

Cultivo de microalgas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica

Mario Nieves^{1,4}, Domenico Voltolina², José López Ruiz³,
Marco Antonio Cisneros¹ y Pablo Piña^{1,4}

¹Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias del Mar, Paseo Claussen s/n, P. O. Box 1132, Mazatlán, Sinaloa, México.

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Laboratorio de Microalgas UAS-CIBNOR, P. O. Box 1132, Mazatlán, Sinaloa, México.

³Grupo de Investigación Zeolitas-Acuicultura, Universidad de Cádiz, Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos, Departamento de Ciencias Navales, 11510 Puerto Real, Cádiz, España.

⁴Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias, Universidad de Colima, 25 de julio 965, Col. Villas de San Sebastián, C. P. 28045, Colima, Col., México

Nieves, M., D. Voltolina, J. López Ruiz, M. A. Cisneros y P. Piña, 2000. Cultivo de microalgas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica. *Hidrobiológica* 10 (1): 1-6.

RESUMEN

Se cultivaron las microalgas marinas *Chaetoceros* sp. e *Isochrysis* sp. en medio f enriquecido con 5, 10 y 20 mg·l⁻¹ de los productos de naturaleza zeolítica (PNZ) Zestec 56, Zesep 56 y Zeben 06. Al final de la fase exponencial los cultivos de *Chaetoceros* con PNZ registraron concentraciones celulares promedio entre un 40 y un 50%, superiores que en los cultivos control, destacando los resultados obtenidos con 20, 10 y 5 mg·l⁻¹ de Zestec 56, Zesep 56 y Zeben 06, respectivamente. En el caso de *Isochrysis* sp. los mejores resultados se obtuvieron con todas las concentraciones de Zestec 56 y con 5 mg·l⁻¹ de Zesep 56 y Zeben 06. En la fase de crecimiento desacelerado los mejores tratamientos fueron los mismos para *Chaetoceros*, aunque las diferencias numéricas fueron menos importantes que en la fase anterior, mientras que *Isochrysis* alcanzó las mayores concentraciones con 5 mg·l⁻¹ de Zesep 56, seguido por los valores registrados con 10 mg·l⁻¹ de Zestec 56 y Zeben 06. Estos resultados fueron confirmados mediante un nuevo parámetro poblacional que mide la respuesta de las microalgas en términos de natalidad relativa, con respecto al control y demuestran que para *Chaetoceros* sp. los PNZ por lo general tuvieron un efecto más evidente al final de la fase de crecimiento exponencial, mientras que para *Isochrysis* sp. parecen actuar con mayor eficacia en la fase de crecimiento desacelerado de los cultivos.

Palabras clave: Cultivo de microalgas, *Chaetoceros*, *Isochrysis*, productos de naturaleza zeolítica.

ABSTRACT

The marine microalgae *Chaetoceros* sp. and *Isochrysis* sp. were cultured with 5, 10 and 20 mg·l⁻¹ of the products of zeolitic nature Zestec 56, Zesep 56 and Zeben 06 and generally gave better results than with the control f medium. At the end of exponential growth, *Chaetoceros* cultures had cell concentrations about 40-50% higher with 20, 10 and 5 mg·l⁻¹ of Zestec, Zesep 56 and Zeben 06, respectively, while the best results were with all concentrations of Zestec 56 and with 5 mg·l⁻¹ of the other two products in the case of *Isochrysis*. During slow growth the best treatments were the same in the case of *Chaetoceros*, although the differences were numerically less important, while 5 mg·l⁻¹ of Zesep 56 and 10 mg·l⁻¹ of Zeben 06 and Zestec 56 gave the highest values with *Isochrysis*. The results obtained with cell concentrations were confirmed by statistical analysis of relative natality, which compares the number of cell divisions of the treatments to that of the control cultures. They also show that in general the effect of these products is more evident during the exponential phase for *Chaetoceros* and during slow growth in the case of *Isochrysis*.

Keywords: Microalgae cultures, *Chaetoceros*, *Isochrysis*, products of zeolitic nature.

INTRODUCCIÓN

La producción masiva de microalgas para la alimentación de larvas de especies marinas en laboratorios comerciales representa una fracción considerable del costo total de operación de esos laboratorios, debido a la necesidad de mano de obra calificada, de infraestructura adicional y adecuada y de los varios productos químicos que se requieren para este proceso (Fulks y Main, 1991; Coutteau y Sorgeloos, 1992), motivo por el cual es importante investigar nuevas técnicas y nuevos medios de cultivo, que influyan directa o indirectamente en la reducción de costos.

Aunque se han reportado los resultados de muchos estudios sobre este problema, la mayoría de ellos están dirigidos a reducir el costo de los medios de cultivo sustituyendo las formulaciones tradicionales con una variedad de productos tales como fertilizantes foliares de uso común en la agricultura o biodigeridos (Fábregas *et al.*, 1987; Paniagua Michel *et al.*, 1987; Corsini y Karydis, 1990; Sánchez Saavedra y Voltolina, 1994a; Nieves y Vega Pérez, 1994). Aparte del hecho que en varios casos los resultados no son totalmente alentadores debido a que con estos medios la producción es generalmente menor y a menudo irregular (Nieves *et al.*, 1996; Voltolina *et al.*, 1998), también se ha hecho notar que de todas maneras este acercamiento es escasamente susceptible de ofrecer una solución real a este problema, debido a que el costo del medio es un factor poco importante sobre el costo global de producción de microalgas (Torres Rodríguez, 1997).

Una posibilidad diferente es la de enriquecer los medios de cultivo con compuestos que incidan directamente en la división celular y aceleren el proceso de producción en los sistemas de cultivo, ofreciendo la posibilidad de ahorros reales en términos de tamaño y uso de la infraestructura. En esta perspectiva, se ha demostrado que algunos productos de naturaleza zeolítica (PNZ) hacen posible aumentar la biomasa de algunas diatomeas que se puede obtener en un tiempo determinado, lo cual es susceptible de reducir los costos de producción aumentando sustancialmente la productividad de cada sistema de cultivo (López Ruiz *et al.*, 1995; Voltolina *et al.*, 1996).

Las zeolitas sintéticas como los PNZ se preparan con varias técnicas: se pueden usar procesos de reabsorción hidrotérmica de geles de sílice y alúmina en medios fuertemente alcalinos, o se pueden tratar en ambiente alcalino diversos materiales base con altos contenidos de sílice y de alumina en varias condiciones, que se refieren especialmente al tiempo de reacción y de cristalización, a la temperatura y a la presión en ambiente húmedo o seco,

a la agitación y al tipo de estructurador de cristalización que se emplea en el proceso.

El efecto de los PNZ en la producción de microalgas no ha sido estudiado en mayor detalle y ahora se está intentando dilucidar los mecanismos que lo favorecen. Por ejemplo, no se conoce si estos resultados pueden ser mejorados con dosis mayores de PNZ y queda por demostrar si es posible obtener resultados similares con microalgas diferentes de las diatomeas, cuyo crecimiento pudiera verse estimulado por una posible disolución de los silicatos contenidos en las zeolitas.

En este contexto, el presente trabajo está dirigido a describir y comparar el crecimiento de dos especies de microalgas marinas, una de ellas sin requerimientos conocidos de silicatos, cultivadas con diferentes concentraciones de tres productos zeolíticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las microalgas marinas utilizadas en este estudio fueron la fitoflagelada *Isochrysis* sp. (IS-X-1) y la diatomea *Chaetoceros* sp. (CH-X-1), obtenidas de la colección de cepas del Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada (Trujillo Valle, 1993).

Para las pruebas de cultivo se usó el medio f de Guillard y Ryther (1962) preparado con agua de mar filtrada a 1 μm y esterilizada por vía química según Hemerick (1973), sin silicatos para *Isochrysis* sp. y enriquecido con una doble cantidad de silicatos en el caso de *Chaetoceros* sp., debido a su alta demanda de silicio (Villegas Hernández, 1997).

Cada microalga se cultivó en cuadruplicado en medio f solo (medio de cultivo control) y enriquecido con 5, 10 y 20 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de los tres PNZ experimentales Zestec 56, Zesep 56 y Zeben 06 cuyos componentes se muestran en la Tabla 1. Los experimentos se llevaron a cabo en recipientes de 3 litros con 1.5 litros de medio previamente tratados con una solución de ácido muriático y enseguida lavados cuidadosamente con agua destilada, iniciando cada repetición de cada uno de los tratamientos con una concentración inicial de siembra de 50,000 $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ para ambas especies.

Cada experimento consistió de tres pruebas sucesivas. En la primera se usó un inóculo común cultivado en medio f, mientras que en las dos restantes se utilizaron mezclas de las repeticiones de cada tratamiento, para inocular cuatro nuevos cultivos con el mismo enriquecimiento. Así por ejemplo se determinó la concentración celular de la mezcla de los cuatro cultivos con 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Zestec 56, este dato sirvió para determinar el volumen de esta mezcla que era

Tabla 1. Composición (% de peso anhidro) de los tres productos de naturaleza zeolítica empleados en este estudio. En paréntesis el contenido residuo de agua después de activación.

	Zestec 56	Zesep 56	Zeben 06
SiO ₂	55.68	67.05	68.29
Al ₂ O ₃	25.52	2.27	12.20
Fe ₂ O ₃	6.96	1.14	3.66
CaO	1.16	1.14	1.22
MgO	1.16	27.27	12.20
Na ₂ O	-	0.57	1.22
K ₂ O	3.48	0.57	1.22
TiO ₂	1.16	-	-
V ₂ O ₅	0.23	-	-
C orgánico	4.64	-	-
H ₂ O	(13.8)	(12)	(18)

necesario para iniciar otros cuatro cultivos con la misma concentración de este PNZ. De la misma manera, al final de esta prueba, se inició el tercero y último ensayo.

En todas las pruebas los recipientes fueron colocados en forma aleatoria en los estantes, la intensidad luminosa se mantuvo entre 6,900 y 7,000 lux, la temperatura de cultivo fue de 23±1°C y los cultivos se mantuvieron en suspensión mediante burbujeo de aire comprimido, no enriquecido con CO₂.

Cada prueba duró cuatro días, considerando que las densidades ópticas, medidas diariamente con un colorímetro Klett Summerson equipado con filtro verde, indicaron que la fase de crecimiento exponencial terminó el día tres y que el día siguiente los cultivos se encontraban en la fase de crecimiento lento, por lo que en esos días se obtuvieron muestras que se fijaron con lugol para su recuento posterior con hematocitómetro.

El número de divisiones celulares totales o natalidad absoluta de cada repetición *i* en el tiempo *t* se calculó tomando en cuenta la concentración inicial ($N_0 = 50,000$ cél·ml⁻¹; $t=0$) y las densidades celulares registradas en los días tres y cuatro. La ecuación utilizada para este fin fue la siguiente:

$$\sum \mu_{ti} = \frac{\ln N_{ti} - \ln N_0}{\ln 2}$$

donde:

N_0 = Densidad celular inicial.

N_{ti} = Densidad celular al tiempo *t* de la repetición *i*.

$\sum \mu_{ti}$ = Número total de divisiones celulares en el tiempo *t*, de la repetición *i*.

Para obviar el problema de la variabilidad entre bioensayos se calculó el promedio con respectiva desviación estándar de los valores de $\sum \mu_{ti}$ del control ($\sum \bar{\mu}_{t, control}$) en un día particular y se dividieron los valores de $\sum \mu_{ti}$ de cada repetición de cada uno de los tratamientos entre $\sum \bar{\mu}_{t, control}$ y se promediaron los resultados. Esta nueva variable se denominó tasa de natalidad relativa, expresada en este trabajo como:

$$\sum \mu_{Ri} = \frac{\sum \mu_{ti}}{\sum \bar{\mu}_{t, control}}$$

Los datos promedio de los días tres y cuatro registrados en cada tratamiento de concentración celular (cél·ml⁻¹) y $\sum \mu_{Ri}$ registrados los días tres y cuatro para cada tratamiento con cada una de las dos especies fueron sometidos a pruebas de análisis de varianza paramétrica o no paramétrica de dos factores, verificando previamente la normalidad y homoscedasticidad de los datos (Conover, 1980; Sokal y Rohlf 1979; Wilson, 1956). En los casos donde los estadísticos de prueba resultaron significativos se hicieron las pruebas de comparaciones múltiples correspondientes, con un nivel de significancia del 5% (Zar, 1996).

RESULTADOS

Mediante un análisis preliminar de los resultados no se detectaron indicios de fenómenos de aclimatación de las dos cepas a las posibles modificaciones del medio inducidas por las características peculiares de los productos zeolíticos (Cisneros, 1998). Por este motivo, los datos relativos a las tres pruebas llevadas a cabo con cada tratamiento se promediaron y contrastaron mediante las técnicas estadísticas ya mencionadas.

En la Tabla 2A, se puede apreciar que tres días después del inóculo, todos los cultivos de *Chaetoceros* en los medios con PNZ tenían concentraciones celulares significativamente superiores que las registradas en los cultivos control y que las más altas se encontraron con 20 mg·l⁻¹ de Zestec 56, con 10 mg·l⁻¹ de Zesep 56 y con 5 mg·l⁻¹ de Zeben 06, sin diferencias entre estos tres enriquecimientos. En el cuarto día de cultivo estos mismos tratamientos dieron nuevamente los resultados mejores, mientras que en tres

Tabla 2. *Chaetoceros* sp. Concentraciones celulares promedio (cél·10⁶·ml⁻¹) (A) y natalidad relativa promedio $\Sigma\mu_R$ (B) registradas después de tres y cuatro días a partir de la fecha del inóculo, en tres pruebas sucesivas de cultivo con el medio f (Control) y con 5, 10 y 20 mg·l⁻¹ de tres diferentes productos de naturaleza zeolítica. En todos los casos se indican los valores promedio \pm 1 desviación estándar y los resultados de las pruebas de comparaciones múltiples SNK, con $\alpha = 0.05$. Letras iguales indican falta de diferencias significativas. La presencia de más de una letra indica traslape de los intervalos de confianza. Ejemplo: $a \leq abc \leq b \leq c$; $a < b < c$. *Método no paramétrico.

	DÍA 3			*DÍA 4		
	5 mg·l ⁻¹	10 mg·l ⁻¹	20 mg·l ⁻¹	5 mg·l ⁻¹	10 mg·l ⁻¹	20 mg·l ⁻¹
A						
CONTROL	0.792 ^a \pm 0.110	0.792 ^a \pm 0.110	0.792 ^a \pm 0.110	1.153 ^a \pm 0.165	1.153 ^a \pm 0.165	1.153 ^a \pm 0.165
ZESTEC 56	1.104 ^{bc} \pm 0.133	1.139 ^{bc} \pm 0.125	1.254 ^c \pm 0.113	1.344 ^{bcd} \pm 0.123	1.306 ^{bc} \pm 0.134	1.488 ^d \pm 0.239
ZESEP 56	1.153 ^{bc} \pm 0.137	1.217 ^c \pm 0.120	1.153 ^{bc} \pm 0.118	1.383 ^{bcd} \pm 0.207	1.406 ^{cd} \pm 0.113	1.284 ^a \pm 0.145
ZEBEN 06	1.256 ^c \pm 0.123	1.013 ^b \pm 0.196	1.130 ^{bc} \pm 0.130	1.423 ^{cd} \pm 0.143	1.262 ^a \pm 0.124	1.261 ^a \pm 0.147
B						
CONTROL	1.000 ^a \pm 0.043	1.000 ^a \pm 0.043	1.000 ^a \pm 0.043	1.000 ^a \pm 0.026	1.000 ^a \pm 0.026	1.000 ^a \pm 0.026
ZESTEC 56	1.121 ^c \pm 0.030	1.133 ^{cd} \pm 0.019	1.170 ^d \pm 0.043	1.052 ^{bcd} \pm 0.051	1.042 ^{bcd} \pm 0.048	1.083 ^d \pm 0.079
ZESEP 56	1.138 ^{cd} \pm 0.040	1.158 ^{cd} \pm 0.043	1.138 ^{cd} \pm 0.022	1.059 ^{bcd} \pm 0.054	1.067 ^{bcd} \pm 0.049	1.036 ^{bcd} \pm 0.024
ZEBEN 06	1.169 ^d \pm 0.029	1.085 ^b \pm 0.061	1.130 ^{cd} \pm 0.028	1.070 ^{cd} \pm 0.047	1.031 ^{abc} \pm 0.036	1.030 ^{ab} \pm 0.041

casos (20 mg·l⁻¹ de Zesep 56 y 10 y 20 mg·l⁻¹ de Zeben 06) las concentraciones celulares no resultaron significativamente mayores de las encontradas con el medio f sin PNZ.

De igual manera se comportó la natalidad relativa (Tabla 2B), aunque en este caso los mejores resultados fueron con 20 mg·l⁻¹ de Zestec 56 y con 5 mg·l⁻¹ de Zeben 06 al final del tercer día, con una natalidad absoluta promedio de aproximadamente el 17% superior que la registrada con el medio f, que al día siguiente se redujo a poco más del 8% en el primer caso y al 7% en el segundo, confirmando además la tendencia a valores menores y de hecho estadísticamente no diferentes en los cultivos con el medio f enriquecido con más de 5 mg·l⁻¹ del producto Zeben 06.

Estos resultados coinciden en gran parte con los descritos en Voltolina *et al.* (1997), aunque los datos no son totalmente comparables, ya que los inóculos iniciales, el volumen de los recipientes de cultivo y el tipo de medio usado como control fueron diferentes.

En el caso de *Isochrysis* sp., de la misma manera que con *Chaetoceros* sp., se hace evidente el efecto positivo del enriquecimiento con PNZ, con una tendencia generalizada a concentraciones celulares promedio mayores prácticamente en todos los tratamientos con respecto al control, aunque en varios casos las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Esto se explica por los diferentes valores de concentración que se encontraron en las tres pruebas, que se ven reflejados por los altos valores de la desviación estándar que se reportan en la Tabla 3A. De todas maneras, las mejores cosechas se obtuvieron, para el día 3, con 10 y 20 mg·l⁻¹ de Zestec 56 y con 5 mg·l⁻¹ de Zesep 56 y Zeben 06, mientras que el día 4 el mejor resultado fue con Zesep 56, aunque esto no resultó estadísticamente diferente de los valores obtenidos con 10 mg·l⁻¹ de los otros dos PNZ.

Resultados análogos a los mencionados se obtuvieron analizando los datos de natalidad relativa (Tabla 3B); esta última, al eliminar las diferencias en concentraciones celulares entre las diferentes pruebas, remarca la mayor

Tabla 3. *Isochrysis* sp. Concentraciones celulares promedio (cél·10⁶·ml⁻¹) (A) y natalidad relativa promedio $\Sigma\mu_r$ (B) registradas después de tres y cuatro días a partir de la fecha del inóculo, en tres pruebas sucesivas de cultivo con el medio f (Control) y con 5, 10 y 20 mg·l⁻¹ de tres diferentes productos de naturaleza zeolítica. En todos los casos se indican los valores promedio \pm 1 desviación estándar los resultados de las pruebas de comparaciones múltiples SNK, con $\alpha = 0.05$. Letras iguales indican falta de diferencias significativas. La presencia de más de una letra indica traslape de los intervalos de confianza. Ejemplo: a \leq abc \leq b \leq c; a < b < c. *Método no paramétrico.

	DÍA 3			*DÍA 4		
	5 mg·l ⁻¹	10 mg·l ⁻¹	20 mg·l ⁻¹	5 mg·l ⁻¹	10 mg·l ⁻¹	20 mg·l ⁻¹
A						
CONTROL	2.568 ^{ab} \pm 0.402	2.568 ^{ab} \pm 0.402	2.568 ^{ab} \pm 0.402	3.679 ^a \pm 0.271	3.679 ^a \pm 0.271	3.679 ^a \pm 0.271
ZESTEC 56	3.040 ^{bc} \pm 0.852	3.183 ^c \pm 0.524	3.180 ^c \pm 0.875	3.998 ^{abc} \pm 0.367	5.217 ^{ef} \pm 1.076	4.205 ^{cd} \pm 0.416
ZESEP 56	3.171 ^c \pm 1.220	2.902 ^{abc} \pm 0.837	2.937 ^{abc} \pm 0.757	5.738 ^f \pm 1.460	4.473 ^{de} \pm 0.525	3.865 ^{ab} \pm 0.374
ZEBEN 06	3.066 ^c \pm 0.734	2.409 ^a \pm 0.405	2.904 ^{abc} \pm 0.570	3.910 ^{abc} \pm 0.481	4.728 ^{ef} \pm 0.575	4.179 ^{bcd} \pm 0.454
B						
CONTROL	1.000 ^{ab} \pm 0.032	1.000 ^{ab} \pm 0.032	1.000 ^{ab} \pm 0.032	1.000 ^a \pm 0.014	1.000 ^a \pm 0.014	1.000 ^a \pm 0.014
ZESTEC 56	1.034 ^c \pm 0.061	1.055 ^c \pm 0.046	1.046 ^c \pm 0.058	1.019 ^b \pm 0.027	1.078 ^{ef} \pm 0.053	1.031 ^{bcd} \pm 0.024
ZESEP 56	1.025 ^c \pm 0.137	1.024 ^{abc} \pm 0.060	1.027 ^{bc} \pm 0.055	1.094 ^f \pm 0.083	1.045 ^{cde} \pm 0.030	1.011 ^{ab} \pm 0.026
ZEBEN 06	1.039 ^c \pm 0.047	0.983 ^a \pm 0.029	1.029 ^{bc} \pm 0.035	1.013 ^{ab} \pm 0.030	1.058 ^{def} \pm 0.033	1.029 ^{bc} \pm 0.027

eficiencia del enriquecimiento con 5 mg·l⁻¹ de Zesep 56, o con 10 mg·l⁻¹ de Zeben y Zestec.

DISCUSIÓN

Es indudable que el número tan elevado de investigaciones sobre las diferentes maneras de optimizar los sistemas de cultivo de microalgas revela el interés que existe a nivel mundial sobre este campo del conocimiento, en vista de la posibilidad de aplicación prácticamente inmediata de los resultados que se obtengan. En este sentido, este estudio es novedoso sobre todo por el tipo de productos que se están estudiando, aunque es importante subrayar que la ventaja de este acercamiento reside en el hecho que los PNZ que se están evaluando son de precio mucho más bajo, en general no superior a los 5-6 dólares·Kg⁻¹ que los otros tipos de enriquecimientos que se sugieren en la literatura científica, como los extractos de productos naturales o de desecho propuesto por Fábregas *et al.* (1987), por Paniagua Michel *et al.* (1987) y por Sánchez Saavedra

y Voltolina (1994a), los cuales requieren de una inversión adicional para su preparación, o los reguladores de crecimiento vegetal estudiados por Alcántar Villagrana y López Ibarra (1994) y Barreras Cota (1998), además de que no se requieren modificaciones al sistema de cultivo, como las propuestas por Sánchez Saavedra y Voltolina (1994b) y Torres Rodríguez (1997), las cuales implican gastos adicionales.

Este trabajo constituye un avance en esta línea de investigación, ya que se pudo demostrar que los tres productos inducen un mayor crecimiento en ambas microalgas y que se obtienen resultados mejores con concentraciones diferentes de PNZ, según el alga y el tipo de producto ensayado.

Finalmente, con los resultados de este estudio se pudo también confirmar que el efecto positivo de los PNZ no está limitado a las diatomeas, y que por lo tanto no puede ser el efecto de una disolución de los silicatos presentes en la estructura de las zeolitas, los cuales favorecerían solamente a las diatomeas.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se llevó a cabo gracias al apoyo financiero de las instituciones de origen de los autores y del CONACyT (Proyecto 26709-B). Se agradece además el apoyo técnico de Martín Guerrero, Alejandra Medina y Sergio López y de Beatriz García por el mecanografiado del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- ALCANTAR-VILLAGRANA, M. y G. LÓPEZ IBARRA, 1996. Crecimiento de tres especies de microalgas marinas utilizadas en acuicultura y cultivadas en diferentes concentraciones de fitohormonas. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora. Hermosillo, México 64 p.
- BARRERAS-COTA, A.G., 1998. Crecimiento de las microalgas marinas *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella tertiolecta* con tres concentraciones de las fitohormonas giberelina y citokinina. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México 42 p.
- CONOVER, W. J., 1980. *Practical nonparametric statistics*. 2ª ed., John Wiley & Sons, New York. 493 p.
- CISNEROS, M. A., 1998. Efecto de diferentes concentraciones de tres productos zeolíticos en el cultivo de las microalgas *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros* sp. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México 35 p.
- CORSINI, M. y M. KARYDIS, 1990. An algal medium based on fertilizers and its evaluation in mariculture. *Journal of Applied Phycology* 2:333-339.
- COUTTEAU, P. y P. SORGELOOS, 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs. *Journal of Shellfish Research* 11: 467-476.
- FÁBREGAS, J., TORIBIO, L., ABALDE, J., CABEZAS, B. y C. HERRERO, 1987. Approach to biomass production of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kilian) Butch., using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch cultures. *Aquacultural Engineering* 6: 141-150.
- FULKS, W. y K. L. MAIN, 1991. *Rotifer and microalgae culture systems*. Argent Press, Redmond, W.A. 364 p.
- GUILLARD, R. R. L. y J. H. RYTHER, 1962. Studies on marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detomula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.
- HEMERICK, G., 1973. Mass culture. pp. 289-311. En: J. A. STEIN (Comp.) *Handbook of phycological methods*. Cambridge University Press.
- LÓPEZ-RUIZ, J., GARCÍA-GARCÍA, R. y M. S. FERREIRO ALMEDA, 1995. Marine microalgae culture: *Chaetoceros gracilis* with zeolitic product ZESTEC-56 and a commercial fertilizer as nutrient. *Aquacultural Engineering* 14: 367-372.
- NIEVES, M. y C. VEGA-PÉREZ, 1994. Tasa de crecimiento, biomasa y costo de producción de *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae) y *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) cultivadas con el medio f y tres medios alternativos. *Revista de Ciencias del Mar. UAS* 13: 39-53.
- NIEVES, M., D. VOLTOLINA, M. T. SAPIÉN, H. GERHARDUS, A. L. ROBLES y M. A. VILLA, 1996. Culturing microalgae with agricultural fertilizers. *Rivista Italiana di Acquacoltura* 31: 81-84.
- PANIAGUA-MICHEL, J., B. C. FARFÁN y L. F. BÜCKLE-RAMÍREZ, 1987. Culture of marine microalgae with natural biodigested resources. *Acquaculture* 64: 249-256.
- SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P. y D. VOLTOLINA, 1994 a. Cultures of *Pavlova lutheri* (Droop) Green in diluted wastewater. *Journal of Applied Phycology* 6: 285-288.
- SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P. y D. VOLTOLINA, 1994b. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109 B: 39-44.
- SOKAL, R. R. y F. J. ROHLF, 1979. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume Ediciones. Barcelona. 832 p.
- TORRES RODRÍGUEZ, L. M., 1997. Uso de un fotobioreactor para la producción masiva de microalgas para la acuicultura. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México 66 p.
- TRUJILLO-VALLE, M. L., 1993. La colección de microalgas del CICESE. Comunicaciones Académicas, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, México. CIACT9301. 103p.
- VILLEGAS-HERNÁNDEZ, F., 1997. Crecimiento y producción de *Artemia* sp. en laboratorio bajo diferentes condiciones de iluminación. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, México 50 p.
- VOLTOLINA, D., M. NIEVES y J. LÓPEZ RUIZ, 1996. Aumento del rendimiento en cultivos de diatomeas marinas mediante aditivos zeolíticos. Resúmenes del II Congreso Mexicano de Ficología, U.A.B.C., Ensenada, México.
- VOLTOLINA, D., M. NIEVES y J. LÓPEZ-RUIZ, 1997. Zeolitic products as enrichment for cultures of a marine microalga. *Aquacultural Engineering* 16: 1-5.
- VOLTOLINA, D., M. NIEVES, G. NAVARRO, T. OLIVA y D. PERAZA, 1998. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Aquacultural Engineering* 19: 7-15.
- ZAR, J. H., 1996. *Biostatistical analysis*. 3 ed., Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J. 662 p.
- WILSON, K. V., 1956. A distribution-free test of analysis of variance hypothesis. *Psychological Bulletin* 53: 96-101.

Recibido: 6 de mayo de 1999.

Aceptado: 21 de octubre de 1999.