgánica con la disminución de la riqueza nutricional en el medio f/2.
3. Con la adición de la doble proporción de silicatos al medio de cultivo, se favorece el Hs, la tasa de crecimiento acumulada y la composición orgánica se incrementaron con las riquezas de los medios, y la composición proximal dependió de la incorporación de amonio al medio.
4. El empleo de la Urea en sustitución del  $\text{NaNO}_3$  en el medio Guillard f tiene un efecto positivo sobre la tasa de crecimiento ( $\mu_0$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu_0$ ), e influye de forma significativa en la composición proximal y orgánica de la microalga *Navicula* sp. en cultivo, con un ahorro del 16.9% del costo del medio de cultivo.

## RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones donde se evalúe la sustitución de los demás componentes del medio Guillard f, por fertilizantes agrícolas, en la diatomea bentónica *Navicula* sp. sin afectar la producción de biomasa microalgal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acien-Fernández, F.G., García-Camacho, F., Sánchez-Pérez, J.A., Fernández-Sevilla, J.M. & Molina-Grima, E. (2000). Modeling of eicosapentanoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricornutum* cultures in tubular photobioreactors. Effects dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 173-183.
- Alfonso, E. & Leal, S. (1999). *Manual para la creación y mantenimiento de un cepario de microalgas marinas*. Universidad de la Habana, Centro de Investigaciones Marinas, 20 pp.
- Almaguer, Y., Alfonso, E. & Leal, S. (2004). Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Rev. Invest. Mar.*, 25(1), 57-64.
- Affan, A., Karawita, R., Jeon, Y., Kim, B. & Lee, J. (2006). Growth characteristics, biochemical composition and antioxidant activities of benthic diatom *Grammatophora marina* from Jeju coast, Korea. *Algae*, 21(1), 141-148.
- Affan, A., Karawita, R., Jeon, Y. & Lee, J. (2007). Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (Bacillariophyceae) from Jeju island, Korea. *J. Phycol.*, 43, 823-832.
- Andersen, R.A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. Inglaterra.
- Arredondo-Vega, B.O. & Voltolina, D. (2007a). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: B.O. Arredondo y D. Voltolina, (Eds) *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp.17-26). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, B.C.S., México.
- Barashkov, G.K. (1972). *Sravnitel'naya biokhimiya vodorosley. Comparative biochemistry of algae*. Pishch. Prom. Press, Moscow, Rusia.
- Bligh, E.G. Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315-331.

- Carrillo, O., Vega-Villasante, F., Nolasco, E. & Gallardo, N. (2001). Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento del camarón. *Panorama Acuícola*, 6(5), 14-17.
- Cook, M.E. & Gram, L.E. (1999). Evolution of plasmodesmata. En: A. Van Bel y C. Kesteren (Eds). *Plasmodesmata: Nanochannels with megatasks*. Springer-Verlang, Berlin Germany. 101-117 pp.
- Curbelo, R. (2010). Aislamiento, método de cuantificación y cultivo de una diatomea bentónica para alimentar postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vanamei*. Tesis de Maestría para la obtención del título de Máster en Biología Marina y Acuicultura, Centro de investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Cuba.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., Quintana, P., Banguela, I. Muñoz, D. et al. (2004). Cultivo de la microalga bentónica *Navicula* sp. para la alimentación de las primeras postlarvas de camarón blanco. *Rev. Invest. Mar.*, 25(2), 143-150.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., & Almaguer, Y. (2006). Alimentación de las primeras postlarvas de camarón *Litopenaeus schmitti* con una especie de diatomea bentónica. *Rev. Invest. Mar.*, 27(3), 231-236.
- Courtois, G., Porta, A., Viera, M.P., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S. (2012). Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. *J. Appl. Phycol.*, on line: 24 febrero.
- De la Peña, M.R. (2007). Cell growth and nutritive value of the tropical benthic diatom, *Amphora* sp. At varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. *J. Appl. Phycol.*, 19, 647-655.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebars, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analyt. Chem.*, 28, 350-356.
- Figueroa, F.L., Jiménez, C., Pérez-Lloréns, J.L. & Niell, F.X. (1996). Underwater Light and Algal Photobiology. *Scientia Marina*, 60(1), 1-343.

- Flores-Vergara, C. (1998). Crecimiento y composición química de microalgas bentónicas bajo diferentes condiciones de temperatura y luz. Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.
- González-Rodríguez, E. & Maestrini, S.Y. (1984): The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. *Aquaculture*, 36, 245-256.
- Gordon, N., Neori, A., Shpigel, M., Lee, J. & Harpaz, S. (2006). Effect of diatom diets growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture*, 252, 225-233.
- Gracida-Valdepeña, M.L. (1999). Producción de tres especies de diatomeas utilizando una mezcla de fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México.
- Graham, E.L. & Wilcox L.W. (2000). *Algae*. United States. Prentice Hall.
- Griffith, D.R.W., Laborde E. & Wigglesworth J.M. (1992). Biological and economic of penaeid larval rearing using benthic diatoms. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, pp: 101–105.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In W.L. Smith & M.H. Chanley (Eds): *Culture of Marine Invertebrates Animals* (pp. 29-60).
- Guillard, R. R. L. & Ryther R. J. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacae* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239.
- Hasle, G.R. & Syvertsen, E.E. (1997). Marine diatoms. In Tomas CR (Ed.) *Identifying marine phytoplankton*: 5-385 (pp. 387-584). Academic Press, United States.
- Jiménez Santistevan, R. (1976). Diatomeas y silicoflagelados del fitoplancton del Golfo de Guayaquil. Dpto. de Ciencias del Mar. Div. de Biología Marina. Ecuador. 30p.

- Khatoon, H., Banerjee, S., Yusoff, M.D., & Shariff, M. 2010. Effects of salinity on the growth and proximate composition of selected tropical marine periphytic diatoms and cyanobacteria. *Aquaculture Research*, 41, 1348-1355.
- Knuckey., R.M., Brown, M.R., Barret, S.M. & Hallegraeff, G.M. (2002). Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 211, 253-274.
- Leal, S., Curbelo, R., Torres, B.M., Núñez, N., García, B., Muñoz, D. *et al.* (2007). Nutrilake, fertilizante utilizado para el cultivo de microalgas marinas en sistemas controlados. Cuba, Evento Pesca 2007, Resúmenes, p.30.
- Leal, S., Miranda, A., Curbelo, R. & Hernández, J. (2010). Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. México, Nuevo León. *X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, CD-ROM, pp. 559-580.
- Leal, S., Curbelo, R., Vega, X., Núñez, N. & Hernández, J. (2012): Método de dispersión de biopelículas en cultivos de la diatomea bentónica *Amphora* sp. para facilitar el conteo directo. *Serie Ocenológica*, 10, 23-29.
- Leonardos, N. & Lucas, IAN. (2000). The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 182, 301-315.
- Liang, Y. Mai, K.S., Sun, S.C. & Yu, D.Z. (2001). Effect of light intensity on the total lipid and fatty acid composition of six strains of marine diatoms. *J. Oceanol. Limnol.*, 19, 249-254.
- Liang, Y. Mai, K.S. & Sun, S.C. (2002). Effect of harvest stage on the total lipid and fatty acid composition of the four *Cylindrotheca* strains. *J. Oceanol. Limnol.*, 20, 157-161.
- López-Elías, J.A. & Voltolina, D. (1993). Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*, 19 (2), 169-180.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

- Martínez, L. 1987. Cultivo de fitoplancton como alimento de larvas del camarón blanco *Penaeus schmitti*. Tesis de Maestría para la obtención del título Máster en Biología Marina y Acuicultura, Centro de investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Cuba.
- Mercado, J.M., Sánchez-Saavedra, M.P., Correa-Reyes, G., Lubián, L., Montero, O. & Figueroa, F. L.(2004). Blue light on growth, light adsorption characteristic and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany*, 78, 265-277.
- Miranda-Baeza, A., Voltolina D., Brambilla-Gómez M.A., Frías-Espericueta M.G & Simental J. (2007). Effluent characteristics and nutrient loading of a semi-intensive shrimp farm in NW Mexico. *Vie et Milieu/Life & Environment.*, 57(1/2), 21-26.
- Milke, L.M., Bricelj, M., Parrish, C.C.(2008). Biochemical characterization and nutritional value of three *Pavlova* spp. In unialgal and mixed diets with *Chaetoceros muelleri* for postlarval sea scallops. *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 276, 130-142.
- Moreno, J. L., Licea, S. & H. Santoyo (1996): *Diatomeas del Golfo de California*. Universidad Autónoma de Baja California Sur (Eds.)( 272pp), México.
- Norton, T.A., Melkonian, M. & Andersen, R.A. (1996). Algal biodiversity. *Phycol.*, 35. 308-326.
- Olivera, A. (2002). Valor nutricional das microalgas. *Revista da ABCC, Año 4(2)*,63-68.
- Oxa Gallegos, P. (2005). La acuicultura, la agronomía marina y la agronomía acuícola microalgal. *IDESA*, 23(3), 77-78.
- Peterson, J.J. & Curiel, J.I. (2002). Larvicultura de camarão aprimorada como uso de diatomáceas. *Revista da ABCC, Año 4(2)*, 40-42.
- Plasencia, A., Leal, S., Voltolina, D. & Curbelo, R. (2004). Cultivo de la diatomea bentónica *Amphora* cf. marina con una zeolita cubana enriquecida. *Rev. Invest. Mar.*, 25(2), 151-158.
- Raniello R., Iannicelli, M., Nappo, M., Avila, C., & Zupo, V. (2007). Production of *Cocconeis neothumensis* (Bacillariophyceae) biomass in batch cultures and

- bioreactors for biotechnological applications: light and nutrient requirements. *J. Appl. Phycol.*, 19, 383–391.
- Renaud, S.M., Thinh, L.V. & Parry, D.L. (1999). The gross composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170, 147-159.
- Roberts, R., Kawamura, T., Tanaki, H. (2000). Diatoms for abalone culture : a workshop for abalona farmers. New Zeland, 4th International Abalone Symposium, Cawthron Report No. 547, p. 28.
- Sánchez-Saavedra, M. P. (2006). The effect of cold storage on cell viability and composition of two benthic diatoms [ Versión electronic ]. *Aquaculture Engineering*, 34, 131-136.
- Sánchez-Saavedra, M. P. & Voltolina, D. (1996). Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *J. Applied Phycol.*, 8, 131-137.
- Sheskin, D. (2007). *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. (pp.241-255). Chapman & Hall, CRC, Boca Raton.
- Sicko-Goad, L. & Andersen, N.A. (1991). Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *J. Phycol.*, 27, 710-718.
- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P. & Correa-Reyes, J.G. (2001). Biochemical composition of benthic marine diatoms using as cultured medium a common agricultural fertilizer. *J. of Shellfish Research*, 20(2), 611-617.
- Simental, J.A. & Sánchez-Saavedra, M.P. (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquaculture Engineering*, 27, 265-272.
- Tadros, M.G. & J.R. Johansen, J.R. (1988). Physiological characterization of six lipid producing diatom from the south-eastern, U.S. *J. Phycol.*, 24, 445-452.
- Thompson, P.A., Guo, M.X. & P.J. Harrison .1992. Effects of variation in temperature on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J. of Phycol.*, 28, 448-497.

- Trujillo V., M.L. Voltolina, D. (1994). Cultivos de microalgas para la acuicultura. Tópicos Selectos sobre Microalgas *Serie Científica, No. Especial (2)1*, 73-85.
- Valenzuela-Espinoza E., Lafarga-De la Cruz, F., Millán-Núñez, R. & Núñez-Cebrero, F. (2005). Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Cienc. Mar.*, 31 (1A), 79-89.
- Voltolina, D. (1991). A comparison of methods for the dispersion of cultures of benthic diatoms. *Criptogamie Algol.*, 12(3), 183-187.
- Voltolina, D. (1994). Cultivo de microalgas bentónicas para la alimentación de juveniles de abulón (*Haliotis* spp). Tópicos Selectos sobre Microalgas, *Serie Científica*, 2(1), 87-97.
- Vonshak, A. (1993). Laboratory growth techniques and the biotechnology of biomass production. In Hall *et al.*, (Eds.) *Photosynthesis and production in a changing environment* (464 pp.), Chapman & Hall, London.
- Vrieling, E., Poort, L., Beelen, T., & Gieskes, W. (1999). Growth and silica content of the diatoms *Thalassiosira weissflogii* and *Navicula salinarum* at different salinities and enrichments with aluminium. *European Journal of Phycology*, 34, 307-316.
- Werner, D. (1977). *The biology of the Diatoms*. Botanical Monographs, vol.13, (498 pp.) Berkeley, University of California Press.
- Wilkfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 59, 1-14.
- Xing, R.I., Wang, C.H., Cao, X.B. & Chang, Y.Q. 2007. The potential value of different species of benthic diatoms as food for newly metamorphosed sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture*, 263, 142-149.

## BIBLIOGRFÍAS EN ZOTERO

- Acien-Fernández, F.G., García-Camacho, F., Sánchez-Pérez, J.A., Fernández-Sevilla, J.M. & Molina-Grima, E. (2000). Modeling of eicosapentanoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricornutum* cultures in tubular photobioreactors. Effects dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 173-183.
- Alfonso, E. & Leal, S. (1999). *Manual para la creación y mantenimiento de un cepario de microalgas marinas*. Universidad de la Habana, Centro de Investigaciones Marinas, 20 pp.
- Almaguer, Y., Alfonso, E. & Leal, S. (2004). Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Rev. Invest. Mar.*, 25(1), 57-64.
- Affan, A., Karawita, R., Jeon, Y., Kim, B. & Lee, J. (2006). Growth characteristics, bio-chemical composition and antioxidant activities of benthic diatom *Grammatophora marina* from Jeju coast, Korea. *Algae*, 21(1), 141-148.
- Affan, A., Karawita, R., Jeon, Y. & Lee, J. (2007). Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (Bacillariophyceae) from Jeju island, Korea. *J. Phycol.*, 43, 823-832.
- Andersen, R.A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. Inglaterra.
- Arredondo-Vega, B.O. & Voltolina, D. (2007a). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: B.O. Arredondo y D. Voltolina, (Eds) *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp.17-26). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, B.C.S., México.
- Barashkov, G.K. (1972). *Sravnitel'naya biokhimiya vodorosley. Comparative biochemistry of algae*. Pishch. Prom. Press, Moscow, Rusia.
- Bligh, E.G. Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315-331.
- Carrillo, O., Vega-Villasante, F., Nolasco, E. & Gallardo, N. (2001). Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento del camarón. *Panorama Acuícola*, 6(5), 14-17.

- Cook, M.E. & Gram, L.E. (1999). Evolution of plasmodesmata. En: A. Van Bel y C. Kesteren (Eds). *Plasmodesmata: Nanochannels with megatasks*. Springer-Verlag, Berlin Germany. 101-117 pp.
- Curbelo, R. (2010). Aislamiento, método de cuantificación y cultivo de una diatomea bentónica para alimentar postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vanamei*. Tesis de Maestría para la obtención del título de Máster en Biología Marina y Acuicultura, Centro de investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Cuba.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., Quintana, P., Banguela, I. Muñoz, D. *et al.* (2004). Cultivo de la microalga bentónica *Navicula* sp. para la alimentación de las primeras postlarvas de camarón blanco. *Rev. Invest. Mar.*, 25(2), 143-150.
- Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., & Almaguer, Y. (2006). Alimentación de las primeras postlarvas de camarón *Litopenaeus schmitti* con una especie de diatomea bentónica. *Rev. Invest. Mar.*, 27(3), 231-236.
- Courtois, G., Porta, A., Viera, M.P., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S. (2012). Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. *J. Appl. Phycol.*, on line: 24 febrero.
- De la Peña, M.R. (2007). Cell growth and nutritive value of the tropical benthic diatom, *Amphora* sp. At varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. *J. Appl. Phycol.*, 19, 647-655.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebars, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analyt. Chem.*, 28, 350-356.
- Figuroa, F.L., Jiménez, C., Pérez-Lloréns, J.L. & Niell, F.X. (1996). Underwater Light and Algal Photobiology. *Scientia Marina*, 60(1), 1-343
- Flores-Vergara, C. (1998). Crecimiento y composición química de microalgas bentónicas bajo diferentes condiciones de temperatura y luz. Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.
- González-Rodríguez, E. & Maestrini, S.Y. (1984): The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. *Aquaculture*, 36, 245-256.
- Gordon, N., Neori, A., Shpigel, M., Lee, J. & Harpaz, S. (2006). Effect of diatom diets growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture*, 252, 225-233.

- Gracida-Valdepeña, M.L. (1999). Producción de tres especies de diatomeas utilizando una mezcla de fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México.
- Graham, E.L. & Wilcox L.W. (2000). *Algae*. United States. Prentice Hall.
- Griffith, D.R.W., Laborde E. & Wigglesworth J.M. (1992). Biological and economic of penaeid larval rearing using benthic diatoms. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, pp: 101–105.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In W.L. Smith & M.H. Chanley (Eds): *Culture of Marine Invertebrates Animals* (pp. 29-60).
- Guillard, R. R. L. & Ryther R. J. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacae* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239.
- Hasle, G.R. & Syvertsen, E.E. (1997). Marine diatoms. In Tomas CR (Ed.) *Identifying marine phytoplankton*: 5-385 (pp. 387-584). Academic Press, United States.
- Jiménez Santistevan, R. (1976). Diatomeas y silicoflagelados del fitoplancton del Golfo de Guayaquil. Dpto. de Ciencias del Mar. Div. de Biología Marina. Ecuador. 30p.
- Khatoon, H., Banerjee, S., Yusoff. M.D., & Shariff, M. 2010. Effects of salinity on the growth and proximate composition of selected tropical marine periphytic diatoms and cyanobacteria. *Aquaculture Research*, 41, 1348-1355.
- Knuckey., R.M., Brown, M.R., Barret, S.M. & Hallegraeff, G.M. (2002). Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 211, 253-274.
- Leal, S., Curbelo, R., Torres, B.M., Núñez, N., García, B., Muñoz, D. *et al.* (2007). Nutrilake, fertilizante utilizado para el cultivo de microalgas marinas en sistemas controlados. Cuba, Evento Pesca 2007, Resúmenes, p.30.
- Leal, S., Miranda, A., Curbelo, R. & Hernández, J. (2010). Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. México, Nuevo León. *X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, CD-ROM, pp. 559-580.

- Leal, S., Curbelo, R., Vega, X., Núñez, N. & Hernández, J. (2012): Método de dispersión de biopelículas en cultivos de la diatomea bentónica *Amphora* sp. para facilitar el conteo directo. *Serie Ocenológica*, 10, 23-29.
- Leonardos, N. & Lucas, IAN. (2000). The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 182, 301-315.
- Liang, Y. Mai, K.S., Sun, S.C. & Yu, D.Z. (2001). Effect of light intensity on the total lipid and fatty acid composition of six strains of marine diatoms. *J. Oceanol. Limnol.*, 19, 249-254.
- Liang, Y. Mai, K.S. & Sun, S.C. (2002). Effect of harvest stage on the total lipid and fatty acid composition of the four *Cylindrotheca* strains. *J. Oceanol. Limnol.*, 20, 157-161.
- López-Elías, J.A. & Voltolina, D. (1993). Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*, 19 (2), 169-180.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Martínez, L. 1987. Cultivo de fitoplancton como alimento de larvas del camarón blanco *Penaeus schmitti*. Tesis de Maestría para la obtención del título Máster en Biología Marina y Acuicultura, Centro de investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Cuba.
- Mercado, J.M., Sánchez-Saavedra, M.P., Correa-Reyes, G., Lubián, L., Montero, O. & Figueroa, F. L.(2004). Blue light on growth, light adsorption characteristic and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany*, 78, 265-277.
- Miranda-Baeza, A., Voltolina D., Brambilla-Gómez M.A., Frías-Espericueta M.G & Simental J. (2007). Effluent characteristics and nutrient loading of a semi-intensive shrimp farm in NW Mexico. *Vie et Milieu/Life & Environment.*, 57(1/2), 21-26.
- Milke, L.M., Bricelj, M., Parrish, C.C.(2008). Biochemical characterization and nutritional value of three *Pavlova* spp. In unialgal and mixed diets with *Chaetoceros muelleri* for postlarval sea scallops. *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 276, 130-142.
- Moreno, J. L., Licea, S. & H. Santoyo (1996): *Diatomeas del Golfo de California*. Universidad Autónoma de Baja California Sur (Eds.)( 272pp), México.
- Norton, T.A., Melkonian, M. & Andersen, R.A. (1996). Algal biodiversity. *Phycol.*, 35. 308-326.

- Olivera, A. (2002). Valor nutricional das microalgas. *Revista da ABCC, Año 4(2)*, 63-68.
- Oxa Gallegos, P. (2005). La acuicultura, la agronomía marina y la agronomía acuícola microalgal. *IDESA, 23(3)*, 77-78.
- Peterson, J.J. & Curiel, J.I. (2002). Larvicultura de camarão aprimorada como uso de diatomáceas. *Revista da ABCC, Año 4(2)*, 40-42.
- Plasencia, A., Leal, S., Voltolina, D. & Curbelo, R. (2004). Cultivo de la diatomea bentónica *Amphora* cf. marina con una zeolita cubana enriquecida. *Rev. Invest. Mar.*, 25(2), 151-158.
- Raniello R., Iannicelli, M., Nappo, M., Avila, C., & Zupo, V. (2007). Production of *Cocconeis neothumensis* (Bacillariophyceae) biomass in batch cultures and bioreactors for biotechnological applications: light and nutrient requirements. *J. Appl. Phycol.*, 19, 383–391.
- Renaud, S.M., Thinh, L.V. & Parry, D.L. (1999). The gross composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170, 147-159.
- Roberts, R., Kawamura, T., Tanaki, H. (2000). Diatoms for abalone culture : a workshop for abalona farmers. New Zeland, 4th International Abalone Symposium, Cawthron Report No. 547, p. 28.
- Sánchez-Saavedra, M. P. (2006). The effect of cold storage on cell viability and composition of two benthic diatoms [ Versión electronic ]. *Aquaculture Engineering*, 34, 131-136.
- Sánchez-Saavedra, M. P. & Voltolina, D. (1996). Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *J. Applied Phycol.*, 8, 131-137.
- Sheskin, D. (2007). *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. (pp.241-255). Chapman & Hall, CRC, Boca Raton.
- Sicko-Goad, L. & Andersen, N.A. (1991). Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *J. Phycol.*, 27, 710-718.
- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P. & Correa-Reyes, J.G. (2001). Biochemical composition of benthic marine diatoms using as cultured medium a common agricultural fertilizer. *J. of Shellfish Research*, 20(2), 611-617.
- Simental, J.A. & Sánchez-Saavedra, M.P. (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquaculture Engineering*, 27, 265-272.

- Tadros, M.G. & J.R. Johansen, J.R. (1988). Physiological characterization of six lipid producing diatom from the south-eastern, U.S. *J. Phycol.*, 24, 445-452.
- Thompson, P.A., Guo, M.X. & P.J. Harrison .1992. Effects of variation in temperature on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J. of Phycol.*, 28, 448-497.
- Trujillo V., M.L. Voltolina, D. (1994). Cultivos de microalgas para la acuicultura. Tópicos Selectos sobre Microalgas *Serie Científica, No. Especial (2)1*, 73-85.
- Valenzuela-Espinoza E., Lafarga-De la Cruz, F., Millán-Núñez, R. & Núñez-Cebrero, F. (2005). Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Cienc. Mar.*, 31 (1A), 79-89.
- Voltolina, D. (1991). A comparison of methods for the dispersion of cultures of benthic diatoms. *Criptogamie Algol.*, 12(3) ,183-187.
- Voltolina, D. (1994). Cultivo de microalgas bentónicas para la alimentación de juveniles de abulón (*Haliotis* spp). Tópicos Selectos sobre Microalgas, *Serie Científica*, 2(1), 87-97.
- Vonshak, A. (1993). Laboratory growth techniques and the biotechnology of biomass production. In Hall *et al.*, (Eds.) *Photosynthesis and production in a changing environment* (464 pp.), Chapman & Hall, London.
- Vrieling, E., Poort, L., Beelen, T., & Gieskes, W. (1999). Growth and silica content of the diatoms *Thalassiosira weissflogii* and *Navicula salinarum* at different salinities and enrichments with aluminium. *European Journal of Phycology*, 34, 307-316.
- Werner, D. (1977). *The biology of the Diatoms*. Botanical Monographs, vol.13, (498 pp.) Berkeley, University of California Press.
- Wilkfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 59, 1-14.
- Xing, R.I., Wang, C.H., Cao, X.B. & Chang, Y.Q. 2007. The potential value of different species of benthic diatoms as food for newly metamorphosed sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture*, 263, 142-149.