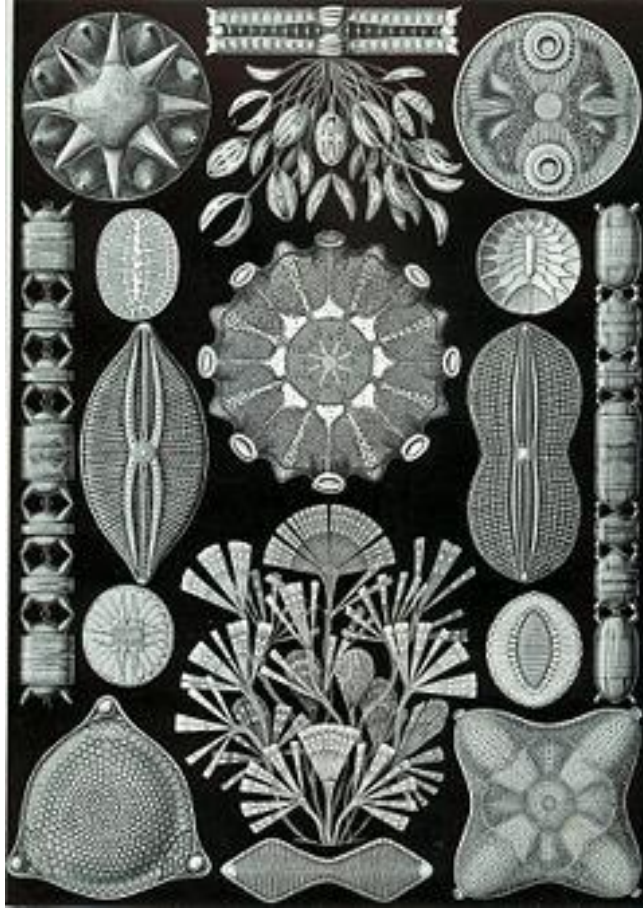


V MASTER UNIVERSITARIO INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Las Palmas de Gran Canaria, España

2009



OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS PARA EL
CULTIVO DE POST- LARVAS DE ABALÓN

(Haliotis tuberculata coccinea Reeve, 1846).

ANASTASIA PORTA VALES.

**OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS PARA EL
CULTIVO DE POST- LARVAS DE ABALÓN**

***(Haliotis tuberculata coccinea* Reeve, 1846).**

ANASTASIA PORTA VALES.

Trabajo realizado en el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) de Las Palmas de Gran Canaria, España, bajo la dirección de Gercende Courtois de Viçose.

Presentado como requisito parcial para la obtención del Título de Máster Universitario Internacional en Acuicultura, otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos del Mediterráneo de Zaragoza (CIHEAM).

Directores.

Autor.

Fdo: Gercende Courtois de Viçose.

Fdo: Anastasia Porta Vales.

Las Palmas de Gran Canaria a 17 de Junio de 2009.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Gercende por su confianza depositada a lo largo de la realización de este proyecto. Se comprometió conmigo, no sólo para dirigirme sino como compañera, estando ahí cuando lo necesitaba tanto a pie de campo como marcándome el camino correcto. Su ayuda incondicional, su dedicación, y su ánimo me han arropado en todo momento, desde el inicio hasta el presente día. Le agradezco eternamente el aprendizaje que he recibido en todos los aspectos de la vida, laboral y personal.

A Carmen, Amaya y Mapi por su colaboración desde el principio.

Al Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN, CSIC), Puerto Real, (Cádiz), en especial a Ignacio Moreno, por la donación de las diatomeas bentónicas, sin ellas hubiera sido imposible realizar a tiempo esta investigación.

A la FULPGC por otorgarme beneficiaria de una beca de investigación del Programa Innova Canarias 2020 y a mi patrocinador UNELCO por financiar este proyecto.

A Mafe, que me brindó su ayuda y su sonrisa en los momentos en que mis manos no podían con todo, olvidando el cansancio en favor de la amistad. Muchas gracias de todo corazón.

A Carlos y a Ezequiel, por finalizar parte de la tesina cuando la daba por perdida. Un abrazo enorme.

A todos mis compañeros del Master, que han dejado una huella permanente en mí, una etapa de mi vida, donde encontré una nueva familia. La tolerancia, el respeto, la amistad y el cariño hicieron una convivencia inolvidable.

A toda la gente del IUSA, por haber compartido mesa de trabajo, la compañía y las risas animan la motivación de un objetivo. A Carmen Quintana por su ayuda y aprendizaje con los análisis bioquímicos, su paciencia, amabilidad y ternura fueron muy importantes para mí en la recta final. A Eneko por su colaboración en las analíticas de los FAMES.

A todos los miembros del GIA, por sus enseñanzas y por haberme concedido la oportunidad de cursar el V Master Internacional Universitario de Acuicultura.

A mis amistades, por tener la suerte de haberos encontrado y continuar compartiendo buenos momentos juntos.

Y lo que es más importante, a mi familia, siempre animándome en la distancia, sin su cariño no me hubiera levantado todas las veces que me caí. Esta investigación la he realizado con ellos, siempre tuve su energía positiva conmigo: ¡puñitos arriba!

A mi padre porque siempre me apoyó en esta aventura de la vida, me acompañó en la preparación del viaje, me ayudo a izar las velas, y a llegar a puerto. La finalización de la tesina es gracias a él, fue mi voz cuando yo no podía hablar, papá, lo he conseguido. Te quiero, siempre estás a mi lado.

ÍNDICE.

ABREVIACIONES **I**

LISTA DE FIGURAS **II**

LISTA DE TABLAS **VI**

RESUMEN **VIII**

1. INTRODUCCIÓN..... **1**

1.1. Definición de la acuicultura. 1

1.2. Estado actual de la acuicultura. 1

1.3. Evolución y estado actual de la acuicultura en España. 4

1.4. Cultivo de moluscos. 5

1.4.1. Región Europa occidental. 5

1.4.2. Producción en España. 6

1.5. Cultivo del abalón. 8

1.6. *Haliotis tuberculata coccinea* 10

1.7. Importancia de las microalgas y su cultivo para acuicultura. 12

1.8. Las diatomeas..... 14

1.8.1. Estructura externa y clasificación..... 15

1.8.2. Ciclo de vida de las diatomeas. 16

1.8.3. Las diatomeas bentónicas o pennales y sus formas de crecimiento. 17

1.8.4. Fases de crecimiento de un cultivo de diatomeas bentónicas, requerimientos y bioquímica. 18

1.8.5. Criterio de elección de las diatomeas bentónicas objeto del estudio.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL Y MÉTODO.	24
3.1. Acondicionamiento y mantenimiento de las diatomeas bentónicas.....	24
3.2. Caracterización de las diatomeas.	26
3.3. Montaje estantería.	27
3.4. Medición y análisis de parámetros.	28
3.4.1. Temperatura.	28
3.4.2. Radiación.	28
3.5. Experimentos de crecimiento algal.	29
3.5.1. Cultivo en tubos de ensayo.	30
3.5.1.1. Descripción.	30
3.5.1.2. Cálculos.....	32
3.5.2. Cultivo en placas de Petri.	34
3.5.2.1. Descripción.	34
3.5.2.2. Cálculos del número de células adheridas	35
3.6. Cálculos tasa de crecimiento.....	36
3.7. Cultivo en bolsas para análisis bioquímico.....	36
3.7.1. Inóculo de las bolsas.....	36
3.7.2. Cosechado de las bolsas.....	37
3.8. Análisis bioquímicos.	38
3.8.1. Determinación de lípidos totales.	38
3.8.2. Determinación de proteínas.	39

3.8.2.1. Digestión.....	40
3.8.2.2. Destilación.....	40
3.8.2.3. Valoración.....	40
3.8.3. Determinación de las cenizas.....	41
3.8.4. Determinación de la humedad.....	42
3.8.5. Determinación de los carbohidratos.....	43
3.8.6. Determinación de los ácidos grasos.....	43
3.8.6.1. Transesterificación en medio ácido- Metilación.....	43
3.8.6.2. Cromatografía de gases.....	43
3.9. Análisis estadístico.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Caracterización de las diatomeas objeto de estudio.....	45
4.2. Cultivo de las microalgas en tubos de ensayo.....	46
4.2.1. Características de las curvas de crecimiento.....	46
4.2.2. Efecto de la densidad sobre la tasa de crecimiento exponencial, semanal, y sobre la producción celular.....	48
4.2.3. Comparación de las tasas de crecimiento y de la producción celular a cada densidad de inóculo.....	52
4.3. Cultivo en placas de Petri.....	54
4.3.1. Características de las curvas de crecimiento en placa a todas las densidades.....	54
4.3.2. Efecto de la densidad sobre la tasa de crecimiento exponencial, semanal, y sobre la producción celular.....	56
4.3.3. Comparación de las tasas de crecimiento y células adheridas a cada densidad de inóculo.....	59

4.4. Composición bioquímica básica a la densidad de inóculo de 100.000 cél/ml.....	62
4.4.1. Lípidos totales.	63
4.4.2. Proteínas.....	64
4.4.3. Cenizas.....	64
4.4.4. Carbohidratos.	65
4.5. Composición de los ácidos grasos.....	66
5. DISCUSIÓN.	68
5.1. Tamaño celular de las diatomeas bentónicas.	68
5.2. Experimento en tubos de ensayo.	70
5.3. Experimento en placas.	73
5.4. Composición bioquímica.	74
6. CONCLUSIONES.	81
7. BIBLIOGRAFÍA.	83
8. ANEXO I.....	102

ABREVIACIONES.

Am.: *Amphora* sp.

ARA: Ácido araquidónico.

EPA: Ácido eicosapentaenoico.

Est.: Fase estacionaria

Exp.: Fase exponencial

DHA: Ácido docosahexaenoico.

HUFA: Ácidos grasos altamente insaturados.

ICMAN: Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía.

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados.

Nav.: *Navicula incerta*

Nit.: *Nitzschia* sp.

Pr.: *Proschkinia* sp.

PS.: Peso seco.

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

SFA: Ácidos grasos saturados.

TFA: Ácidos grasos totales.

UV.: Ultravioleta.

50.: densidad de inóculo 50.000 cél/ml.

100.: densidad de inóculo 100.000 cél/ml.

250.: densidad de inóculo 250.000 cél/ml.

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1: Producción acuícola por región en el 2006 (FAO, 2009).....	3
Figura 2: Producción mundial acuícola en el 2006 de los principales grupos de especies (FAO, 2009).....	3
Figura 3: Producción pesquera en toneladas en España desde 1950 hasta el 2007. Base de datos correspondiente a la pesca comercial, recreativa y de subsistencia (FAO Statistic, 2009).....	4
Figura 4: Producción acuícola en toneladas en España desde 1950 hasta el 2007 (FAO Statistic, 2009).....	5
Figura 5: Producción acuícola en toneladas en el archipiélago canario (2001-2007). (Jacumar, 2008).....	7
Figura 6: Producción mundial del abalón (FAO Statistic, 2009).	8
Figura 7: Principales productores del abalón (FAO Statistic, 2009).	9
Figura 8: Ejemplar de <i>Haliotis tuberculata coccinea</i>	11
Figura 9: Esquema de la división asexual en las diatomeas.....	16
Figura 10: Siete tipos de formas de crecimiento de las diatomeas bentónicas (Kawamura y Hirano, 1992).	17
Figura 11: Fases de crecimiento en un cultivo de microalgas (Helm <i>et al.</i> , 2006).....	19
Figura 12: Post-larvas fijadas de <i>Haliotis tuberculata coccinea</i>	20

Figura 13: Diatomeas en pipetas Pasteur transportadas desde el ICMAN, Cádiz.	24
Figura 14: Etapas en la producción de algas hasta los cultivos a gran escala (Helm <i>et al.</i> , 2006).....	25
Figura 15: Medida del largo celular (a) y del ancho (b) de <i>Navicula incerta</i> con una escala de 10µm en el objetivo de 100x.....	27
Figura 16: Estantería dentro de la planta de producción animal para realizar los experimentos de las microalgas.	28
Figura 17: Luxómetro para medir diariamente la intensidad de luz a la cual estaban sometidos los cultivos de diatomeas.	29
Figura 18: Cámara de Neubauer. (Torrentera y Tacon, 1989).	31
Figura 19: Diagrama de cuadrícula en una cámara de Neubauer	31
Figura 20: Microscopio con cámara utilizado para contabilizar las células de diatomeas.	32
Figura 21: Inóculos realizados bajo una campana de flujo laminar.....	33
Figura 22: Placas de Petri en la estantería conteniendo las diatomeas.	35
Figura 23: Extracción del cobre con pipeta Pasteur.....	35
Figura 24: Bolsas de cultivo de 10 l para obtener las muestras bioquímicas.....	37
Figura 25: Bolsas de plástico por triplicado de <i>Proschkinia</i> sp. en fase exponencial. .	38
Figura 26: Filtrado para eliminar las sales de las muestras.	39
Figura 27: Crisol de cerámica pesado en la balanza analítica.	42
Figura 28: Clasificación de las microalgas según las formas geométricas que presentan (Hillebrand <i>et al.</i> , 1999). “a” es la longitud celular (eje apical) y “b” es el ancho celular (eje transapical).....	45
Figura 29: Diatomeas bentónicas caracterizadas en el microscopio (x1000). A= <i>Amphora</i> sp. B= <i>Navicula incerta</i> . C= <i>Nitzschia</i> sp. D= <i>Proschkinia</i> sp.....	45

Figura 30: Curvas de crecimiento de <i>Amphora</i> sp. a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	46
Figura 31: Curvas de crecimiento de <i>Navicula incerta</i> a las tres diferentes densidades de inóculo. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	47
Figura 32: Curvas de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp. a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	47
Figura 33: Curvas de crecimiento de <i>Proschkinia</i> sp. a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	48
Figura 34: Curvas de crecimiento en tubos de las diatomeas a la densidad de 100.000 cél/ml. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	54
Figura 35: Curvas de crecimiento de <i>Amphora</i> sp. en placas a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	54
Figura 36: Curvas de crecimiento en placas de <i>Navicula incerta</i> a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	55
Figura 37: Curvas de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp. en placas a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	55
Figura 38: Curvas de crecimiento de <i>Proschkinia</i> sp. en placas a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	56
Figura 39: Curvas de crecimiento en placas de las diatomeas a la densidad de 100.000 cél/ml. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).	61
Figura 40: Composición bioquímica de las cuatro diatomeas en la fase exponencial y estacionaria.	62
Figura 41: Comparación entre el porcentaje de lípidos totales de la fase exponencial y estacionaria de las cuatro diatomeas.	63

Figura 42: Comparación entre el porcentaje de proteínas de la fase exponencial y estacionaria de las cuatro diatomeas. 64

Figura 43: Comparación entre el porcentaje de cenizas de la fase exponencial y estacionaria de las cuatro diatomeas. 65

Figura 44: Comparación entre el porcentaje de carbohidratos de la fase exponencial y estacionaria de las cuatro diatomeas. 65

LISTA DE TABLAS.

Tabla I: Producción mundial de la pesca y la acuicultura (FAO, 2008).....	2
Tabla II: Producción acuícola en toneladas de moluscos en España (2003 -2007). (Jacumar, 2009).....	6
Tabla III: Resumen de las características del cromatógrafo de gases.....	44
Tabla IV: Medidas del largo y ancho celular de las diatomeas.....	46
Tabla V: Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹) y número de células (10 ⁶ cél/ml) de <i>Amphora</i> sp. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.....	48
Tabla VI: Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹) y número de células (10 ⁶ cél/ml) de <i>Navicula incerta</i> a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.....	49
Tabla VII: Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹) y número de células (10 ⁶ cél/ml) de <i>Nitzschia</i> sp. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.....	50
Tabla VIII: Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹) y número de células (10 ⁶ cél/ml) de <i>Proschkinia</i> sp. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria...51	51
Tabla IX: Tasa de crecimiento exponencial y número de células a día 3 de cultivo para todas las densidades.....	52

Tabla X: Tasa de crecimiento semanal y biomasa a día 7 de cultivo para todas las densidades.....52

Tabla XI: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² de *Amphora* sp. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.56

Tabla XII: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² de *Navicula incerta* a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.....57

Tabla XIII: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² de *Nitzschia* sp. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.....58

Tabla XIV: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² de *Proschkinia* sp. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.....59

Tabla XV: Tasa de crecimiento exponencial μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² a todas las densidades.....60

Tabla XVI: Tasa de crecimiento semanal μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² a todas las densidades.....60

Tabla XVII: Análisis de la composición bioquímica proximal (% peso seco) de las cuatro diatomeas inoculadas a la densidad de 100.000 cél/ml y recogidas en la fase exponencial (Exp.) y en la fase estacionaria (Est.). (n=9).....62

Tabla XVIII: Composición de ácidos grasos (%TFA) de *Amphora* sp., *Navicula incerta*, *Nitzschia* sp. y *Proschkinia* sp. durante la fase logarítmica y estacionaria.....67

RESUMEN

El presente trabajo tiene como fin la mejora de las técnicas de producción de diatomeas bentónicas como cultivo auxiliar del cultivo de abalón, *Haliotis tuberculata coccinea*. Las diatomeas bentónicas sirven de alimento a las post-larvas de abalón promoviendo su desarrollo y crecimiento durante las primeras etapas de su ciclo de vida.

El experimento realizado pretende estudiar el efecto de la densidad de cultivo sobre el crecimiento de las diatomeas bentónicas, *Amphora* sp., *Navicula incerta*, *Nitzschia* sp. y *Proschkinia* sp. Inicialmente se caracterizaron las diatomeas objeto de estudio, forma, largo y ancho celular. Todas fueron cultivadas a tres densidades iniciales, a 50.000 cél/ml, 100.000 cél/ml y 250.000 cél/ml en tubos de ensayo y en placas de Petri. Para cada densidad y género se calculó la curva de crecimiento y la adherencia al sustrato. En todos los cultivos las diatomeas se mantuvieron en idénticas condiciones, medio de cultivo (F/2), intensidad de luz 5403 ± 649 Lux, temperatura $28,5 \pm 1,4$ °C, fotoperiodo constante de 24:0 h luz: oscuridad y tiempo de cultivo 7 días.

Los resultados obtenidos demuestran que la densidad de inóculo de 100.000 cél/ml es óptima para las cuatro diatomeas a nivel de producción semanal y de rentabilidad de producción. *Proschkinia* sp. alcanza la mayor tasa de crecimiento y producción semanal con $5,81 \times 10^6$ cél/ ml mientras que los mejores resultados de fijación al sustrato se obtuvieron con *Amphora* sp. la cual presenta el mayor número de células adheridas al sustrato con, 11.000 cél/mm².

También se ha estudiado el valor nutricional, tanto en la fase exponencial y estacionaria de cultivo de las cuatro diatomeas bentónicas. Se halló la composición

bioquímica proximal, lípidos, proteínas, carbohidratos y cenizas, resultando un mayor contenido en proteínas y lípidos en fase exponencial para los cultivos de todas las diatomeas. *Amphora* sp. presentó la mayor cantidad de lípidos totales (9,74% PS) en fase exponencial mientras una diferencia en contenido de carbohidratos entre las dos fases de cultivo sólo se pudo observar en *Proschkinia* sp. Ambas diatomeas, especialmente durante su fase exponencial, presentaron altos niveles energéticos y contenidos en proteínas y lípidos adecuados para la alimentación de post-larvas de abalón. Las cuatro diatomeas no presentaron contenidos en cenizas significativamente diferentes ($P < 0.05$). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se encuentran en un rango del 23,25% al 38,62% del total de ácidos grasos (TFA) y las cuatro diatomeas objeto de estudio tuvieron mayores contenidos de n-3 PUFA que de n-6 PUFA. Todas las diatomeas analizadas presentaron cantidades importantes de TFA (entre el 12,69% y el 17,68%) y de 20:5n-3 (EPA) y *Proschkinia* sp., en fase logarítmica tiene la mayor cantidad de 20:5n-3 ácido araquidónico (ARA). Obtener una buena calidad de diatomeas bentónicas, con altos porcentajes de lípidos y proteínas permitirá elevar las tasas de crecimiento y aumentar la supervivencia de las post-larvas de abalón. Fijar las condiciones medioambientales de cultivo, para las cuales se alcanza una alta calidad nutricional, permitirá disponer siempre de una óptima fuente de alimento. Combinar la alimentación de las post-larvas con dos o más especies de diatomeas bentónicas de diferentes tamaños celulares y composición bioquímica beneficiará al cultivo del abalón.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Definición de la acuicultura.

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos en áreas continentales o costeras, que implica por un lado la intervención en el proceso de la crianza para mejorar la producción y por el otro la propiedad individual o empresarial del stock cultivado (FAO, 1997)

1.2. Estado actual de la acuicultura.

La producción mundial de pesca de captura se ha mantenido relativamente estable en el último decenio, el total de las capturas marinas que ascendió a 85,7 millones de toneladas en el 2004, no ha variado sensiblemente, alcanzando en el 2006, 81,9 millones de toneladas (Tabla I).

Los recursos marinos pesqueros están sometidos a una gran explotación en todo el mundo, en el 2007 el 52% están totalmente explotados, el 28% están sobreexplotados, y sólo un 20% con una explotación moderada o infraexplotadas, con algo de capacidad para producir más (FAO, 2009).

El incremento del suministro de la acuicultura compensó con creces los efectos del estancamiento de la producción de la pesca de captura y el crecimiento de la población. Después de un constante crecimiento, en especial durante los últimos cuatro decenios, la acuicultura por primera vez está en disposición de proporcionar la mitad del pescado consumido por la población humana, de 110 millones de toneladas de pescado para el consumo humano proveniente de la pesca y acuicultura en el 2006, un 47% de esta cantidad correspondió a la acuicultura (FAO, 2009).

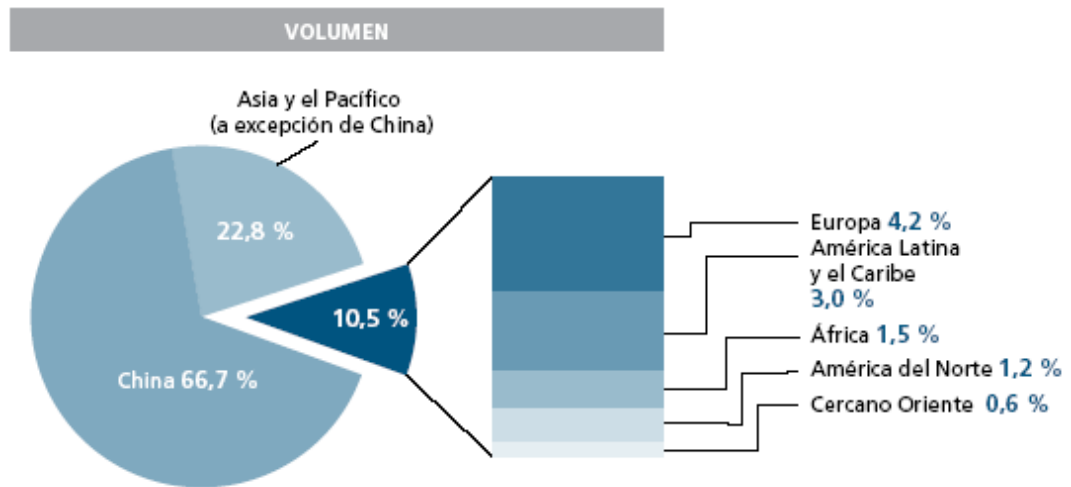
Tabla I: Producción mundial de la pesca y la acuicultura (FAO, 2009).

	2002	2003	2004	2005	2006
	<i>(Millones de toneladas)</i>				
PRODUCCIÓN					
CONTINENTAL					
Captura	8,7	9,0	8,9	9,7	10,1
Acuicultura	24,0	25,5	27,8	29,6	31,6
Total continental	32,7	34,4	36,7	39,3	41,7
MARINA					
Captura	84,5	81,5	85,7	84,5	81,9
Acuicultura	16,4	17,2	18,1	18,9	20,1
Total marina	100,9	98,7	103,8	103,4	102,0
TOTAL CAPTURA	93,2	90,5	94,6	94,2	92,0
TOTAL ACUICULTURA	40,4	42,7	45,9	48,5	51,7
TOTAL PESCA MUNDIAL	133,6	133,2	140,5	142,7	143,6

Nota: no se contabilizan las plantas acuáticas.

La acuicultura evolucionó del cultivo en agua dulce en sus comienzos a desarrollarse en todos los ambientes acuáticos, en todos los países y continentes. Si desglosamos la producción en función del tipo de agua utilizada para el cultivo, un 50% proviene de agua marina, un 45% de agua dulce, y un 5% de agua salobre (Jacumar, 2009)

La acuicultura mundial está liderada en gran medida por la región de Asia y el Pacífico, la cual aporta el 89% de la producción total en cantidad. Este dominio se debe principalmente a China con un 67% de la producción mundial en términos de cantidad (Figura 1), sobre todo siendo el país con la mayor producción de carpas (ciprínidos) y ostras. La acuicultura sigue creciendo más que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal y a mayor ritmo que la población, en el 2006 la tasa de crecimiento anual es de casi un 7% (FAO, 2009)



Nota: No se contabilizan las plantas acuáticas.

Figura 1: Producción acuícola por región en el 2006 (FAO, 2009).

La acuicultura en los últimos años, también se ha diversificado a muchas especies acuáticas entre las cuales los moluscos con un 22,3% de la producción mundial, mientras el cultivo de peces sigue siendo primero con un 47,4% de la producción acuícola (Figura 2).

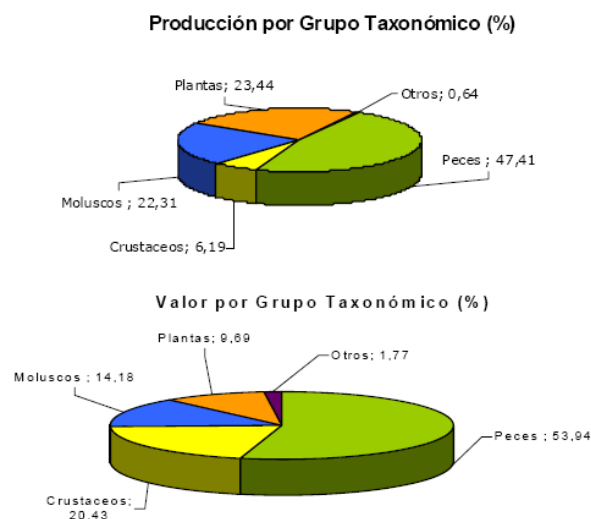


Figura 2: Producción mundial acuícola en el 2004 de los principales grupos taxonómicos (FAO, 2006).

1.3. Evolución y estado actual de la acuicultura en España.

La evolución de la producción pesquera desde 1.950 hasta 1.970 fue en aumento hasta alcanzar las $1,5 \times 10^6$ t, a partir de esta fecha el valor ha descendido poco a poco. En el 2007 la producción descendió 200.000 t. respecto al 2006, siendo está de 1×10^6 t. (Figura 3).

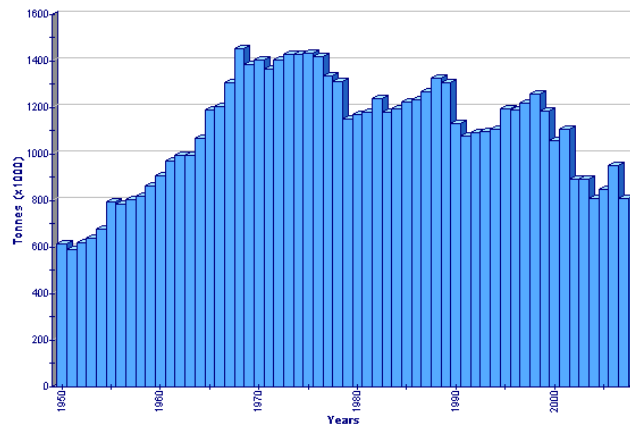


Figura 3: Producción pesquera en toneladas en España desde 1950 hasta el 2007. Base de datos correspondiente a la pesca comercial, recreativa y de subsistencia (FAO Statistic, 2009).

La bajada de la producción pesquera, en la década de los años 90, ha sido paliada con el incremento de la acuicultura desde el año 1998 hasta la actualidad superando las 300.000 t. En el 2005 el principal productor de la UE-27 fue Francia con el 20% del total, seguido de España con el 17% e Italia y Reino Unido representando cada uno en torno al 14% del total (EUROSTAT, 2005).

En el 2007, la producción española de acuicultura continental y marina, alcanzó las 285.272,21 t., correspondiendo 64.227,49 t. a peces, 220.916,45 t. a moluscos y 129,25 t. a crustáceos (Figura 4) (FAO, 2009) (Jacumar, 2009).

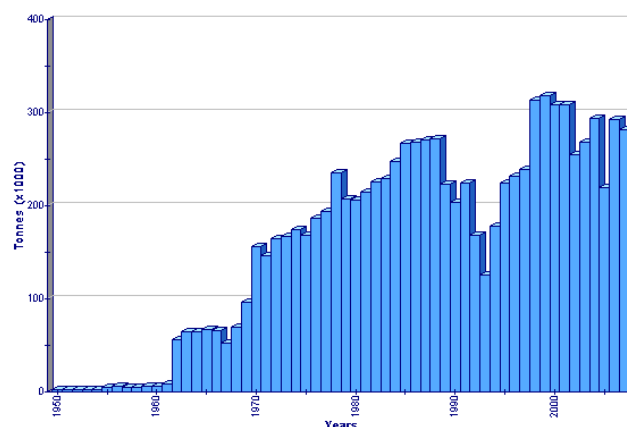


Figura 4: Producción acuícola en toneladas en España desde 1950 hasta el 2007 (FAO Statistic, 2009).

1.4. Cultivo de moluscos.

La mayor parte de la demanda de productos del mar se refiere al pescado, sin embargo la producción y cosecha de moluscos, especialmente bivalvos, también tiene un papel esencial a la hora de satisfacer esta creciente demanda (Helm *et al.*, 2006).

La actual tendencia del aumento del consumo de moluscos y el descenso natural de las capturas indican que una gran porción de estos derivará de la acuicultura en el siglo veintiuno (Glaude y Maxey, 1994). En el 2006 los moluscos constituyeron el segundo mayor grupo en producción con 14,1 millones de toneladas, un 27% de la producción total (FAO, 2009),

1.4.1. Región Europa occidental.

Europa produjo alrededor de 750.000 t. de moluscos en el 2003 (Fao Statistic, 2009). La producción fue dominada por tres países, España (34%), Francia (24%) e Italia (17%) contabilizando el 75% de la producción regional. En la última década la producción de moluscos incremento un 2%/año, presentando gran heterogeneidad según

las zonas de producción (FAO, 2006). Del 2003 al 2007 la producción de moluscos, tanto de aguas salobres como marina, se mantiene con pocas variaciones próxima a las 690.000 t.

Dos principales especies dominan la producción: *Mytilus edulis* (“blue mussel”) y *Mytilus galloprovincialis* (“Mediterranean mussel”), ambos contabilizan 600.000 t. Le sigue la producción de ostras; en el 2003 las ostras *Ostrea edulis* y *Crassostrea angulata* alcanzaron 130.000 t. y en menor cantidad se encuentra la producción de almejas, *Ruditapes philippinarum*, con 28.000 t.

1.4.2. Producción en España.

En el 2006 la producción de moluscos en España sobrepasa las 300.000 t., descendiendo en el 2007 a 220.252,80 t. (Tabla II). Si se excluye a los mejillones, la producción española de moluscos en el 2007 es aproximadamente 8.300 t., siendo de este modo inferior a la producción de peces, 40.000 t.

Tabla II: Producción acuícola en toneladas de moluscos en España (2003 -2007). (Jacumar, 2009).

Especie	2003	2004	2005	2006	2007
MEJILLÓN	248.826,51	294.826,19	209.314,70	301.865,87	211.983,06
OSTRAS	3.116,74	4.043,67	3.959,88	4.787,86	5.127,18
ALMEJAS	1.741,75	2.234,05	1.907,73	1.505,98	1.983,99
BERBERECHO	969,58	1.062,25	520,58	507,16	1.132,76
PULPO	10,24	12,66	15,80	10,71	24,66
ESCUPIÑA	1,94	1,50	1,65	4,35	0,60
ZAMBURIÑA	0,00	0,00	0,00	0,31	0,38
NAVAJA	0,00	0,02	0,00	0,04	0,17
CHIRLA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VIEIRA	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
PECTÍNIDOS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
COQUINA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	254.666,76	302.180,34	215.720,34	308.682,33	220.252,80

La necesidad actual de introducir nuevas especies, de moluscos que aún no están representados, permitiría diversificar la producción y en el caso de islas como canarias permitiría diversificar la economía, con especies nativas de la zona.

Actualmente, en Canarias, la producción acuícola es exclusivamente piscícola, en el 2007 la producción de doradas contabilizó 4.576,33 t., seguida de la lubina con 3.547,61 t. Los túnidos no registraron producción (Jacumar, 2009) (Figura 5). En consecuencia el desarrollo del cultivo de una especie de molusco, tal como la de oreja de mar, que se encuentra en el archipiélago, permitiría generar una industria acuícola pionera en las islas y con un gran potencial en España, así como aumentar la oferta de productos de acuicultura. También promovería un desarrollo económico de los mercados locales y aumentaría la competitividad del sector acuícola de importancia estratégica para las islas.

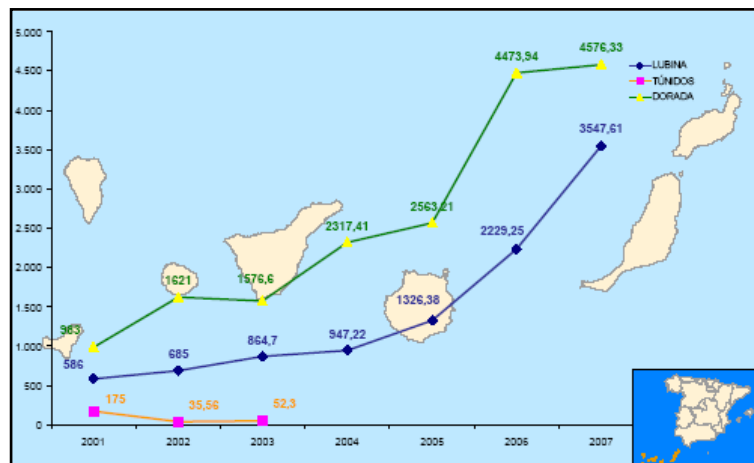


Figura 5: Producción acuícola en toneladas en el archipiélago canario (2001-2007). (Jacumar, 2009).

1.5. Cultivo del abalón.

Los Abalones (Gastropoda, familia Haliotidae) son un marisco con alto valor comercial en la cultura asiática (Huchette *et al*, 2003). También llamados orejas de mar, son animales herbívoros y todas las especies pertenecen al género *Haliotis*, formando parte de una de las familias más primitivas de gasterópodos en forma y estructura.

El cultivo de abalón comenzó en Japón hace un siglo, y su cultivo se ha ido extendiendo a varios lugares del mundo. Desde 1988, la producción mundial de abalón ha ido en aumento continuo hasta el año 2005, siendo el año 2002 cuando se produce un incremento notable pasando de 770 t. ese año a 21.423 t. en el 2005, lo que supone un aumento del 96,40% en los últimos cuatro años. Este incremento responde a un descenso de las capturas de abalón salvaje, un aumento significativo de la demanda y a las mejoras de las técnicas de cultivo (Figura 6).



Figura 6: Producción mundial del abalón (FAO Statistic, 2009).

Los mayores productores de abalón, en la última década, son en orden ascendente, Chile, Australia, Sudáfrica y China. La producción de este último presentó un crecimiento exponencial a partir del 2003, logrando a día de hoy ser el mayor productor mundial de abalón (Figura 7).

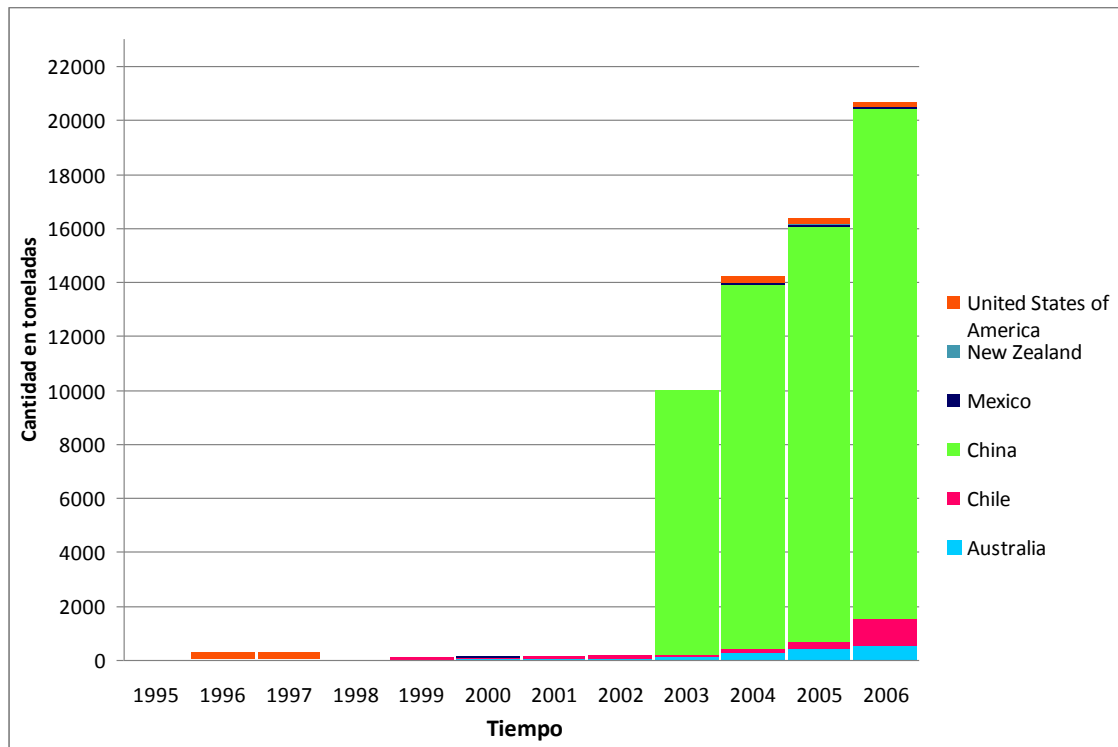


Figura 7: Principales productores del abalón (FAO Statistic, 2009).

En el mercado mundial, la demanda supera ampliamente la oferta, y el precio que alcanza en el mercado es muy alto, lo que es suficientemente atractivo como para pensar en la rentabilidad de su cultivo (Oakes y Ponte, 1996).

En relación a los precios que alcanza en el mercado, oscilan según sea presentado el producto: desde 32€ por kilogramo con concha, 45€ por kilo fresco y vivo, 80€ por kilogramo enlatado y 700€ por kilogramo seco (Gordon y Cook, 2001).

Debido al colapso de la pesquería, en la mayoría de los países donde el abalón se encuentra como recurso pesquero, se estima que cualquier aumento sostenible en la oferta deberá provenir de un desarrollo mayor del cultivo (Flores, 2003).

1.6. *Haliotis tuberculata coccinea*

Reino: Animalia

Phyllum: Mollusca

Clase: Gastropoda

Subclase Prosobranchia

Superorden: Archaeogastropoda

Orden: Vetigastropoda

Familia: Haliotidae

Género: *Haliotis*

Especie: *H. tuberculata coccinea*

En Canarias, la especie *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846) es conocida popularmente como “almeja canaria”. Se encuentra en las costas canarias a poca profundidad, en la zona infralitoral, sobre fondo rocoso donde se adhiere a las rocas. Es una especie que puede alcanzar unos 7-8 cm de largo, por 4,5 cm de ancho aproximadamente (Figura 8).

Es de características muy similares a *Haliotis tuberculata* (especie Europea) producida de forma industrial en países como Francia o Irlanda. Desde un punto de vista de su aplicación industrial, la especie *H. tuberculata spp.* es una candidata idónea,

ya que alcanza en el rango de su tamaño, la talla mínima exigida para su comercialización.

Dicha especie ha sido explotada tradicionalmente a nivel local, siendo sometido a un elevado esfuerzo marisquero durante las últimas décadas, lo que ha motivado que su captura haya disminuido considerablemente y que esté presente en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias en la categoría de *especie vulnerable* (BOC, 2001/097).

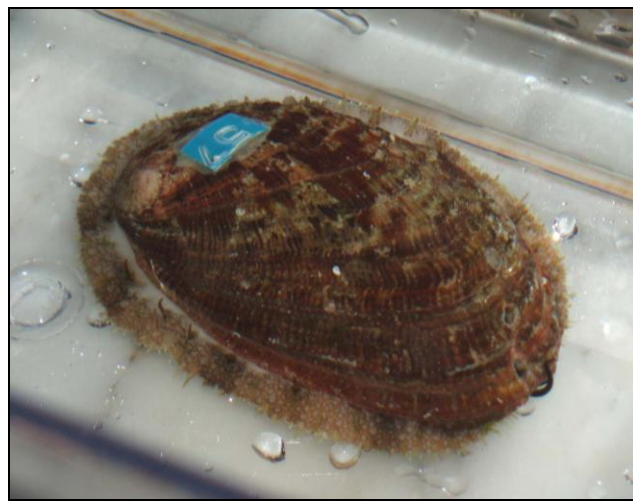


Figura 8: Ejemplar de *Haliotis tuberculata coccinea*.

Esta especie presenta sexos separados y fecundación externa. Los hábitos alimentarios de los abalones varían de acuerdo con la etapa de desarrollo, las larvas, en sus primeros estadios, son planctónicas y lecitotróficas. Conforme crecen se fijan al sustrato y empiezan a alimentarse de algas microscópicas, las diatomeas bentónicas, se alimentan de estas hasta alcanzar aproximativamente los 5 mm de longitud de concha (Kawamura *et al.*, 1995), a partir de los cuales han desarrollado una rádula suficientemente fuerte para empezar a consumir macroalgas. (Hahn, 1989)

La limitación de la producción de semillas de abalón, a gran escala, se centra en la alta mortalidad observada en el momento del asentamiento de las larvas. Esto es

debido fundamentalmente al uso de sustratos de fijación inadecuados y a la necesidad de encontrar una fuente de alimentación adaptada a esa fase de desarrollo. Es el momento crítico en el que el individuo comienza a utilizar su aparato digestivo y a comer las microalgas que se le proporcionan.

1.7. Importancia de las microalgas y su cultivo para acuicultura.

Las microalgas muestran tener un ancho rango de formas y muy diversos ordenes de magnitud en tamaño, (Reynolds, 1984). Hay dos principales fuentes de especies de algas usadas en acuicultura, poblaciones naturales de fitoplancton o cultivos enriquecidos por adición de nutrientes (New, 1990). La segunda fuente son cultivos unialgales, esenciales cuando una fuente de alimento de alta calidad es requerida (Borowitzka, 1997).

El cultivo de microalgas es una necesidad porque el contenido de fitoplancton natural del agua de mar utilizada en los criaderos es insuficiente (Helm *et al.*, 2006). Las microalgas son una fuente esencial de alimento en la cría de todos los estados de los moluscos marinos, así como de las larvas de varios peces marinos, peneidos y del zooplancton (Lebeau y Robert, 2003).

La producción acuícola de plantas acuáticas en 2006 fue de 15,1 millones de toneladas, siendo China el mayor productor con un 72%. El cultivo de plantas acuáticas ha aumentado de manera constante a un ritmo medio anual del 8% desde 1970 (FAO, 2009).

En 1999, la producción de microalgas para acuicultura alcanzó 1.000 t (62% para moluscos, 21% para camarones y 16% para peces) de la producción total mundial acuícola de plantas y animales (Muller-Feuga, 2000).

Para la elección de microalgas para la acuicultura los criterios son: fáciles de cultivar, no tóxicas, adecuado tamaño y forma para ser digeridas, altas calidades nutricionales y paredes celulares digeribles para obtener una mayor disponibilidad de los nutrientes (Spolaore *et al.*, 2006).

Las microalgas han sido consideradas como una fuente nutricional prometedora (Yongmanitchai y Ward, 1991) para suministrar nutrientes esenciales a los animales que las consumen (Knuckey *et al.*, 2002).

El contenido de proteínas en células de microalgas cultivadas con suficientes nutrientes casi siempre excede al contenido de carbohidratos, el cual a su vez, usualmente excede al contenido de lípidos. Las proteínas podrían parecer ser como el menos variable de los componentes principales de las algas (Darley, 1977)

Los carbohidratos, concretamente los polisacáridos, representan el principal componente que forma la pared celular de las diatomeas (Hechy *et al.*, 1973). Muchas diatomeas producen polisacáridos extracelulares en forma de hilos, cápsulas gelatinosas, mucus acolchado y tubos (Darley, 1977).

Las cenizas, materia inorgánica, están representadas en altas cantidades en las diatomeas (Renaud *et al.*, 1999), incluso pudiendo ser mayor al porcentaje en peso seco de las proteínas. En otros grupos de microalgas el porcentaje de cenizas es más bajo que en las diatomeas, esto es debido a que las diatomeas presentan una pared celular silíceo.

Los lípidos de las algas están asociados muchísimas veces a las membranas celulares (Wood, 1974) y a los sistemas de reserva energéticos (Fogg, 1953). Las algas poseen la mayor parte de las clases de lípidos encontrados en organismos marinos (Behrens y Kyle, 1996) y son una fuente cada vez más importante de ácidos grasos. Se considera de especial importancia la capacidad de las microalgas de producir ácidos

grasos poliinsaturados (PUFAs), esenciales en las dietas alimenticias por razones asociadas con sus estructuras específicas (Ackman, 1983; Lands, 1986). Un número de estudios se han dirigido a la optimización de las condiciones de cultivo de las microalgas para producir biomasa rica en PUFAs (Taguchi *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 1992; Reitan *et al.*, 1994; Otero *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2001; Goldberg *et al.*, 2002; Hu y Gao, 2003). Los PUFAs que reciben mayor atención son el ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA 22:6n-3), debido a su importancia nutricional, tanto para la salud humana como para la acuicultura (Borowitzka, 1995; Wen y Chen, 2000).

1.8. Las diatomeas.

Entre las algas marinas, las diatomeas son el mayor componente del fitoplancton y también sirven como fuente fundamental de alimento en acuicultura (St. John *et al.*, 2001). Pertenecen a la clase Bacillariophyceae y su peculiaridad entre otras microalgas es la pared celular de sílice (Lebeau y Robert, 2003).

Son algas pardas eucariotas, unicelulares, diplontes y autótrofas. Poseen cloroplastos y pigmentos como la clorofila a y c, beta caroteno y fucoxantina principalmente. Sus dimensiones están comprendidas entre 20 micrómetros y 0,4 milímetros.

El número total de especies de diatomeas extendidas mundialmente pueden ser al menos 2×10^5 (Mann y Droop, 1996). El número de géneros y especies es del orden de 250 y 100.000 respectivamente (Norton *et al.*, 1996; Van Den Hoek *et al.*, 1997). En el medio natural son abundantes al comienzo de la primavera y otoño, cuando los nutrientes no son limitantes y cuando la intensidad de luz y duración del día son óptimos para la fotosíntesis (Falciatore y Bowler, 2002).

1.8.1. Estructura externa y clasificación.

Su característica mejor conocida es la presencia de un único tipo de pared celular, conocido como “frústulo”, el cual está construido por dos valvas de sílice amorfo polimerizado (Busby y Lewin, 1967), tomando forma de una caja, con una caja cubriendo a la otra (Van Den Hoek *et al.*, 1997); encajadas una sobre otra como una placa de Petri (López *et al.*, 2005).

Cada valva tiene una parte plana que se denomina “teca” y una pieza lateral o borde. Las dos tecas reciben un nombre distinto, la superior se llama “epiteca” y la inferior “hipoteca” (Scala y Bowler, 2001).

Es común la presencia de estructuras accesorias como membranas, setas, espinas, que sirvan para la unión en cadena. La presencia de largas espinas en algunas especies sirve para evitar ataques de depredadores (López *et al.*, 2005).

Poseen poros alineados radiales en el caparazón de sílice que permite la toma de sustancias para su alimento o respirar. Los poros no sólo difieren en su forma entre las especies, también en dimensión y talla, siendo cada uno único (Vrieling *et al.*, 2004).

Según la simetría existen dos tipos de diatomeas, las de simetría radial o centrales, o las que poseen simetría bilateral o pennales.

Las diatomeas céntricas son esencialmente microalgas planctónicas, se encuentran en todas las masas de agua abiertas, mientras las pennales se encuentran la mayoría de las veces en forma bentónica, creciendo sobre sedimentos o agarradas a rocas o microalgas; y algunas especies pueden ser encontradas en suelos (Lee, 1999).

Las diatomeas pennales poseen una estructura central denominada “rafe”; un surco no silicado que recorre toda la célula que les dota de movilidad (2-3 $\mu\text{m/s}$).

1.8.2. Ciclo de vida de las diatomeas.

Las diatomeas son microalgas que se encuentran en todos los ambientes y tienen una elevada tasa de reproducción si las condiciones son adecuadas. La intensa velocidad de división que puede alcanzarse cuando las condiciones son óptimas llega a producir densas floraciones. La presencia de sílice es una necesidad absoluta para la división celular de las diatomeas, de modo que el número de células se mantiene proporcional a la cantidad de dióxido de silicio existente, siempre y cuando los demás nutrientes no sean limitantes.

Presentan dos tipos de reproducción, asexual por bipartición y sexual. Las diatomeas son diplontes y se multiplican vegetativamente por división celular mitótica durante la mayor parte del ciclo de vida (Sabbe *et al.*, 2004).

Cuando la diatomea divide en dos su célula, estas valvas se separan y cada una de ellas con su contenido citoplasmático, da lugar a un nuevo organismo regenerando la media valva que le faltaba (Figura 9). La menor, es decir la interna, es siempre la regenerada, suscitando una reducción del tamaño de los individuos con el tiempo.

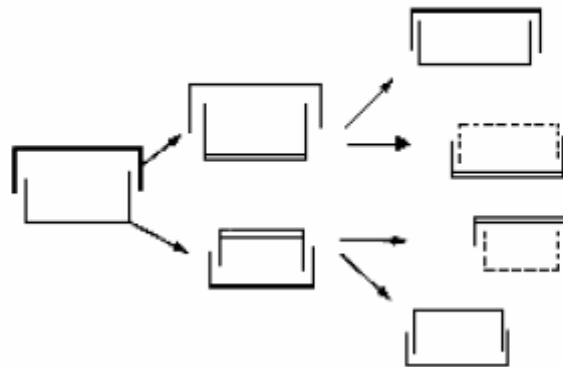


Figura 9: Esquema de la división asexual en las diatomeas.

El rejuvenecimiento del tamaño original celular es usualmente acoplado durante el ciclo sexual (Darley, 1977), contribuyendo también a mantener la variabilidad genética.

1.8.3. Las diatomeas bentónicas o pennales y sus formas de crecimiento.

Estas diatomeas segregan al exterior de su frústulo un mucílago péctico, sustancia viscosa con función protectora. Este les permite agruparse en colonias formando una película después de la división o estar fijadas aisladamente.

Las diatomeas bentónicas están clasificadas en 7 tipos de formas de crecimiento, la clasificación está basada en el modo de fijación, solitaria o forma colonial, movilidad y fortaleza de adhesión (Figura 10) (Kawamura y Hirano, 1992).

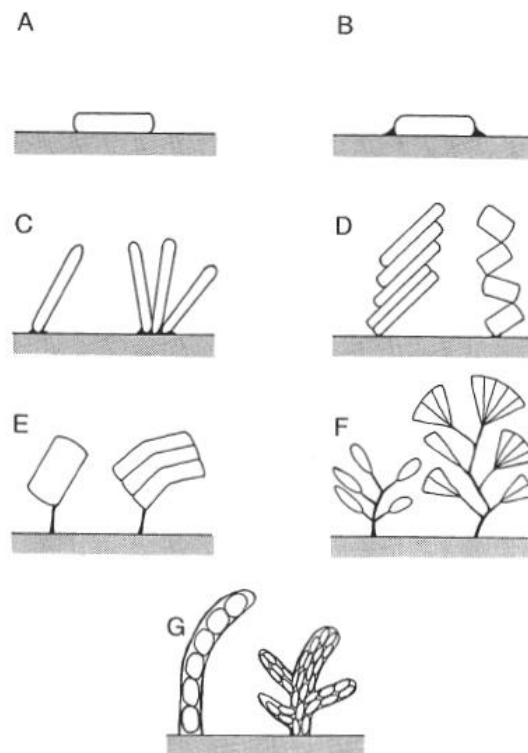


Figura 10: Siete tipos de formas de crecimiento de las diatomeas bentónicas (Kawamura y Hirano, 1992).

Tipo A: Célula solitaria, con hábitat postrado y rápidos movimientos deslizantes. La fortaleza adhesiva es baja.

Tipo B: Célula solitaria, con hábitat postrado y movimientos lentos. La fortaleza de adhesión es muy alta.

Tipo C: No móvil, célula solitaria o simple, colonia con forma de abanico manteniéndose vertical sobre el sustrato.

Tipo D: Larga, colonia con forma de cinta o de zigzag sujeta al sustrato por el final de la colonia.

Tipo E: Célula solitaria o corta, colonia en forma de cinta unida al sustrato con un hilo mucoso.

Tipo F: Rama, colonia arborescente conectada junta por mucus hiloso.

Tipo G: Colonia encerrada en un filamento o rama, arborescente, tubo mucoso. Las diatomeas en el tubo pueden moverse.

1.8.4. Fases de crecimiento de un cultivo de diatomeas bentónicas, requerimientos y bioquímica.

La curva de crecimiento de las diatomeas bentónicas se divide entre las siguientes fases (Figura 11). La primera fase consiste en una fase de adaptación o aclimatación donde las células se adaptan a las condiciones de cultivo. La segunda fase se denomina de crecimiento exponencial cuando la velocidad de división celular se acelera y aumenta el número de células.

Cuando la velocidad de división celular se ralentiza conforme se van limitando los nutrientes y la penetración de la luz a través del cultivo, se entra en la fase estacionaria hasta que se produce la muerte celular y el descenso del número de células en cultivo (Helm *et al.*, 2006).

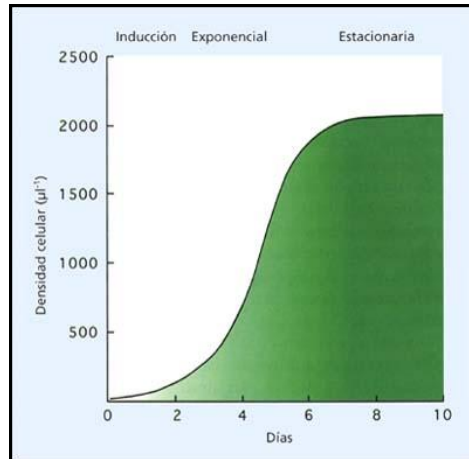


Figura 11: Fases de crecimiento en un cultivo de microalgas (Helm *et al.*, 2006).

Estas fases sólo se pueden observar en condiciones adecuadas de cultivo, considerando que algunos de los más importantes factores para la producción de la biomasa de microalgas son la calidad y disponibilidad de nutrientes, cantidad y calidad de luz, pH, y temperatura. Todas estas variables pueden modificar o limitar la tasa de crecimiento, la producción de la biomasa y la composición bioquímica de la microalgas, y como resultado, su valor nutricional (Kawamura y Hirano, 1992; Flores- Vergara, 1998 y Simental- Trinidad, 2001). Por lo cual, el control de las condiciones de cultivo de las diatomeas bentónicas juega un papel importante en un cultivo como el de post-larvas de abalón, pudiendo afectar su valor nutricional (Brown *et al.*, 1997). Durante las tempranas etapas de desarrollo, las diatomeas bentónicas son la mayor fuente de alimentación para los juveniles de abalón (Kawamura *et al.*, 1995), requieren una alta cantidad y calidad de diatomeas bentónicas que podrán proporcionar una adecuada nutrición para su crecimiento y supervivencia (Wang *et al.*, 1997; Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Daume y Ryan, 2004).

La oferta de una nutrición adecuada conlleva el mantenimiento de una apropiada película de diatomea (Figura 12), equilibrando el incremento en la tasa de ramoneo de las post-larvas con la tasa de crecimiento de las diatomeas (Ebert y Houk, 1984); un paso crítico en el éxito de los criaderos de todo el mundo (Hahn, 1989). Por lo cual, las condiciones de cultivo y fases de crecimiento de las diatomeas son factores importantes que controlar, por el impacto que repercutan sobre la cantidad de células producidas, su composición bioquímica y la fortaleza estructural de la célula (Kawamura y Hirano, 1992). La fortaleza puede afectar la habilidad de las post-larvas de abalón que tienen para romper las células de la diatomea, afectando la absorción del contenido de la célula de diatomea (Kawamura, 1996) y posteriormente a la digestión de esas diatomeas (Roberts *et al.*, 1999b).

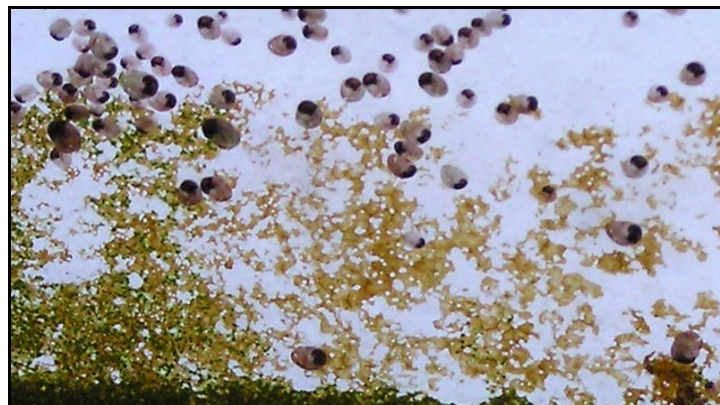


Figura 12: Post-larvas fijadas de *Haliotis tuberculata coccinea*

1.8.5. Criterio de elección de las diatomeas bentónicas objeto del estudio.

Para la realización de este estudio, del impacto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y la calidad de la diatomea bentónica producida, se eligieron las microalgas según la clasificación de las distintas formas de crecimiento de las diatomeas bentónicas descrita por Kawamura y Hirano (1992) y según las diatomeas más comunes

usadas para alimentación de post-larvas de abalón (e. g. *Nitzschia*, *Navicula*) (Lebeau y Robert, 2003). Se escogieron los siguientes géneros:

El género *Amphora* se engloba en la forma de crecimiento Tipo B (**Anexo I**), tiene un modo de asentamiento postrado, solitario (incluye pequeñas colonias constituidas por varias células). Tiene movilidad ocasional y lenta. Su fortaleza de adhesión es muy fuerte siendo capaz de resistir separación por un chorro desde un tubo capilar (Kawamura y Hirano, 1992).

Nitzschia sp. tiene forma de crecimiento Tipo A (**Anexo I**), forma comunidades postradas y solitarias. Se mueve activamente y rápidamente. Su fortaleza de agarre es muy débil, y ligeramente se despegar por una ligera sacudida del recipiente de cultivo (Kawamura y Hirano, 1992).

Navicula incerta tiene forma de crecimiento Tipo A (**Anexo I**) y es beneficiosa para el crecimiento y supervivencia de las post-larvas (Kawamura y Takami, 1995; Kawamura *et al.*, 1998a; Roberts *et al.*, 1999a; Daume *et al.*, 2000) pero la cantidad disponible en el medio natural no puede satisfacer las necesidades industriales, por lo tanto el cultivo en masa de *Navicula incerta* es necesario para satisfacer la demanda de la acuicultura (Affan *et al.*, 2007).

Proschkinia sp. fue escogida debido a que presenta la misma morfología externa que *Navicula incerta*, un género frecuentemente usado en criaderos de abalón, pero con un tamaño inferior. Por su similitud con *Navicula* se deduce que posee la forma de crecimiento Tipo A. *Proschkinia* sp, se incluyó en el presente estudio como candidata interesante para futuros experimentos de alimentación de post-larvas de abalón.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es optimizar las técnicas de producción del cultivo de diatomeas bentónicas, *Amphora* sp., *Navicula incerta*, *Nitzschia* sp. y *Proschkinia* sp. como fuente de alimentación para post-larvas de abalón (*Haliotis tuberculata coccinea*, Reeve, 1846).

Los objetivos específicos del presente estudio se pueden desglosar en los siguientes:

1. Determinar la densidad idónea de cultivo de los 4 géneros de diatomeas bentónicas.
2. Obtener curvas de crecimiento de los 4 géneros de diatomeas a varias densidades de inóculo y su capacidad de fijación.
3. Hallar para todas las densidades la tasa específica de crecimiento.
4. Estudiar la calidad nutricional de las microalgas analizando la composición bioquímica básica (lípidos, proteínas, cenizas y carbohidratos), así como sus contenidos en ácidos grasos, en la fase exponencial y en la fase estacionaria.
5. Seleccionar las diatomeas con tamaño, tasa de crecimiento y composición bioquímica adecuadas para el cultivo de abalón.
6. Elaborar un protocolo de cultivo de diatomeas bentónicas eficiente para la alimentación de las post-larvas de abalón.

Esto permitirá la obtención de una fuente de alimentación larvaria de calidad nutricional adecuada, que permitiría aumentar la supervivencia y el crecimiento de las post-larvas de *H. tuberculata coccinea* en la etapa más crítica del cultivo.

MATERIAL

Y

MÉTODO

3. MATERIAL Y MÉTODO.

Los experimentos de cultivo de diatomeas bentónicas en tubos de ensayos, en placas de Petri y en bolsas de plástico transparentes fueron llevados a cabo en la planta de producción animal del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), Gran Canaria, durante los meses de Junio a Octubre del 2007. *Amphora* sp., *Nitzschia* sp. y *Proschkinia* sp. proceden de la colección de microalgas que se conserva en el Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN, CSIC), Puerto Real, (Cádiz) (Figura 13). Mientras *Navicula incerta* proviene de un banco de algas de la Universidad Autónoma del estado de Baja California.



Figura 13: Diatomeas en pipetas Pasteur transportadas desde el ICMAN, Cádiz.

3.1. Acondicionamiento y mantenimiento de las diatomeas bentónicas.

Las diatomeas transportadas en pipetas Pasteur desde el ICMAN se mantuvieron en una sala independiente, con control de temperatura e iluminación. Las manipulaciones de las microalgas se realizan en ambiente esterilizado con alcohol y bajo la llama de un mechero Bunsen, por personal equipado de guantes. Las cuatro diatomeas fueron inoculadas por triplicado en tubos de ensayo con medio F/2, y en erlenmeyers de 250 ml y escalonadas a balones de 1 l, 2 l y 4 l (Figura 14).

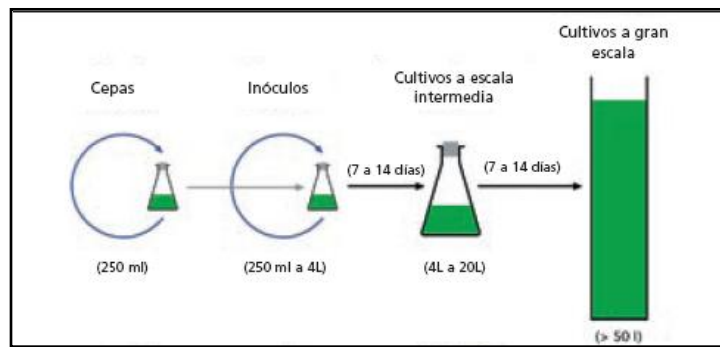


Figura 14: Etapas en la producción de algas hasta los cultivos a gran escala (Helm *et al.*, 2006).

Todos los cultivos fueron mantenidos sin aire, bajo iluminación continua y replicados a intervalos regulares con el fin de mantener su calidad y renovarlos.

Las diatomeas bentónicas, en el laboratorio, crecen en el cristal como sustrato (Garduño *et al.*, 1996). Las diatomeas adheridas a las paredes del recipiente se colectan con una pipeta Pasteur para servir de nuevo inóculo. El medio de cultivo F/2 utilizado se prepara con agua de mar filtrada, a través de un filtro de cartucho de membrana de 1µm, y pasada por luz ultravioleta, añadiéndole a continuación el resto de los componentes, que serán descritos a continuación. Posteriormente se autoclava a 121°C durante 20 min. a una presión de 1,05 Kg./cm². Las vitaminas se añaden cuando enfríe el medio de cultivo esterilizado en el autoclave.

El medio de cultivo F/2 de Guillard (1975):

Disolución de macronutrientes (Solución 1: Disolver en 1000 ml de agua destilada)

- Nitrato NaNO₃ 75,0 g
- Fosfato NaH₂PO₄ · H₂O 5,0 g

Disolución de silicatos (Solución 2: Disolver en 1000 ml de agua destilada)

Silicato Na₂SiO₃ · 9 H₂O 30,0 g.

Disolución de Metales traza:

Solución 3 (Disolver en 900 ml de agua destilada Na_2EDTA 4,36 g):

$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 3,15 g.

Solución 4 (Disolver cada uno en 100 ml de agua destilada):

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,10 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,22 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1,8 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,10 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,06 g

Añadir 1ml de cada una de las disoluciones, de la solución 4 a la solución 3 y ajustar el volumen final hasta 1l con agua destilada.

Disolución de Vitaminas (Solución 5: Disolver en 1000ml de agua destilada)

Biotina 0,5mg

B12 0,5 mg

Tiamina HCl 100 mg

Se añade 1 ml de las soluciones anteriores (#1-5) a cada litro de agua salada de cultivo de diatomeas.

3.2. Caracterización de las diatomeas.

Se recogieron muestras de las microalgas, de los cultivos líquidos, con pipeta Pasteur y se introdujeron en un Ependoff. Para la separación de las células, las muestras se pasaron, durante varios minutos, por sonicador modelo 3510E-MT de la marca Branson, Ultrasonic Cleaner, con una salida de 100 W y frecuencia 42 Hz +/- 6%.

La muestra sonicada se observó en el microscopio (x1000) para caracterizar las diatomeas y medirlas. Las microalgas fueron fotografiadas con una cámara Olympus C3040-ADU y el tamaño de las diatomeas fue determinado con el software de imagen Adobe Photoshop.

La escala de 10 μm sirvió de referencia para el cálculo de las medidas de las microalgas (Figura 15). Se tomaron, para cada diatomea, medidas de longitud y anchura de seis células en distintas fotos.

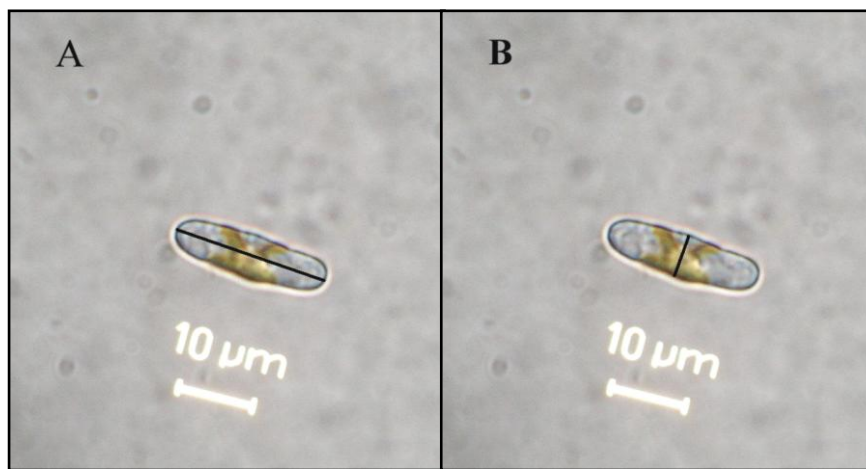


Figura 15: Medida del largo celular (A) y del ancho (B) de *Navicula incerta* con una escala de 10 μm en el objetivo de 100x.

3. 3. Montaje estantería.

Los experimentos se realizaron en una estantería con dos estantes (Figura 16). Tubos de luz blanca de 36 W se suspendieron de la parte superior a una distancia de 45 cm de las estanterías, proporcionando una intensidad de luz de 6.000 lux en la superficie de la estantería. El agua de mar suministrada para los cultivos de microalgas en la estantería está filtrada por cartucho hasta 1 μm y esterilizada por una lámpara UV.

Se cubrió la estantería con un sombreado, para limitar las oscilaciones de intensidad de luz con el transcurso de las horas y de los días.



Figura 16: Estantería dentro de la planta de producción animal para realizar los experimentos de las microalgas.

3.4. Medición y análisis de parámetros.

3.4.1. Temperatura.

La temperatura se midió cada día de cultivo, tanto en los experimentos realizados con tubos de ensayo, como con placas de Petri, así como en las bolsas de plástico transparente. Fue medida con un termómetro varilla relleno de mercurio con una escala de 10 a 110 °C dentro de cada recipiente correspondiente a cada experimento. La temperatura se media a la misma hora que se anotaba la intensidad de luz. Las medidas siempre se tomaron en la mañana a las 13:30 h, durante el transcurso de los experimentos.

3.4.2. Radiación.

La intensidad de luz que llegaba a los tubos de ensayo, a las placas de Petri, o a las bolsas de cultivo, según el experimento realizado, se midió con un luxómetro digital “Digital Light Meter”, modelo HT170N (Figura 17).

Se tomaron dos medidas en los experimentos de los tubos de ensayo, una en la base de los tubos y otra en la superficie de los tubos para realizar la media de la luz recibida por los tubos. En las placas de Petri se tomó la medida en la base de las placas

y en las bolsas de cultivo para los análisis bioquímicos, se tomaron en la superficie de las bolsas. Las medidas siempre se tomaron a las 13:30h, durante el transcurso de los experimentos.



Figura 17: Luxómetro para medir diariamente la intensidad de luz a la cual estaban sometidos los cultivos de diatomeas.

3.5. Experimentos de crecimiento algal.

Todas las microalgas crecieron bajo idénticas condiciones, de temperatura, $28,5 \pm 1,4$ °C, intensidad de luz 5403 ± 649 Lux ($62 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o $16 \pm 2 \text{ W m}^{-2}$) y medio de cultivo (F/2). Los cultivos fueron no axénicos y en cada experimento las diatomeas se cultivaron por triplicado. Los experimentos en tubos de ensayo, para observar la biomasa celular, y en placas de Petri, para ver las células adheridas al sustrato, fueron realizados a diferentes densidades de inóculo, 50.000, 100.000 y 250.000 células/ml. Ambos se realizaron durante 7 días de cultivo y con fotoperiodo constante de 24:0 h luz: oscuridad.

3.5.1. Cultivo en tubos de ensayo.

3.5.1.1. Descripción.

Se cultivaron las cuatro microalgas (*Amphora* sp., *Nitzschia* sp., *Proschkinia* sp. y *Navicula incerta*) en tubos de ensayo en la estantería de la planta de cultivo durante 7 días. Se probaron tres densidades distintas, 50.000 cél/ml, 100.000 cél/ml y 250.000 cél/ml. Se realizaron contajes diarios de las células para definir la curva de crecimiento de cada microalga. Para cada densidad experimental se contabilizaron cada día tres muestras de tres tubos de cada diatomea, para contarlos y desecharlos. Para cada densidad, en total se inocularon 21 tubos de cada diatomea (7 días cultivo x 3 replicas de tubos), tapados con film de parafina para que entrase la luz, pero sin aire. Todos los tubos se colocaron en una gradilla, mantenidos en posición vertical y la fuente luminosa situada encima de los tubos.

Los 21 tubos de cada diatomea y densidad fueron mantenidos en las mismas condiciones e inoculados el día “0” a la misma densidad, partiendo de un inóculo de un cultivo madre de la misma edad para todos.

La estimación de la densidad algal por muestra, tanto en cultivos madres como en tubos experimentales, se realizó después de agitar los tubos durante 1-2 minutos en un vortex, a máxima velocidad, y de pasarlos unos minutos por un sonicador modelo 3510E-MT de la marca Branson, Ultrasonic Cleaner, con una salida de 100 W y frecuencia 42 Hz +/- 6%.

La sonicación es un método seguro, no destructivo para despegar y poner en suspensión las diatomeas (Votolina, 1991). Las células sonicadas se muestrearon con una cámara de contaje o de Neubauer, modelo Thoma, para estimar la densidad celular de las diatomeas sonicadas. La cámara es un portaobjeto de cristal grueso con dos

cámaras, cuadrículadas, en la superficie, una arriba y otra abajo, de 0,2 mm. x 0,2 mm. cada una. Las cámaras se llenan por capilaridad después de haber echado 1-2 gota de muestra en cada una, se coloca un cubreobjetos sobre las dos cámaras proporcionando una profundidad de 0,1 mm., haciendo que el volumen total de la cámara sea de 0,004 mm³ que equivalen también a 0,004 μlitros (Figura 18).

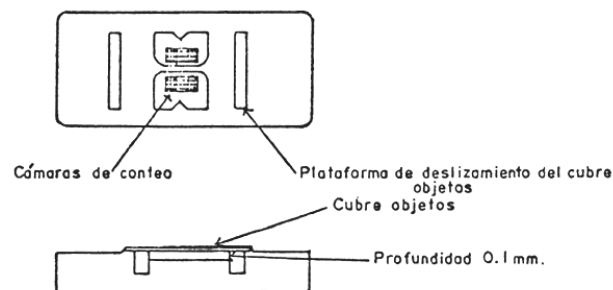


Figura 18: Cámara de Neubauer. (Torrentera y Tacon, 1989).

Las cámaras están subdivididas en cuadrados principales, estando estos a su vez divididos en 4 x 4 cuadrados secundarios (Figura 19). Se contabilizó la densidad de cada muestra, contando cinco cuadrados principales de la cámara, los de las cuatro esquinas y uno central y se hallaba la media (Torrentera y Tacon, 1989).

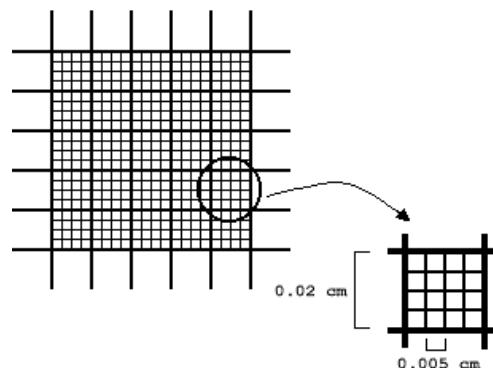


Figura 19: Diagrama de cuadrícula en una cámara de Neubauer

3.5.1.2. Cálculos.

Para calcular el número de células/ ml se tiene en cuenta el volumen de la cámara:

Volumen de la cámara: $0,2 \times 0,2 \times 0,1 = 0,004 \text{ mm}^3 = 0,004 \mu\text{l}$

M_{5C} (media de los 5 cuadrados) = $[(C1 + C2 + C3 + C4 + C5) / 5]$

Concentración Células/ ml = $(M_{5C} / 0,004) \times 1000 = (M_{5C} / 4) \times 10^6$

Las células que se contabilizaron son las que estaban situadas dentro del área y las que tocaron la línea izquierda e inferior, siempre igual en todos los cuadrados para evitar células contadas por duplicado.

Las células se contabilizaron con un microscopio (x400) (Figura 20).



Figura 20: Microscopio con cámara utilizado para contabilizar las células de diatomeas.

El volumen de inóculo necesario para cada densidad experimental de cultivo se calculó, según la ecuación:

$$D_i \times V_i = D_f \times V_f$$

Donde:

- _ D_i , densidad algal en cultivo madre.
- _ V_i , volumen de inóculo necesario de cultivo madre.
- _ D_f , densidad algal a día 0 en tubos de ensayo experimentales.
- _ V_f , volumen total de los tubos de ensayo experimentales.

Los inóculos se llevaron a cabo bajo la llama de un mechero en una campana, para evitar contaminación (Figura 21). Las pipetas y tubos se autoclavaron igual que el medio de cultivo.



Figura 21: Inóculos realizados bajo una campana de flujo laminar.

Una vez inoculados los 21 tubos/diatomea, se rellenaron hasta alcanzar un volumen final de 10 ml.

3.5.2. Cultivo en placas de Petri.

3.5.2.1. Descripción.

Se cultivaron las cuatro microalgas (*Amphora* sp., *Nitzschia* sp., *Proschkinia* sp. y *Navicula incerta*) en placas de Petri, de 9 cm de diámetro y de 20 ml de volumen, en la estantería de la planta de cultivo durante 7 días. Se probaron tres densidades distintas, 50.000 cél/ml, 100.000 cél/ml y 250.000 cél/ml. Se realizaron contajes diarios de las células para definir el número de células adheridas diariamente para cada diatomea. Se utilizaron cubreobjetos de vidrios, dentro de placas de Petri, como sustratos de fijación de las diatomeas. Para cada densidad experimental, se contabilizaron cada día tres cubreobjetos de tres placas de Petri de cada diatomea, para contarlos y desecharlos. Para cada densidad, en total se contabilizaron 21 cubreobjetos de cada diatomea (7 días cultivo x 3 replicas), en placas de Petri. Todas las placas de Petri se colocaron en la estantería a la misma altura de la fuente de luz, encima de cajas de plástico para recibir la misma cantidad de luz que los tubos de ensayos (Figura 22).

Las placas de Petri de cada diatomea y densidad fueron mantenidas en las mismas condiciones e inoculadas el día “0” a la misma densidad, partiendo de un inóculo de un cultivo madre de la misma edad para todas.

La metodología del inóculo de las placas de Petri fue igual que la descrita para los tubos de ensayo. Una vez inoculadas las placas de Petri, se rellenaron hasta alcanzar un volumen final de 20 ml. Cada día se muestreaban las tres replicas de cada diatomea proveniente de distintas placas de Petri. Se lavaba el cubreobjetos con un botellín de agua de mar filtrada a 1 micrómetro, echando un chorro longitudinal al cubre para eliminar las células que no estaban pegadas. La duración del lavado era igual para todos los cubreobjetos, así no se arrastraban más células por la presión.

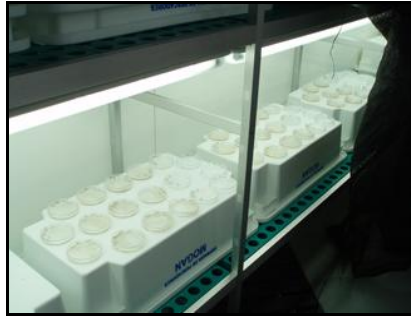


Figura 22: Placas de Petri en la estantería conteniendo las diatomeas.

Las células adheridas a los cubreobjetos se fotografiaron con un microscopio (x400) (Figura 23). De cada cubreobjeto se sacaron 10 fotos al azar y los conteos se realizaron posteriormente en el ordenador mediante las fotos.

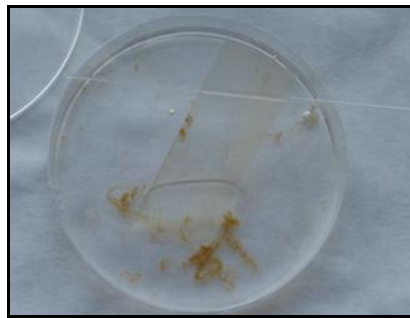


Figura 23: Extracción del cubre con pipeta Pasteur.

3.5.2.2. Cálculos del número de células adheridas

Para contar las células en las fotografías se usó el programa fotográfico Adobe Photoshop CS. El área de visión del objetivo se midió mediante el programa de imagen para microscopios, Image Pro-Plus, siendo ésta de $0,1 \text{ mm}^2$. De esta área se cogió en todas las fotografías un cuadrado al azar de $6.500 \mu\text{m}$, en el cual se contabilizaron las células adheridas.

El número medio de células por mm^2 de cada cubreobjeto se calculó a base de los 10 datos de cada uno.

3.6. Cálculos tasa de crecimiento.

Un cultivo de microorganismos crece de manera que la tasa de adición de células es proporcional al número presente de células “crecimiento exponencial”. Las células por término medio se dividen en un tiempo característico denominado tiempo de división, también denominado tiempo de generación o de duplicación (Guillard, 1973).

Tanto en los cultivos en tubos de ensayos como en los de placas de Petri, se calculó la tasa específica de crecimiento, semanal y en la fase exponencial, para las cuatro diatomeas a las tres densidades de inóculo.

Se utilizó la fórmula siguiente (Guillard, 1973):

$$\mu = \text{Ln} (F_1/F_0) / t_1 - t_0$$

Donde:

F_1 = densidad de células en el tiempo de la recogida, t_1 .

F_0 = densidad de células a tiempo cero, t_0 .

t_1 = tiempo final o de la recogida.

t_0 = tiempo inicial.

3.7. Cultivo en bolsas para análisis bioquímico.

3.7.1. Inóculo de las bolsas.

Las bolsas se cultivaron durante cinco días sin aire partiendo de un inóculo de un cultivo madre de la misma edad para todas.

La densidad de inóculo que se utilizó para iniciar el cultivo en bolsas, fue basada en los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, tomando como

criterio, la tasa específica de crecimiento y la producción alcanzada en la fase exponencial y semanal, al séptimo día, así como la capacidad de adhesión de las células según la densidad.

Cada diatomea se cultivó a la densidad de 100.000 células/ml. Se cultivaron en la estantería 6 bolsas de 10 l para cada diatomea, tres cosechadas a día 3 de cultivo, en fase exponencial, y las otras tres a día 5 de cultivo, en fase estacionaria (Figura 24). El medio de cultivo utilizado fue el F/2, en agua de mar filtrada a 1 micrómetro y tratada con UV. Las condiciones de luz y de temperatura fueron las mismas que en los experimentos descritos anteriormente.

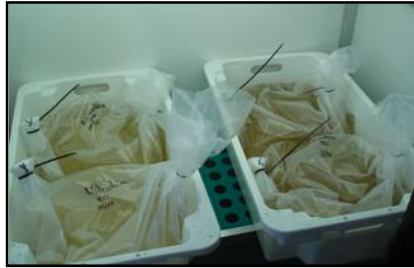


Figura 24: Bolsas de cultivo de 10 l para obtener las muestras bioquímicas.

3.7.2. Cosechado de las bolsas.

Al día 3 y 5 de cultivo se cosecharon 3 bolsas de cada diatomea de diatomea en fase exponencial y estacionaria. Se filtraron con un tamiz de 20 μm , y las células cosechadas se enjuagaron con agua dulce y se colocaron encima de papel secante para retirar el exceso de agua antes de pesarlas en una balanza analítica de precisión. Cada muestra se almacenó en bolsa de plástico etiquetada, para su preservación y su posterior análisis bioquímico. (Figura 25).



Figura 25: Bolsas de plástico por triplicado de *Proschkinia* sp. en fase exponencial.

3.8. Análisis bioquímicos.

Las muestras de diatomeas cosechadas se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron transportadas en frío al Instituto Universitario de Salud Animal (IUSA) en Arucas, Gran Canaria, para posterior análisis.

Se analizó, por triplicado, la composición proximal (lípidos totales, proteínas, cenizas y carbohidratos), así como los contenidos en ácidos grasos, de cada muestra, para las cuatro diatomeas y para cada fase de cultivo (exponencial y estacionaria). Para la ruptura de las células de todas las muestras fueron homogenizadas a mano y con mortero antes de los análisis (Parker *et al.*, 2007). Entre cada análisis las bolsas se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de nitrógeno.

3.8.1. Determinación de lípidos totales.

Los lípidos fueron determinados por el método de extracción cloroformo-metanol (2:1), (Folch *et al.*, 1957).

Se pesan 300-400 mg de muestra y se añaden 5 ml de cloroformo-metanol (C:M), se homogeniza 5 min. con Ultra Turrax (IKA-Werke, T25 Basic, Staufen, Germany) limpiando el vástago con 5 ml de C:M.

Se añaden 2 ml de KCl y se centrifuga durante 5 min. a 2000 r.p.m. para separar las fases. Se desecha la parte superior que tiene la sal y el metanol y se filtra la parte inferior con los lípidos y el cloroformo. Se añade al filtro anhidro sulfato sódico (Na_2SO_4) para eliminar las sales y triclorometano para que no queden retenidos los lípidos (Figura 26).



Figura 26: Filtrado para eliminar las sales de las muestras.

El filtrado se evapora con nitrógeno (N_2) para eliminar el cloroformo, quedando solamente los lípidos totales extraídos. Se ponen todos los tubos en un baño de agua destilada para la evaporación. A continuación se pesan los lípidos en una balanza de precisión.

Los lípidos se calculan mediante la ecuación:

$$\% \text{ Lípidos} = \text{gr. lípidos} / \text{gr. muestra} * 100$$

3.8.2. Determinación de proteínas.

Las proteínas totales fueron calculadas por nitrógeno Kjeldahl. El valor de proteína bruta se calcula midiendo el contenido en nitrógeno (N_2) total de la muestra.

3.8.2.1. Digestión.

Se pesan entre 150- 200 mg de muestra en una balanza analítica. Las muestras pesadas se ponen en tubos alargados con dos pastillas catalizadoras de cobre. A cada tubo se añaden 10 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4), a su vez se realiza un blanco con solo dos pastillas catalizadoras y 10 ml de H_2SO_4 para la valoración posterior de las muestras.

Las muestras con el sulfúrico añadido se digieren en un digestor a 400 °C durante 1 hora bajo campana de gases. Finalizado el tiempo de digestión se dejan enfriar entre 15- 25 min.

3.8.2.2. Destilación.

Se preparan los matraces que servirán para la destilación con 10 ml de ácido bórico saturado. Se añaden a todos los matraces 10 gotas del indicador. Cuando los tubos estén fríos se añade al tubo que se va a destilar 20 ml de agua destilada (H_2O) y se agita en un vortex, se va repitiendo el mismo procedimiento uno a uno con todos los tubos digeridos.

La destilación se realiza en un destilador (Foss Tecator, 1002, Höganäs, Suecia) que dispensa la sal NaOH (40%) en el tubo de digestión.

3.8.2.3. Valoración.

Se valora el contenido del matraz con ácido clorhídrico (HCl) a 0,1 N.

Se echa gota a gota el HCl, a través de una bureta sobre el matraz, se para cuando el color del matraz pase de azul a fucsia. Se anota la cantidad de HCl que consumió el blanco y se valoran las muestras de la misma manera.

Una vez finalizada las valoraciones de todas las muestras se realizan los cálculos:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{[(\text{ml HCl consum. muestra} - \text{ml HCl consum. blanco}) \times N \times M_w \times F \times 100]}{\text{Peso muestra (mg)}}$$

Donde:

N = Normalidad del HCl utilizado en la valoración (0,1)

M_w = Peso molecular del N= 14,007.

F = Factor de conversión empírico= 6,25.

3.8.3. Determinación de cenizas.

El contenido en cenizas se determina según el método aceptado por la AOAC, (1995), incineración en el Horno Mufla durante 24 horas a 600 °C hasta peso constante. Se pesaron 200- 300 mg de muestra en un crisol de cerámica previamente pesado y numerado (Figura 27). Se dejan toda la noche en el mufla hasta el día siguiente. Antes de pesarlos de nuevo en la balanza analítica, se dejan enfriar 1 hora en un desecador hasta temperatura ambiente.

El porcentaje de cenizas se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{gr. cenizas}}{\text{gr. muestra}} \times 100$$



Figura 27: Crisol de cerámica pesado en la balanza analítica.

3.8.4. Determinación de la humedad.

La humedad contenida en las muestras se determina siguiendo el método aceptado por la Asociación Química Analítica Oficial de los Estados Unidos (AOAC, 1995). Se calcula por la pérdida de peso de las muestras después de secarlas en una estufa durante 24 horas a 110 °C.

Una alícuota de 200- 300 mg se pone en un pesafiltro previamente pesado, y se pesa todo el conjunto (P_i), todas las muestras se pesan en una balanza analítica con precisión de 0,0001 g.

Se dejan destapados los pesafiltros en la estufa hasta el día siguiente. Pasadas las 24 horas se tapan, dejándolas enfriar en un desecador, durante media hora hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente, se vuelven a pesar de nuevo en la misma balanza hasta que el peso de la muestra se haga constante (P_f).

La humedad se calculaba mediante la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = (P_i - P_f) / P_i * 100$$

3.8.5. Determinación de carbohidratos.

Los carbohidratos no fueron analizados sino calculados directamente mediante la diferencia de la suma del resto de los componentes:

$$\text{Carbohidratos} = 100 - (\text{Lípidos} + \text{Proteínas} + \text{Cenizas})$$

3.8.6. Determinación de los ácidos grasos.

3.8.6.1. Transesterificación en medio ácido- Metilación.

Los lípidos extraídos fueron transmetilados a ácidos grasos metil ésteres (FAMEs) con ácido sulfúrico: metanol al 1% (Christie, 1982).

Los FAMEs se extraen con Hexano. Se filtran con cartuchos Sep-pack de NH₂ en la gradilla de filtrado por vacío.

Se evapora a sequedad para eliminar el Hexano y se pesan los FAMEs. Con una pipeta Pasteur se trasvasan a un vial con selyum y tapa bien etiquetado y se guardan con atmósfera de N₂ antes de almacenarlos en el frigorífico a -80 °C.

3.8.6.2. Cromatografía de gases.

Los ácidos grasos metil ésteres (FAMEs) fueron analizados en un Termo Finnigan- GC Focus, un cromatógrafo de gases con un detector ionizante de llama (260 °C) (Tabla IV). Fueron separados con columna capilar Supercowax 10 (28 m. x 0,32 mm. x 0,25 d.i.) usando Helio como gas portador. Se identificaron por comparación con los tiempos de retención de estándares externos (Viana *et al.*, 2007). La concentración de cada ácido graso fue calculada por la correspondiente área en el cromatograma, con

ayuda del software ChromLab, dando como resultado los porcentajes del total de ácidos grasos

Tabla III: Resumen de las características del cromatógrafo de gases.

Aparato	Thermo Finnigan – GC Focus. (Milán, Italia)
Columna	Supercowax 10 (28 m. x 0,32 mm. y 0,25 d.i.)
Gas portador	He (presión constante de 100 KPa.)
Detector	FID a 250 °C
Temperatura en inyector	250 °C
Horno	T ^a inicial 170 °C durante 10 minutos, ΔT^a de 2,5 °C/min. hasta 220 °C durante 5 min., tiempo total de 35 min.

3.9. Análisis estadístico.

Los datos fueron tratados estadísticamente, con el programa informático, Statgraphics Plus 5.1, por análisis de una vía de la varianza (ANOVA), tanto para los datos de crecimiento (densidad y tasa de crecimiento) como para los datos de bioquímica (lípidos, proteínas, cenizas, carbohidratos y ácidos grasos). Cuando se requería los datos fueron transformados para alcanzar la normalidad y homogeneidad. Los datos que presentaban diferencia significativa ($P < 0.05$) se analizaron por pares utilizando el test de Duncan y cuando fuera apropiado el test de Tukey HSD. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, cuando los datos después de transformarlos no alcanzaban la normalidad o la igualdad en varianza.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de las cuatro diatomeas objeto de estudio.

La vista valvar, de las células de cada diatomea, fue fotografiada en el microscopio para caracterizar cada una de ellas. (Figura 29). *Amphora* sp. tiene forma cymbeloide (Figura 28A), como una media luna, *Navicula incerta* y *Proschkinia* sp. tienen forma elíptica (Figura 28B), y *Nitzschia* sp. de paralelogramo (Figura 28C).

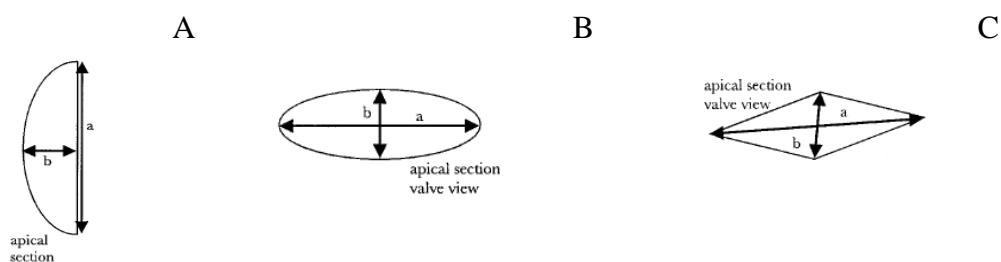


Figura 28: Clasificación de las microalgas según las formas geométricas que presentan (Hillebrand *et al.*, 1999). “a” es la longitud celular (eje apical) y “b” es el ancho celular (eje transapical).

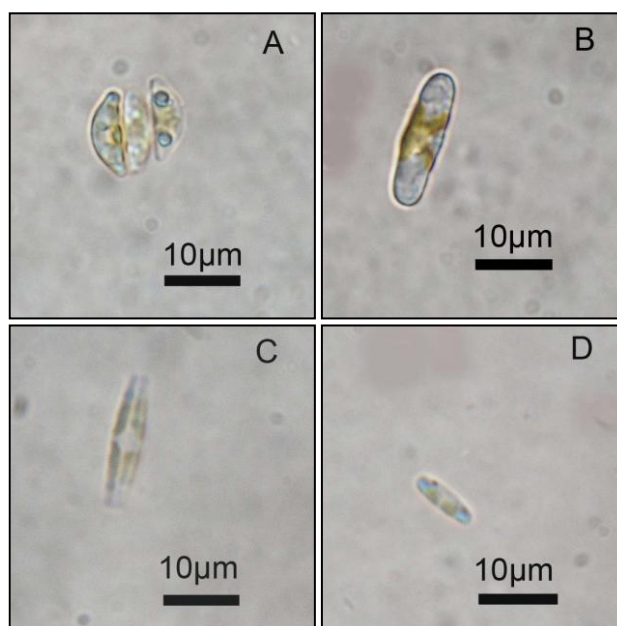


Figura 29: Diatomeas bentónicas caracterizadas en el microscopio (x1000). A=*Amphora* sp. B=*Navicula incerta*. C=*Nitzschia* sp. D=*Proschkinia* sp.

Las medidas del tamaño de las cuatro diatomeas, *Amphora* sp., *Navicula incerta*, *Nitzschia* sp. y *Proschkinia* sp. se muestran en la Tabla IV. También se detallan las

formas de crecimiento, especificando el tipo de crecimiento y fortaleza adhesiva. Esta clasificación está basada en el modo de fijarse al sustrato, si es solitaria o en colonias, y por la movilidad de la célula y fortaleza de agarre, según Kawamura y Hirano (1992).

Tabla IV: Medidas del largo y ancho celular de las diatomeas.

Diatomeas	Largo celular μm (media \pm DS.)	Ancho celular μm (media \pm DS.)	Forma de crecimiento ^a	
			Tipo	Fortaleza adhesiva
<i>Amphora</i> sp.	10,60 \pm 0,20	3,67 \pm 0,12	B	Muy fuerte (+++)
<i>Navicula incerta</i>	18 \pm 0,95	4,10 \pm 0,40	A	Muy débil (+)
<i>Nitzschia</i> sp.	18,23 \pm 0,55	3 \pm 0,20	A	Muy débil (+)
<i>Proschkinia</i> sp.	8,20 \pm 0,42	3 \pm 0,12	A	Muy débil (+)

^aLa forma de crecimiento y la fortaleza adhesiva de las diatomeas bentónicas fue clasificada por Kawamura y Hirano (1992).

4.2. Cultivo de las diatomeas en tubos de ensayo.

4.2.1. Características de las curvas de crecimiento.

Amphora sp.

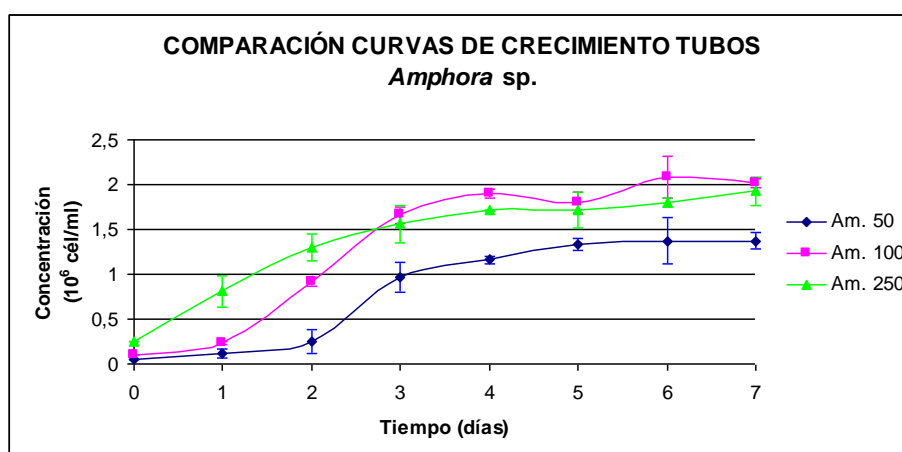


Figura 30: Curvas de crecimiento de *Amphora* sp. a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

El día 3 de cultivo presentan las tres densidades estudiadas, el punto de inflexión entre las dos fases de cultivo (Figura 30).

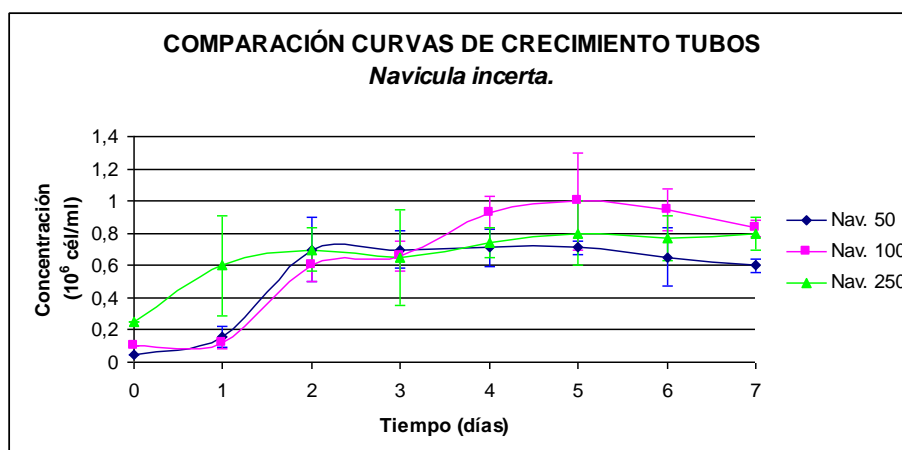
Navicula incerta

Figura 31: Curvas de crecimiento de *Navicula incerta* a las tres diferentes densidades de inóculo. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

Todas las curvas presentan una evolución similar, la mayor diferencia en producción se ve a día 1 entre la densidad de 250.000 células/ml, con la mayor producción, y las demás densidades (Figura 31).

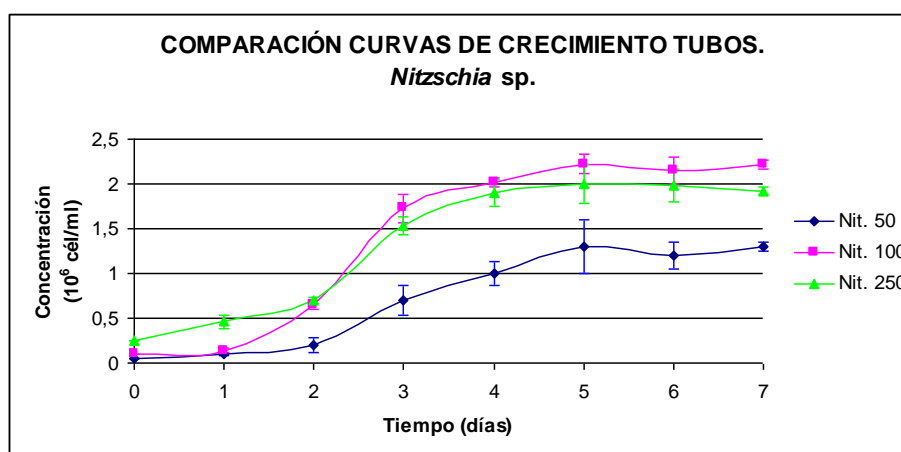
Nitzschia sp.

Figura 32: Curvas de crecimiento de *Nitzschia sp.* a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

Nitzschia sp. a la densidad de 100.000 y 250.000 células/ml presenta las dos fases de cultivo bien definidas. (Figura 32).

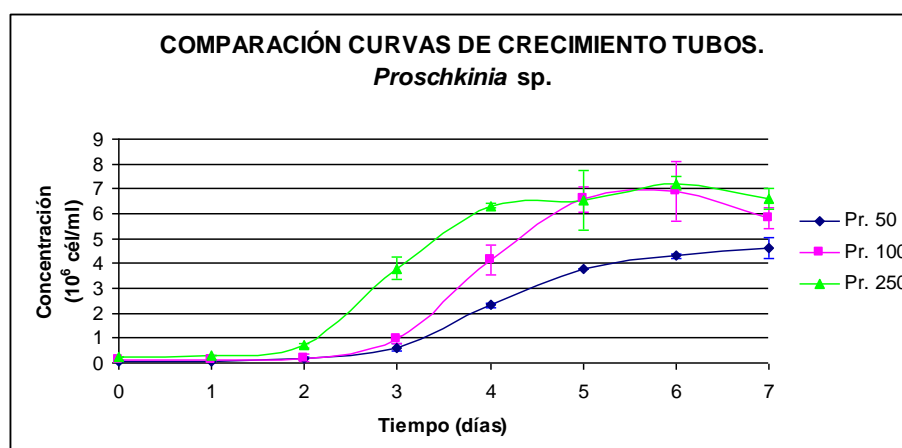
Proschkinia sp.

Figura 33: Curvas de crecimiento de *Proschkinia sp.* a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

Proschkinia sp. a cualquier densidad tiene un crecimiento inicial más lento que el resto de las diatomeas (Figura 33).

4.2.2. Efecto de la densidad sobre la tasa de crecimiento exponencial, semanal, y sobre la producción celular.

Amphora sp.

Tabla V: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y número de células (10⁶ cél/ml) de *Amphora sp.* a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.

<i>AMPHORA SP.</i>	EXPONENCIAL (DÍA 3)	SEMANAL (DÍA 7)
Densidad (10 ³ cél/ml)	Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹)	
Am. 50	0,983±0,064 ^a	0,473±0,010 ^a
Am. 100	0,937±0,018 ^a	0,430±0,004 ^b
Am. 250	0,610±0,046 ^b	0,291±0,011 ^c
	Células contadas (10 ⁶ cél/ml)	
Am. 50	0,970±0,174 ^b	1,372±0,095 ^b
Am. 100	1,662±0,090 ^a	2,025±0,050 ^a
Am. 250	1,563±0,214 ^a	1,925±0,156 ^a

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P < 0,05$).

Amphora sp. a 100.000 células/ml de inóculo (Am. 100.) presenta la mayor tasa de crecimiento exponencial, $0,937 \pm 0,018$ (día⁻¹), junto a Am. 50 ($P > 0,05$) y son significativamente superiores ($P < 0,05$) a la de *Amphora* sp. a 250.000 células/ml (Am. 250.) A día 3 y a día 7, Am. 100. alcanza la máxima densidad celular junto a Am. 250., no presentando diferencias significativas entre ellas ($P > 0,05$)

Am. 50. presenta la mayor tasa de crecimiento a día 3 y a día 7, con $0,983 \pm 0,064$ y $0,473 \pm 0,010$ (día⁻¹) respectivamente, así como el menor número de células. En ambos casos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) con las demás densidades (Tabla V).

Navicula incerta.

Tabla VI: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y número de células (10^6 cél/ml) de *Navicula incerta* a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.

NAVICULA INCERTA	EXPONENCIAL (DÍA 3)	SEMANAL (DÍA 7)
Densidad (10^3 cél/ml)	Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹)	
Nav. 50	$0,870 \pm 0,060^a$	$0,355 \pm 0,011^a$
Nav. 100	$0,630 \pm 0,044^b$	$0,302 \pm 0,009^b$
Nav. 250	$0,301 \pm 0,130^c$	$0,165 \pm 0,018^c$
	Células contadas (10^6 cél/ml)	
Nav. 50	$0,684 \pm 0,124$	$0,60 \pm 0,043^b$
Nav. 100	$0,663 \pm 0,088$	$0,83 \pm 0,054^a$
Nav. 250	$0,650 \pm 0,265$	$0,80 \pm 0,102^a$

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P < 0,05$).

La tasa de crecimiento a día 3 y 7 disminuye conforme aumenta la densidad de inóculo utilizada, teniendo la mayor tasa de crecimiento *Navicula incerta* a 50.000 células/ml (Nav. 50.) con $0,87 \pm 0,060$ (día⁻¹) a día 3 y $0,355 \pm 0,011$ (día⁻¹) a día 7. A

día 3 las densidades no presentan diferencias significativas en número de células con $0,66 \times 10^6$ cél/ml ($P > 0,05$). A día 7 la máxima producción la alcanzan *Navicula incerta* a 100.000. y 250.000 células/ml (Nav. 100. y Nav. 250.). con $0,83 \pm 0,054 (x10^6)$ y $0,8 \pm 0,102 (x10^6)$ cél/ml respectivamente ($P > 0,05$) (Tabla VI).

Nitzschia sp.

Tabla VII: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y número de células (10^6 cél/ml) de *Nitzschia sp.* a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.

<i>NITZSCHIA SP.</i>	EXPONENCIAL (DÍA 3)	SEMANAL (DÍA 7)
Densidad (10^3 cél/ml)	Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹)	
Nit. 50	$0,872 \pm 0,072^a$	$0,466 \pm 0,006^a$
Nit. 100	$0,948 \pm 0,031^a$	$0,443 \pm 0,003^b$
Nit. 250	$0,604 \pm 0,023^b$	$0,291 \pm 0,003^c$
	Células contadas (10^6 cél/ml)	
Nit. 50	$0,694 \pm 0,155^b$	$1,301 \pm 0,054^c$
Nit. 100	$1,725 \pm 0,158^a$	$2,222 \pm 0,048^a$
Nit. 250	$1,532 \pm 0,104^a$	$1,921 \pm 0,044^b$

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P < 0,05$).

La mayor tasa de crecimiento exponencial y semanal la tiene *Nitzschia sp.* a 50.000 células/ml. (Nit. 50.) con $0,872 \pm 0,072$ y $0,466 \pm 0,006$ (día⁻¹) respectivamente. Nit. 100. a día 3 con $0,948 \pm 0,031$ (día⁻¹) no tiene diferencias significativas con Nit. 50 ($P > 0,05$) (Tabla VII).

A día 3 y a día 7 de cultivo, el mayor número de células lo alcanza Nit. 100. con $1,725 \pm 0,158 (x10^6)$ y $2,222 \pm 0,048 (x10^6)$ cél/ml respectivamente. Nit. 250. a día 3 con $1,532 \pm 0,104 (x10^6)$ cél/ml, no presenta diferencias significativas con Nit. 100 ($P > 0,05$) (Tabla VII).

Proschkinia sp.

Tabla VIII: Tasa de crecimiento μ (día^{-1}) y número de células (10^6 cél/ml) de *Proschkinia sp.* a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.

<i>PROSCHKINIA SP.</i>	EXPONENCIAL (DÍA 3)	SEMANAL (DÍA 7)
Densidad (10^3 cél/ml)	Tasa de crecimiento μ (día^{-1})	
Pro. 50	$0,835 \pm 0,090^{ab}$	$0,646 \pm 0,011^a$
Pro. 100	$0,740 \pm 0,055^b$	$0,580 \pm 0,0104^b$
Pro. 250	$0,910 \pm 0,040^a$	$0,467 \pm 0,010^c$
	Células contadas (10^6 cél/ml)	
Pro. 50	$0,625 \pm 0,158^b$	$4,611 \pm 0,367^b$
Pro. 100	$0,925 \pm 0,150^b$	$5,806 \pm 0,430^a$
Pro. 250	$3,804 \pm 0,444^a$	$6,572 \pm 0,425^a$

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P < 0,05$).

Pro. 250. presenta la mayor tasa de crecimiento exponencial, con $0,91 \pm 0,040$ (día^{-1}) y también alcanza el mayor número de células, $3,804 \pm 0,444$ ($\times 10^6$) cél/ml, La tasa de crecimiento semanal más alta es para Pro. 50. con $0,646 \pm 0,011$ (día^{-1}) descendiendo esta según aumenta la densidad de inóculo utilizada.

Pro. 100. y Pro. 250. alcanzan la mayor producción en torno a 6×10^6 cél/ml, y de última está Pro. 50. con $4,611 \pm 0,367$ ($\times 10^6$ cél/ml).

4.2.3. Comparación de las tasas de crecimiento y de la producción celular a cada densidad de inóculo

Tabla IX: Tasa de crecimiento exponencial y número de células a día 3 de cultivo para todas las densidades.

Diatomeas	Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹) exponencial		
	Densidad 50 (10 ³ cél/ml)	Densidad 100 (10 ³ cél/ml)	Densidad 250 (10 ³ cél/ml)
Am.	0,983±0,064 ^a	0,94±0,017 ^a	0,610±0,050 ^b
Nav.	0,870±0,060 ^{ab}	0,63±0,044 ^c	0,301±0,130 ^c
Nit.	0,872±0,072 ^{ab}	0,95±0,031 ^a	0,604±0,023 ^b
Pro.	0,834±0,087 ^b	0,74±0,055 ^b	0,910±0,040 ^a
	Células contadas a día 3 de cultivo (Fase Est.)x10 ⁶ cél/ml		
Am.	0,970±0,174 ^a	1,662±0,090 ^a	1,563±0,214 ^b
Nav.	0,684±0,124 ^{ab}	0,663±0,088 ^c	0,650±0,265 ^c
Nit.	0,694±0,154 ^{ab}	1,725±0,160 ^a	1,532±0,104 ^b
Pro.	0,625±0,160 ^b	0,925±0,150 ^b	3,804±0,444 ^a

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; P<0,05).

Tabla X: Tasa de crecimiento semanal y biomasa a día 7 de cultivo para todas las densidades.

Diatomeas	Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹) semanal		
	Densidad 50 (10 ³ cél/ml)	Densidad 100 (10 ³ cél/ml)	Densidad 250 (10 ³ cél/ml)
Am.	0,473±0,010 ^b	0,430±0,004 ^b	0,291±0,011 ^b
Nav.	0,355±0,010 ^c	0,302±0,009 ^c	0,165±0,018 ^c
Nit.	0,466±0,006 ^b	0,443±0,003 ^b	0,291±0,003 ^b
Pro.	0,646±0,011 ^a	0,580±0,010 ^a	0,467±0,009 ^a
	Células contadas a día 7 de cultivo (Fase Est.)x10 ⁶ cél/ml		
Am.	1,400±0,095 ^b	2,025±0,050 ^b	1,925±0,156 ^b
Nav.	0,600±0,043 ^c	0,830±0,054 ^c	0,800±0,102 ^c
Nit.	1,310±0,054 ^b	2,222±0,048 ^b	1,920±0,044 ^b
Pro.	4,610±0,370 ^a	5,800±0,430 ^a	6,572±0,425 ^a

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; P<0,05).

En cuanto a la tasa de crecimiento y producción en fase exponencial se observa que a la densidad de inóculo de 50.000 cél/ml *Amphora* sp. presenta las máximas tasas y producción con $0,983 \pm 0,064$ (día⁻¹) y $0,97 \pm 0,174$ ($\times 10^6$ cél/ml) respectivamente mientras *Proschkinia* sp. muestra las menores tasas y producción con $0,834 \pm 0,087$ (día⁻¹) y $0,625 \pm 0,16$ ($\times 10^6$ cél/ml). Esa tendencia es inversa a la densidad de inóculo de 250.000 cél/ml cuando *Proschkinia* sp. pasa a obtener las mayores tasas de crecimiento y producción con $0,91 \pm 0,04$ (día⁻¹) y $3,804 \pm 0,444$ ($\times 10^6$ cél/ml) respectivamente, y *Navicula incerta* presenta las menores con $0,301 \pm 0,13$ (día⁻¹) y $0,65 \pm 0,265$ ($\times 10^6$ cél/ml) respectivamente (Tabla IX). Tanto a la densidad de 50.000 cél/ml, 100.000 cél/ml y 250.000 cél/ml, *Proschkinia* sp. presenta la mayor tasa de crecimiento semanal con $0,646 \pm 0,011$, $0,580 \pm 0,010$ y $0,467 \pm 0,009$ (día⁻¹) respectivamente y el mayor número de células con $4,610 \pm 0,370$, $5,800 \pm 0,430$ y $6,572 \pm 0,425$ ($\times 10^6$ cél/ml) respectivamente. Mientras que *Navicula incerta* a todas las densidades presenta la menor tasa de producción y de crecimiento semanal con $0,600 \pm 0,043$, $0,830 \pm 0,054$, $0,800 \pm 0,102$ ($\times 10^6$ cél/ml) y $0,355 \pm 0,010$, $0,302 \pm 0,009$, $0,165 \pm 0,018$ (día⁻¹) respectivamente. A todas las densidades *Nitzschia* sp. y *Amphora* sp. muestran una tasa de crecimiento y de producción semanal muy similar, no significativamente diferentes entre ellas ($P < 0,05$) y intermedia entre las de *Proschkinia* sp. y *Navicula incerta* (Tabla X).

En la Figura 34, a la densidad de 100.000 cél/ml se observa la gran diferencia en producción de *Proschkinia* sp. con el resto de las diatomeas a partir del día 4 de cultivo. *Nitzschia* sp. y *Amphora* sp. a esta densidad se comportan a nivel de crecimiento igual, presentando prácticamente la misma curva de crecimiento y *Navicula incerta* alcanza la menor producción.

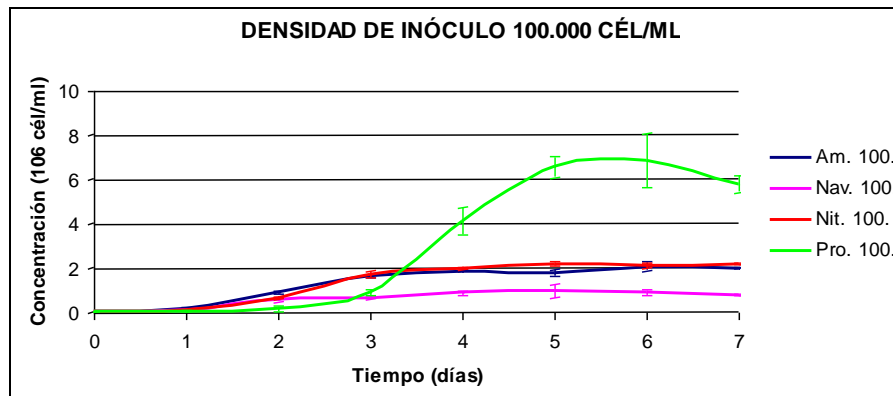


Figura 34: Curvas de crecimiento en tubos de las diatomeas a la densidad de 100.000 cél/ml. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

4.3. Cultivo en placas de Petri.

4.3.1. Características de las curvas de crecimiento en placa a todas las densidades.

Amphora sp.

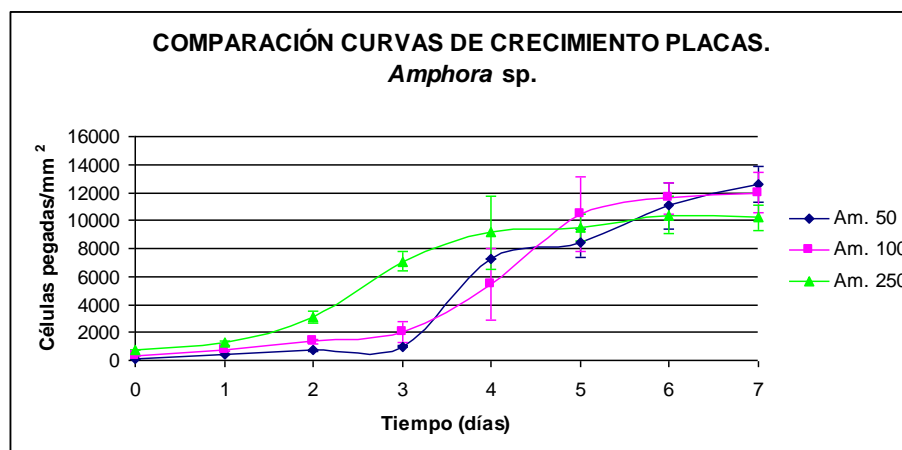


Figura 35: Curvas de crecimiento de *Amphora sp.* en placas a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

Amphora sp. a la densidad de 250.000 células/ml presenta claramente a partir del día 4 la fase estacionaria de cultivo (Figura 35).

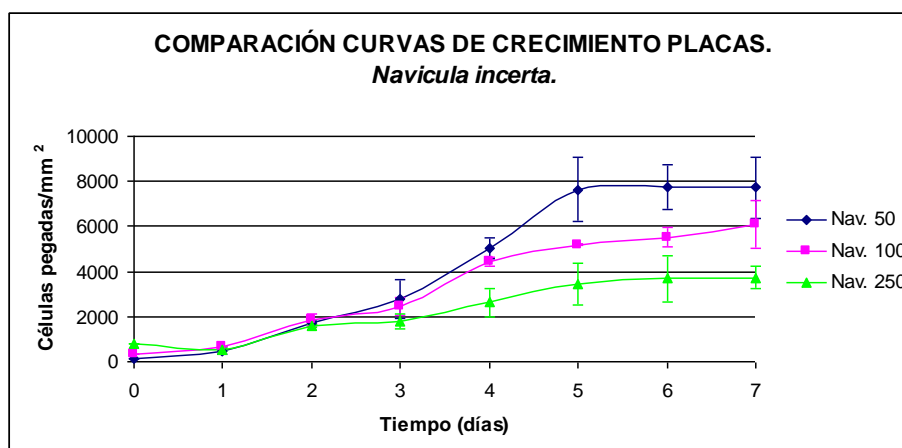
Navicula incerta

Figura 36: Curvas de crecimiento en placas de *Navicula incerta* a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

Conforme aumenta la densidad de inóculo utilizada, el número de células pegadas al sustrato disminuye. *Navicula incerta* a la densidad de 50.000 cél/ml presenta las dos fases de crecimiento, exponencial y estacionaria.

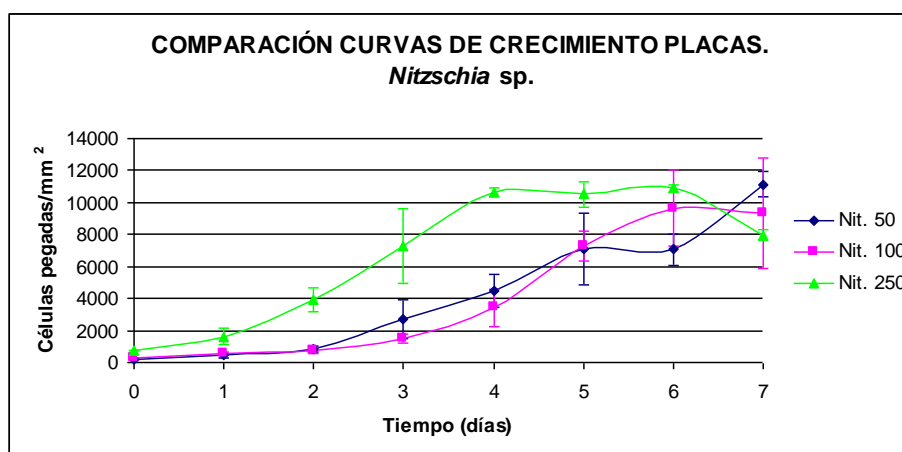
Nitzschia sp.

Figura 37: Curvas de crecimiento de *Nitzschia sp.* en placas a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

Nitzschia sp. a la densidad de 250.000 cél/ml presenta una fase estacionaria marcada, así como una de decaimiento del cultivo (Figura 37).

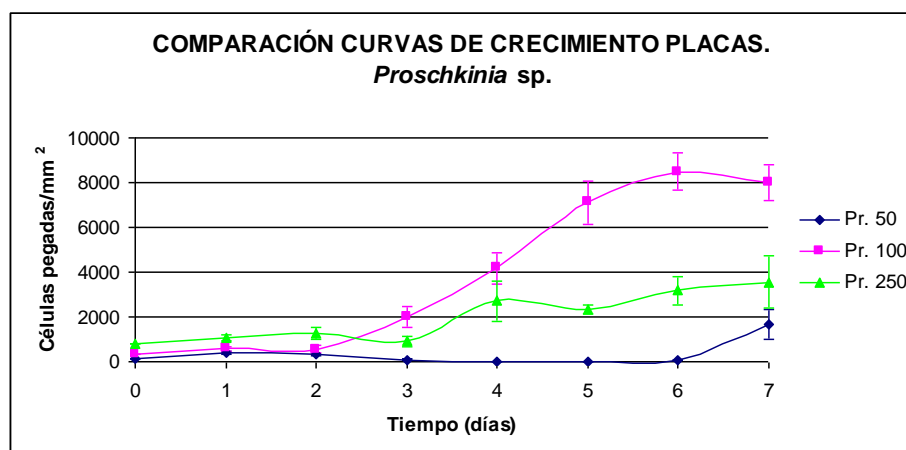
Proschkinia sp.

Figura 38: Curvas de crecimiento de *Proschkinia* sp. en placas a las tres diferentes densidades. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

La densidad de 100.000 cél/ml de *Proschkinia* sp. fue la única que siguió un buen crecimiento en placa (Figura 38).

4.3.2. Efecto de la densidad sobre la tasa de crecimiento exponencial, semanal, y sobre la producción celular.

Amphora sp.

Tabla XI: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² de *Amphora* sp. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.

AMPHORA SP.	EXPONENCIAL (DÍA 3)	SEMANAL (DÍA 7)
Densidad (10 ³ cél/ml)	Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹)	
Am. 50	0,615±0,016	0,625±0,015 ^a
Am. 100	0,612±0,114	0,520±0,020 ^b
Am. 250	0,731±0,0323	0,366±0,013 ^c
	Células pegadas (cél/mm ²)	
Am. 50	994,872±47,001 ^c	12584,600±1300,070
Am. 100	2056,410±752,484 ^b	11974,400±1456,780
Am. 250	7066,670±701,871 ^a	10207,700±900,000

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P < 0,05$).

Las tasas de crecimiento exponencial, para las tres densidades no presentan diferencias significativas entre ellas ($P>0,05$). A día 7, la tasa de crecimiento semanal presenta diferencias significativas ($P<0,05$) teniendo el mayor valor Am. 50. con $0,625 \pm 0,015$ (día⁻¹) (Tabla XI).

El mayor número de células pegadas a día 3 lo tiene Am. 250. con $7066,670 \pm 701,871$ (cél/mm²), mientras al final del cultivo no presentan diferencias significativas entre ellas ($P>0,05$) (Tabla XI).

Navicula incerta

Tabla XII: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² de *Navicula incerta*. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.

<i>NAVICULA INCERTA</i>	EXPONENCIAL (DÍA 3)	SEMANAL (DÍA 7)
Densidad (10^3 células/ml)	Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹)	
Nav. 50	$0,950 \pm 0,095^a$	$0,555 \pm 0,025^a$
Nav. 100	$0,682 \pm 0,052^b$	$0,42 \pm 0,026^b$
Nav. 250	$0,272 \pm 0,0583^c$	$0,222 \pm 0,019^c$
	Células pegadas (cél/mm ²)	
Nav. 50	$2784,62 \pm 840,26$	$7723,08 \pm 1381,9^a$
Nav. 100	$2453,85 \pm 376,923$	$6071,79 \pm 1050,71^a$
Nav. 250	$1794,87 \pm 236,5$	$3738,5 \pm 507,7^b$

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P<0,05$).

Nav. 50., a día 7, presenta la mayor tasa de crecimiento semanal así como el mayor número de células, $0,555 \pm 0,025$ (día⁻¹) y $7723,0800 \pm 1381,900$ (cél/mm²) respectivamente. Nav. 100. con $6071,790 \pm 1050$ (cél/mm²) no tiene diferencias significativas con Nav. 50 ($P>0,05$) (Tabla XII).

El número de células pegadas, al tercer día, para todas las densidades no presentan diferencias significativas ($P>0,05$) (Tabla XII).

Nitzschia sp.

Tabla XIII: Tasa de crecimiento μ (día^{-1}) y células pegadas/ mm^2 de *Nitzschia* sp. a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.

<i>NITZSCHIA</i> SP.	EXPONENCIAL (DÍA 3)	SEMANAL (DÍA 7)
Densidad (10^3 cél/ml)	Tasa de crecimiento μ (día^{-1})	
Nit. 50	0,930 \pm 0,153 ^a	0,610 \pm 0,010 ^a
Nit. 100	0,510 \pm 0,063 ^b	0,480 \pm 0,050 ^b
Nit. 250	0,730 \pm 0,105 ^{ab}	0,331 \pm 0,006 ^c
	Células pegadas/ mm^2	
Nit. 50	2743,600 \pm 1204 ^b	11146,200 \pm 776,923
Nit. 100	1471,800 \pm 271,020 ^b	9343,600 \pm 3488
Nit. 250	7266,700 \pm 2334,930 ^a	7969,230 \pm 323,077

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P<0,05$).

Nit. 50. presenta la mayor tasa de crecimiento exponencial y semanal con 0,930 \pm 0,153 y 0,610 \pm 0,010 (día^{-1}) respectivamente, seguida en ambas fases por Nit. 100. Nit. 50., a día 7, presenta el mismo número de células pegadas que las demás densidades ($P>0,05$). A día 3, lo presenta Nit. 250. con 7266,700 \pm 2334,930 cél / mm^2 (Tabla XIII).

Proschkinia sp.

Tabla XIV: Tasa de crecimiento μ (día⁻¹) y células pegadas/mm² de *Proschkinia sp.* a todas las densidades, al final de la fase exponencial y estacionaria.

<i>PROSCHKINIA SP.</i>	EXPONENCIAL (DÍA 3)	SEMANAL (DÍA 7)
Densidad (10 ³ cél/ml)	Tasa de crecimiento μ (día ⁻¹)	
Pro. 50	-0,300±0,211 ^c	0,33±0,063 ^b
Pro. 100	0,615±0,073 ^a	0,46±0,014 ^a
Pro. 250	0,038±0,090 ^b	0,21±0,053 ^c
	Células pegadas (cél/mm ²)	
Pro. 50	71,800±35,530 ^c	1646,150±676,923 ^c
Pro. 100	2025,640±465,200 ^a	8030,770±798,223 ^a
Pro. 250	902,560±257,600 ^b	3564,850±1192,530 ^b

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; P<0,05).

La mayor tasa de crecimiento y biomasa tanto exponencial como semanal la presenta Pro. 100. con $0,615 \pm 0,073$ (día⁻¹) y $2025,640 \pm 465,200$ (cél/mm²) a día 3 y con $0,46 \pm 0,014$ (día⁻¹) y $8030,770 \pm 798,223$ (cél/mm²) a día 7. En biomasa fijada para ambos días le sigue Pro. 250. y por último Pro. 50., existiendo diferencias significativas entre las tres densidades (P<0,05) (Tabla XIV).

4.3.3. Comparación de las tasas de crecimiento y células adheridas a cada densidad de inóculo.

Tabla XV: Tasa de crecimiento exponencial μ (día^{-1}) y células pegadas/ mm^2 a todas las densidades.

Diatomeas	Tasa de crecimiento exponencial μ (día^{-1})		
	Densidad 50 (10^3 cél/ml)	Densidad 100 (10^3 cél/ml)	Densidad 250 (10^3 cél/ml)
Am.	0,615 \pm 0,016 ^b	0,612 \pm 0,114 ^{ab}	0,731 \pm 0,032 ^a
Nav.	0,612 \pm 0,114 ^b	0,682 \pm 0,052 ^a	0,272 \pm 0,058 ^b
Nit.	0,731 \pm 0,032 ^b	0,510 \pm 0,063 ^b	0,730 \pm 0,105 ^a
Pro.	0,950 \pm 0,095 ^a	0,615 \pm 0,074 ^{ab}	0,040 \pm 0,090 ^c
	Células pegadas (cél/ mm^2) a día 3 (Fase Exp)		
Am.	994,900 \pm 47,001 ^b	2056,410 \pm 752,500 ^{ab}	7066,670 \pm 701,900 ^a
Nav.	2784,620 \pm 840,260 ^a	2453,850 \pm 376,920 ^a	1794,870 \pm 326,500 ^b
Nit.	2743,600 \pm 1204 ^a	1471,800 \pm 271,020 ^b	7266,670 \pm 2335 ^a
Pro.	71,800 \pm 35,530 ^c	2025,640 \pm 465,200 ^{ab}	902,600 \pm 257,600 ^c

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P < 0,05$).

Tabla XVI: Tasa de crecimiento semanal μ (día^{-1}) y células pegadas/ mm^2 a todas las densidades.

Diatomeas	Tasa de crecimiento semanal μ (día^{-1})		
	Densidad 50 (10^3 cél/ml)	Densidad 100 (10^3 cél/ml)	Densidad 250 (10^3 cél/ml)
Am.	0,626 \pm 0,015 ^a	0,520 \pm 0,020 ^a	0,366 \pm 0,013 ^a
Nav.	0,520 \pm 0,018 ^c	0,420 \pm 0,026 ^b	0,222 \pm 0,020 ^b
Nit.	0,366 \pm 0,013 ^d	0,480 \pm 0,050 ^{ab}	0,331 \pm 0,006 ^a
Pro.	0,555 \pm 0,025 ^b	0,460 \pm 0,014 ^{ab}	0,210 \pm 0,053 ^b
	Células pegadas (cél/ mm^2) a día 7 (Fase Est.)		
Am.	12584,600 \pm 1300,0700 ^a	11974,400 \pm 1456,800 ^a	10207,700 \pm 900 ^a
Nav.	7723,0801381,880 ^b	6071,800 \pm 1050,710 ^b	3738,460 \pm 507,700 ^c
Nit.	11146,200 \pm 776,923 ^a	9343,600 \pm 3488 ^{ab}	7969,230 \pm 323,077 ^b
Pro.	1646,150 \pm 676,923 ^c	8030,770 \pm 798,223 ^{ab}	3564,850 \pm 1192,53 ^c

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; $P < 0,05$).

A la densidad de 50.000 cél/ml *Amphora* sp. alcanza la mayor tasa de crecimiento semanal y número de células pegadas, con $0,626 \pm 0,015$ (día⁻¹) y con $12584,6 \pm 1300,07$ (cél/mm²) respectivamente. Nit 50. no presenta diferencias significativas con Am. 50. en número de células pegadas a día 3 y 7 ($P > 0,05$). (Tabla XV; Tabla XVI).

Tanto en la fase exponencial y estacionaria, Am. 250. presenta la mayor tasa de crecimiento y producción (Tabla XV; Tabla XVI). Nit 250. se comporta igual que Am. 250. excepto en producción a día 7, teniendo diferencias significativas entre ellas ($P < 0,05$).

Nav. 100 presenta, a día 3, la mejor tasa de crecimiento y producción con $0,612 \pm 0,114$ (día⁻¹) y $2453,850 \pm 376,920$ (cél/mm²) no existiendo diferencias significativas con Am. 100. y Pr. 100 (Tabla XV). A día 7, Am. 100. presenta la mayor tasa de crecimiento y biomasa semanal teniendo diferencias significativas con Nav. 100. ($P < 0,05$) (Tabla XVI) (Figura 39).

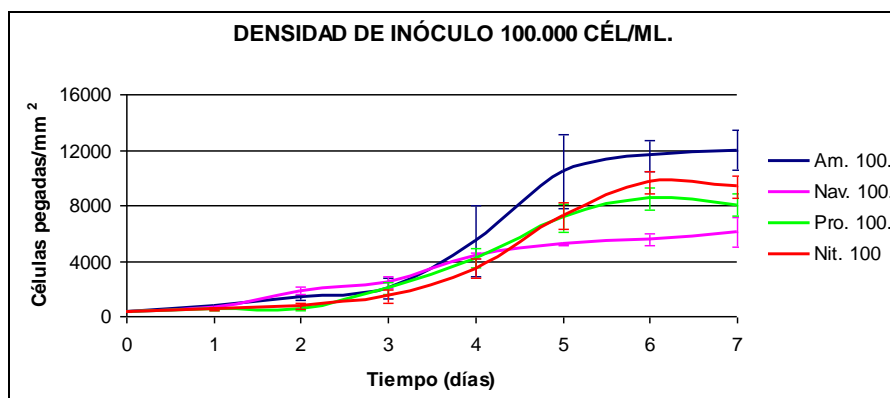


Figura 39: Curvas de crecimiento en placas de las diatomeas a la densidad de 100.000 cél/ml. Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 9).

4.4. Composición bioquímica básica a la densidad de inóculo de 100.000 cél/ml.

Tabla XVII: Análisis de la composición bioquímica proximal (% peso seco) de las cuatro diatomeas inoculadas a la densidad de 100.000 cél/ml y recogidas en la fase exponencial (Exp.) y en la fase estacionaria (Est.). (n=9).

DIATOMEAS	FASE	LÍPIDOS (%) (MEDIA±D.S)	PROTEÍNAS (%) (MEDIA±D.S)	CENIZAS (%) (MEDIA±D.S)	CARBOHIDRATOS (%) (MEDIA±D.S)
Am.	Exp.	9,74±1,7 ^a	19,704±0,95 ^a	57,1±3,4	13,5±5,01 ^{cd}
	Est.	7,31±0,68 ^{cd}	13,07±0,71 ^{bc}	60,5±0,9	19,15±1,77 ^{bc}
Nav.	Exp.	6,11±0,17 ^{de}	13±0,6 ^{bc}	53,7±3,8	27,23±3,77 ^a
	Est.	8,88±0,63 ^{ab}	13±1,07 ^{bc}	58±0,43	20,20±0,7 ^{abc}
Nit.	Exp.	4,9±0,55 ^{ef}	14,5±0,4 ^b	62±1,5	18,7±1,7 ^{bc}
	Est.	3,11±0,24 ^g	14,2±1,22 ^b	61±0,0	21,8±1,21 ^{ab}
Pro.	Exp.	7,82±0,72 ^{bc}	20,72±1,4 ^a	61,4±8,02	10,05±6,7 ^d
	Est.	4±0,56 ^{fg}	11,6±1,93 ^c	60,8±2,8	23,73±5,03 ^{ab}

Diferentes superíndices en la misma columna indican que existen diferencias significativas a un 95% de confianza (ANOVA Test Turkey; P<0,05).

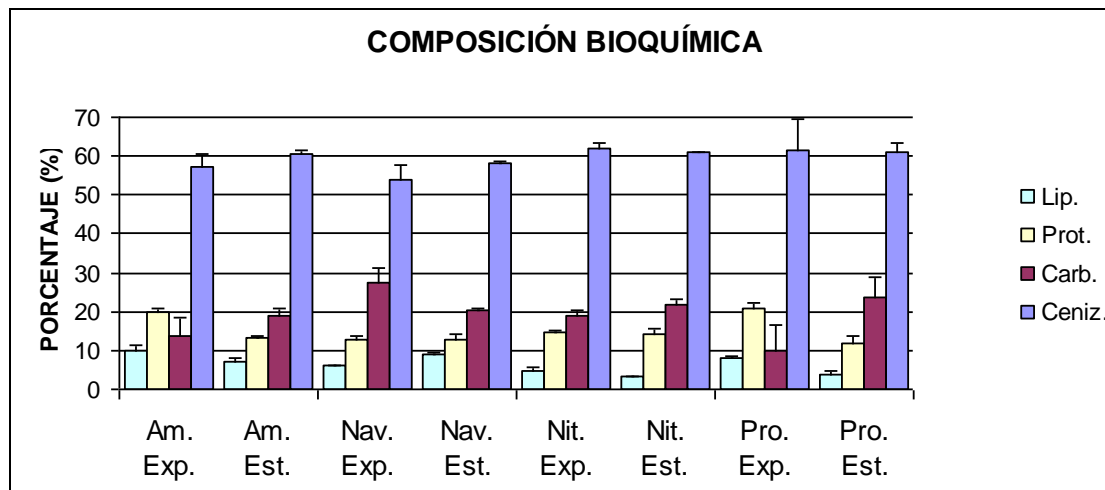


Figura 40: Composición bioquímica de las cuatro diatomeas en la fase exponencial y estacionaria.

El constituyente principal mayoritario son los carbohidratos entre un 19%- 27% PS, seguidos de las proteínas. Esto no se observa en las fases exponenciales de *Amphora* sp. y *Proschkinia* sp. donde las proteínas (20% PS) son mayores que los carbohidratos, 13% y 10% respectivamente. Los lípidos serían el constituyente en menor cantidad para todas las diatomeas, representando menos de un 10% PS. Las cenizas están en torno a un 60% PS., para todas las diatomeas y fases.

Navicula incerta se diferencia, con respecto a las demás diatomeas, por su disminución de la cantidad de carbohidratos y aumento de la cantidad de lípidos en fase estacionaria.

4.4.1. Lípidos totales.

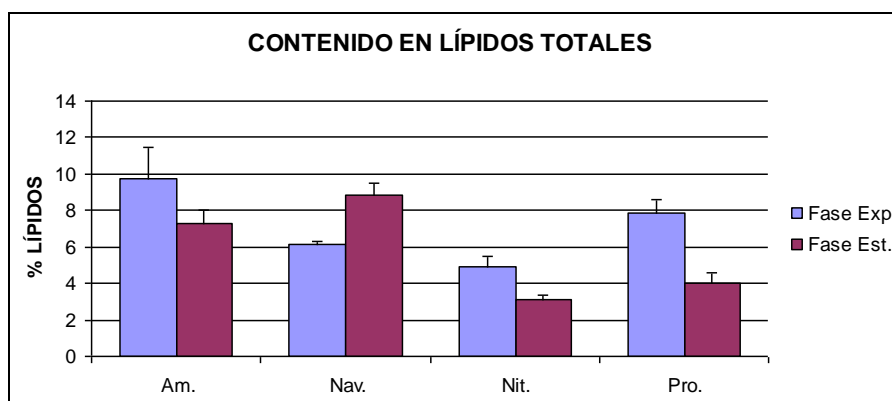


Figura 41: Comparación entre el porcentaje de lípidos totales de la fase exponencial y estacionaria de las cuatro diatomeas.

Para todas las diatomeas el contenido en lípidos de la fase exponencial es mayor que en la fase estacionaria, excepto para Nav. 100. (Figura 41).

Am. 100., en fase exponencial, alcanza el valor más alto de lípidos de todas las diatomeas, $9,74 \pm 1,7$ (% PS) y no presenta diferencias significativas ($P > 0,05$) con Nav. 100. en fase estacionaria, con $8,88 \pm 0,63$ (% PS) (Tabla XVII).

4.4.2. Proteínas.

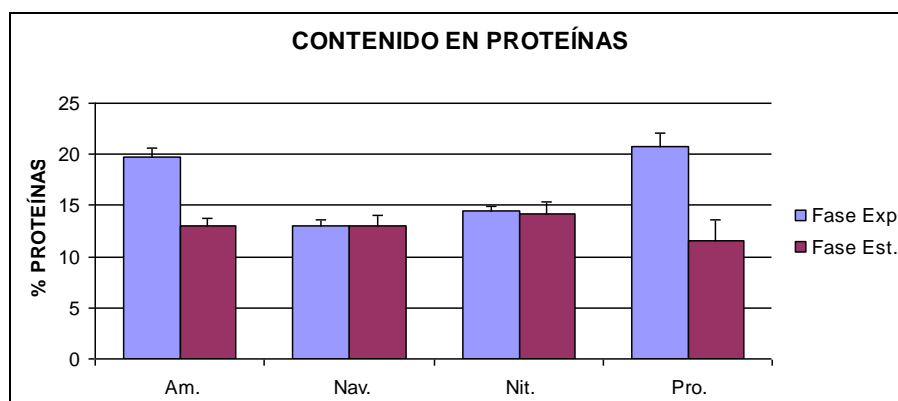


Figura 42: Comparación entre el porcentaje de proteínas de la fase exponencial y estacionaria de las cuatro diatomeas.

El contenido en proteínas sigue una tendencia similar al de lípidos, decae en la fase estacionaria (Figura 42). El valor más alto de proteínas, en la fase exponencial, lo logran Am. 100. y Pro. 100., con $19,704 \pm 0,95$ y $20,72 \pm 1,4$ (% PS) respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ambas ($P > 0,05$). (Tabla XVII). Todos los géneros, menos Nit. 100. y Nav. 100., presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la fase exponencial y la estacionaria.

4.4.3. Cenizas.

Al 99% de confianza no existen diferencias significativas entre las cenizas de las diatomeas (Figura 43), ni entre las fases de crecimiento (Tabla XVII).

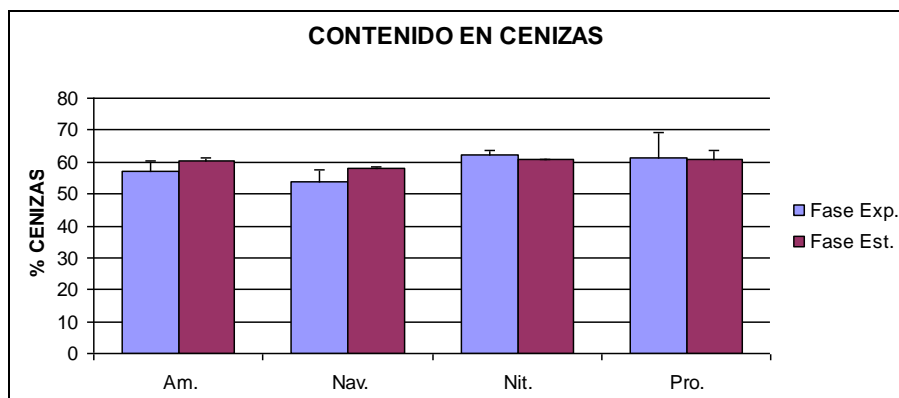


Figura 43: Comparación entre el porcentaje de cenizas de la fase exponencial y estacionaria de las cuatro diatomeas.

4.4.4. Carbohidratos.

El contenido en carbohidratos muestra una tendencia inversa al contenido de lípidos, aumentando en la fase estacionaria (Figura 44). Pr. 100. con $23,73 \pm 5,03$ (% PS) en fase estacionaria, presenta el mayor incremento de todas las diatomeas. La excepción es Nav. 100. que, en la fase exponencial, presenta la mayor cantidad de carbohidratos con $27,23 \pm 3,77$ (% PS) (Tabla XVII).

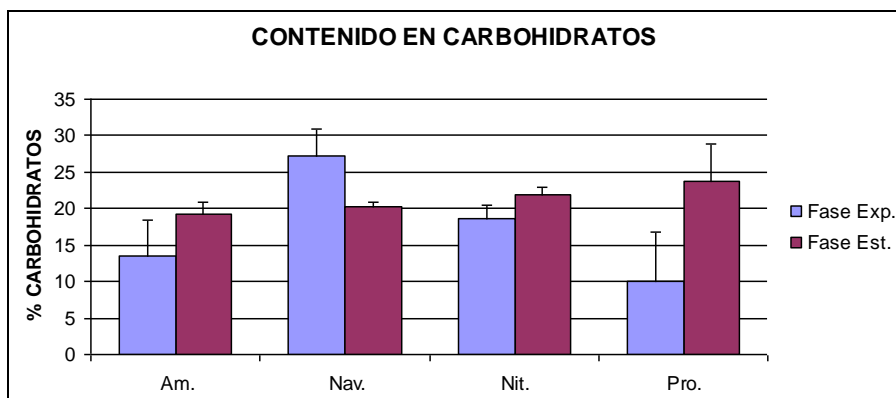


Figura 44: Comparación entre el porcentaje de carbohidratos de la fase exponencial y estacionaria de las cuatro diatomeas.

4.5. Composición de los Ácidos grasos.

Los niveles de ácidos grasos saturados (SFA) no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las cuatro diatomeas ni tampoco entre las fases de crecimiento estudiadas, exponencial y estacionaria. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) representan una fracción importante del total de ácidos grasos (TFA) (23,25% a 38,62% de TFA) excepto en el caso de *Navicula incerta* y *Proschkinia* sp. durante la fase estacionaria donde los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) son los más altos y los n-3 PUFA son significativamente más bajos ($P < 0.05$). La proporción de PUFAs varía dependiendo de la diatomea y entre las fases de crecimiento, observando un descenso en PUFA y n-3 PUFA durante la fase estacionaria de crecimiento (bajo limitación de nutrientes) excepto para *Amphora* sp. Además *Amphora* sp. contiene altos niveles de 18:4n-3 a excepción del resto de las diatomeas. Todas las diatomeas analizadas fueron más ricas en n-3 PUFA que en n-6 PUFA y tienen cantidades significativas de 20:5n-3, ácido eicosapentaenoico (EPA) (entre 12,69% y 17,68% de TFA). Pro. 100., en fase logarítmica, tiene el valor más alto de 20:4n-6 (ARA), mientras Nav. 100. tiene el contenido más bajo ($P < 0.05$) de ese ácido como de n-6 PUFA. *Proschkinia* sp., *Nitzschia* sp. y *Navicula incerta* muestran un decrecimiento en EPA y ARA, entre la fase logarítmica y la fase estacionaria, mientras *Amphora* sp. muestra un incremento.

Niveles de 22:6n-3, ácido docosahexaenoico (DHA) (0,19% - 1,90% TFA) aumentan entre la fase logarítmica y estacionaria y fueron generalmente muestreados en baja cantidad con un bajo valor de significancia ($P < 0.05$) para *Navicula incerta* (Tabla XVIII).

Tabla XIII: Composición de ácidos grasos (%TFA) de *Amphora* sp., *Navicula incerta*, *Nitzschia* sp. y *Proschkinia* sp. durante la fase logarítmica y estacionaria.

FAMES	Am.(Exp.)	Am.(Sta.)	Nav.(Exp.)	Nav.(Est.)	Nit.(Exp.)	Nit.(Est.)	Pro.(Exp.)	Pro.(Est.)
12	0.75±0.42	1.35±0.76	0.21±0.15	1.47±0.61	1.41±0.53	2.42±1.14	0.53±0.38	0.16±0.03
*14	10.97 ^a ±1.93	8.71 ^b ±0.37	5.12 ^c ±0.56	5.68 ^c ±1.10	9.49 ^{ab} ±0.54	8.11 ^b ±1.40	3.10 ^d ±0.48	3.31 ^d ±0.2
15	0.64±0.07	0.52±0.06	0.37±0.07	0.33±0.01	2.75±1.79	2.71±0.08	2.65±1.77	1.29±0.13
16 (Palmitico)	15.31 ^b ±17.20	19.59 ^{ab} ±5.08	20.80 ^{ab} ±2.51	17.48 ^{ab} ±2.69	17.41 ^{ab} ±0.43	15.13 ^{ab} ±1.53	20.25 ^{ab} ±1.64	22.61 ^a ±2.55
17	3.01±0.53	2.71±0.16	3.11±0.87	2.46±0.60	2.37±0.29	2.06±1.20	2.13±1.70	2.20±0.04
*18 (Esteárico)	1.11 ^b ±0.34	1.32 ^b ±0.67	0.90 ^b ±0.20	1.41 ^{ab} ±0.24	1.21 ^b ±1.06	2.23 ^a ±0.61	0.79 ^b ±0.11	1.02 ^b ±0.23
20	0.27±0.05	0.22±0.02	0.05±0.00	0.24±0.33	0.11±0.01	0.18±0.05	0.09±0.01	0.45±0.71
*Σ Ácidos grasos saturados	32.05±15.48	34.41±5.88	29.73±2.28	29.06±2.68	34.29±0.50	32.84±3.68	29.28±1.95	31.05±1.60
14:1n7	0.39±0.32	0.38±0.16	0.46±0.06	0.27±0.13	0.71±0.19	0.96±0.12	0.58±0.18	0.47±0.04
14:1n5	0.06±0.02	0.05±0.00	0.02±0.00	0.03±0.01	0.42±0.27	1.06±0.54	0.27±0.23	0.09±0.01
15:1n5	0.03±0.00	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.24±0.09	0.23±0.05	0.18±0.04	0.20±0.04
*16:1n7(Palmitoleico)	25.57 ^a ±4.18	21.56 ^d ±0.77	38.72 ^a ±3.20	38.07 ^a ±2.28	19.62 ^d ±1.01	18.33 ^d ±1.39	25.41 ^c ±0.43	31.92 ^a ±3.81
16:1n5	0.26±0.01	0.23±0.01	1.36±2.25	1.20±2.00	0.91±0.40	1.20±0.05	2.01±2.22	2.72±0.07
*18:1n9 (Oleico)	3.30 ^a ±0.13	3.20 ^a ±0.34	0.86 ^c ±0.32	1.72 ^c ±0.56	3.11 ^a ±0.37	3.82 ^b ±0.81	1.16 ^{bc} ±0.21	1.13 ^{bc} ±0.27
18:1n7	0.58±0.04	0.54±0.04	2.37±0.31	2.80±0.50	1.05±0.07	2.03±0.18	1.33±0.05	2.44±0.30
18:1n5	0.07±0.01	0.07±0.01	0.56±0.03	0.71±0.03	0.08±0.01	0.12±0.01	0.07±0.00	0.06±0.01
20:1n9	0.00±0.00	0.01±0.00	0.19±0.03	0.25±0.06	0.12±0.05	0.40±0.47	0.08±0.03	0.14±0.07
20:1n7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.41±0.24	0.00±0.00	0.04±0.04
20:1n5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.03±0.05	0.00±0.00	0.15±0.11	0.00±0.00
22:1n11	0.08±0.07	0.01±0.01	0.50±0.44	0.61±0.53	0.14±0.05	0.21±0.02	0.20±0.20	0.09±0.04
22:1n9	0.33±0.03	0.34±0.05	0.28±0.31	0.45±0.23	0.21±0.12	0.30±0.20	0.23±0.16	0.12±0.01
*Σ Ácidos grasos monoinsaturados	30.69 ^c ±4.01	26.40 ^d ±0.51	45.34 ^a ±0.25	46.15 ^a ±1.26	26.49 ^d ±1.11	28.69 ^{cd} ±0.85	31.46 ^c ±1.33	39.43 ^b ±3.69
16:2n6	2.03±0.19	1.75±0.03	1.18±0.14	1.00±0.08	1.78±0.09	1.60±0.33	0.70±0.38	0.67±0.09
16:2n4	0.10±0.00	0.08±0.02	0.05±0.01	0.07±0.01	0.49±0.54	0.28±0.11	1.47±1.96	0.16±0.08
16:3n4	0.00±0.00	0.10±0.06	0.07±0.03	0.03±0.01	0.06±0.05	0.03±0.00	0.99±1.18	0.09±0.05
16:3n3	0.07±0.08	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.00	0.78±0.17	1.57±0.26	0.73±0.36	0.71±0.03
16:3n1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.15±0.09	0.00±0.00	0.12±0.08	0.00±0.00
16:4n3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.08±0.05	0.00±0.00	1.07±0.76	0.00±0.00
16:4n1	0.03±0.01	0.03±0.02	0.15±0.05	0.14±0.05	2.19±0.82	1.92±1.07	1.33±0.94	0.95±0.47
18:2n9	0.29±0.09	0.47±0.20	0.02±0.01	0.02±0.01	0.05±0.01	0.03±0.02	0.05±0.00	0.02±0.02
*18:2n6 (Linoleico)	3.90 ^{ab} ±0.21	3.86 ^{ab} ±1.04	1.01 ^c ±0.29	2.92 ^b ±1.09	4.13 ^{ab} ±1.23	6.43 ^a ±1.95	1.14 ^c ±0.23	0.51 ^d ±0.06
18:2n4	0.00±0.00	0.01±0.01	0.31±0.05	0.27±0.05	0.09±0.05	0.14±0.05	0.23±0.11	0.41±0.51
18:3n6	1.74±0.58	1.49±0.17	0.50±0.18	0.39±0.19	0.49±0.10	0.44±0.09	1.42±0.09	0.47±0.05
18:3n4	0.00±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.03	0.00±0.00	0.07±0.01	0.05±0.03
*18:3n3 (Linolénico)	0.28 ^b ±0.07	0.34 ^b ±0.11	0.24 ^b ±0.10	0.37 ^b ±0.15	1.66 ^b ±0.13	1.58 ^b ±0.25	0.19 ^{bc} ±0.10	0.11 ^c ±0.06
18:3n1	0.06±0.01	0.08±0.02	0.33±0.03	0.30±0.03	0.10±0.01	0.15±0.08	0.35±0.09	0.29±0.01
18:4n3	6.31±2.68	5.48±0.63	0.52±0.00	0.48±0.08	1.22±0.21	0.78±0.20	0.05±0.01	0.08±0.03
18:4n1	0.01±0.01	0.03±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	0.07±0.03	0.06±0.04	0.04±0.02	0.02±0.01
20:2n9	0.00±0.00	0.08±0.05	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.02	0.14±0.11	0.03±0.02	0.09±0.07
20:2n6	0.00±0.00	0.04±0.02	0.01±0.01	0.02±0.00	0.04±0.00	0.09±0.07	0.21±0.15	0.15±0.00
20:3n9	0.14±0.04	0.13±0.01	0.11±0.03	0.07±0.02	0.07±0.02	0.08±0.05	0.05±0.06	1.09±1.86
20:3n6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.06	0.09±0.05	0.77±0.02	0.77±0.92
20:3n3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.05±0.03	0.08±0.10	0.30±0.32	0.40±0.28	0.00±0.00
*20:4n6 (ARA)	4.15 ^b ±1.31	4.83 ^b ±1.29	1.96 ^c ±0.34	1.76 ^c ±0.86	5.71 ^{ab} ±0.86	4.24 ^b ±1.12	10.16 ^a ±1.29	6.04 ^{ab} ±0.46
20:4n3	0.22±0.08	0.23±0.05	0.24±0.02	0.20±0.01	0.22±0.09	0.20±0.17	0.10±0.02	0.03±0.02
*20:5n3 (EPA)	15.44 ^{ab} ±5.89	17.68 ^a ±4.46	15.97 ^{ab} ±1.70	15.61 ^{ab} ±1.32	16.55 ^{ab} ±0.81	14.11 ^{ab} ±1.78	15.20 ^{ab} ±2.11	12.69 ^b ±1.41
22:4n6	0.12±0.03	0.13±0.02	0.00±0.00	0.02±0.01	0.09±0.02	0.73±1.06	0.05±0.00	0.21±0.15
22:5n6	0.06±0.02	0.06±0.00	0.19±0.11	0.14±0.07	0.14±0.07	0.33±0.33	0.21±0.00	0.82±1.07
22:5n3	0.36±0.05	0.55±0.37	0.15±0.09	0.06±0.02	0.74±0.15	0.74±0.12	1.38±0.13	1.11±0.04
*22:6n3 (DHA)	0.86a±0.25	0.89a±0.05	0.19b±0.15	0.29b±0.26	1.69a±0.53	1.90a±1.26	1.25a±0.03	1.61a±0.33
*Σ Ácidos grasos poliinsaturados	36.16 ^{ab} ±11.56	38.29 ^a ±5.72	23.25 ^c ±2.27	24.23 ^c ±1.45	38.62 ^a ±1.97	37.64 ^a ±3.52	38.19 ^a ±0.72	29.04 ^{bc} ±5.29
Total FA	98.91±0.10	99.09±0.08	99.14±0.14	99.43±0.09	99.40±0.36	98.17±0.11	98.94±0.11	99.52±0.01
*n-3 PUFA	23.54 ^{ab} ±9.09	25.19 ^a ±4.76	17.33 ^c ±2.06	17.05 ^c ±1.31	22.96 ^{ab} ±2.13	21.02 ^{abc} ±1.62	19.63 ^{bc} ±1.61	16.33 ^c ±1.24
*n-6 PUFA	11.99 ^b ±2.35	12.13 ^b ±0.90	4.86 ^d ±0.37	6.24 ^d ±0.24	12.42 ^{ab} ±1.68	13.86 ^{ab} ±1.92	14.57 ^a ±1.48	9.64 ^c ±1.58
*n-3/n-6	1.93 ^c ±0.38	2.07 ^c ±0.33	3.58 ^a ±0.46	2.74 ^b ±0.24	1.89 ^c ±0.46	1.54 ^{cd} ±0.28	1.35 ^d ±0.03	0.71 ^{cd} ±0.19
n-3 HUFA	16.89±6.27	19.34±4.19	16.55±1.96	16.18±1.22	19.28±1.64	17.08±1.52	18.13±1.91	15.43±1.18
*EPA/DHA	17.65 ^b ±1.76	19.81 ^b ±4.94	113.88 ^a ±56.52	92.37 ^a ±67.14	10.27 ^b ±2.36	9.66 ^b ±5.13	12.16 ^b ±1.96	8.20 ^b ±2.49

Diferentes superíndices a través de una fila indican que la media difiere significativamente al 95% de confianza. (ANOVA turkey's test; $P < 0.05$). Los ácidos grasos marcados con un * fueron comparados estadísticamente.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

5.1. Tamaño celular de las diatomeas.

Las cuatro diatomeas investigadas, en este estudio, son adecuadas, en términos de rango de tamaño, para su uso como fuente de alimentación para las post-larvas de *H. tuberculata coccinea*. Según Brown *et al.* (1997) las microalgas usadas para la nutrición larvaria, usualmente, están en el nanoplancton en un rango de tamaño entre 2-20 μm . El tamaño que pueden alcanzar las microalgas depende de diferentes factores, los nutritivos y los físico-químicos: luz, temperatura, salinidad, pH, CO_2 y fotoperiodo.

Navicula incerta.

La diatomea de *Navicula incerta* utilizada en nuestro trabajo, mide $18 \pm 0,95 \mu\text{m}$ de largo y de ancho $4,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Según el experimento llevado a cabo por Simental-Trinidad *et al.* (2001), *N. incerta* aislada en la Bahía Todos Santos de México mide 12,82 μm de longitud. Correa-Reyes *et al.* (2001) encontraron un rango de 14,5 μm de largo y 5,5 μm de ancho para *N. incerta* aislada también en Baja California Sur, México.

Proschkinia sp.

La diatomea *Proschkinia sp.* por su morfología externa se asemeja a una *Navicula*, siendo su tamaño más pequeño, $8,2 \pm 0,42 \mu\text{m}$ de largo y $3 \pm 0,12 \mu\text{m}$ de ancho. De las cuatro diatomeas estudiadas, *Proschkinia sp.* presenta el tamaño más pequeño de todas, y forma una película en el sustrato adecuada para la alimentación de post-larvas de abalón.

Amphora sp.

Amphora sp. mide de largo $10,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ y de ancho $3,67 \pm 0,12 \mu\text{m}$ lo que concuerda con De la Peña. (2007), que utilizó para su investigación esta misma especie con un rango de tamaño entre 10,8- 12,87 μm en longitud y 2,97- 3,44 μm de ancho. Según Norman-Boudreau *et al.* (1986) es un tamaño favorable para las etapas tempranas de los juveniles de abalón.

Amphora sp. se caracteriza según lo descrito por De la Peña. (2007) por una lisa valva arqueada por el lado dorsal y con un margen ventral débilmente convexo. Además pertenece a la familia Naviculacea, la cual es identificada como aceptablemente buena para el abalón por Uki y Kikuchi. (1979), Grant. (1981) y Ohgai *et al.* (1991). Este género tiene una fortaleza adhesiva muy fuerte al sustrato según la clasificación descrita por Kawamura y Hirano (1992) y es capaz de formar comunidades fijadas en él. Estas dos características son consideradas beneficiosas para las larvas del abalón por Kawamura y Kikuchi (1992), Kawamura (1994) y Kawamura *et al.* (1998b).

Nitzschia sp.

Varias especies de *Nitzschia* sp. presentan una pared celular frágil y en algunos casos fuerte adhesión a sustratos, haciendo que sea susceptible para ser ramoneada por las post-larvas de abalón (Sequeiros-Beltrones, 1999). En la bibliografía, según la especie de *Nitzschia*, se encuentra un rango de tamaños muy amplio, Renaud *et al.* (1999) trabajaron con una *Nitzschia* sp. que medía 7 μm de largo y 3,9 μm de ancho y este género junto con *Navicula* sp. pueden incluso llegar a medir más de 20 μm (Brown *et al.*, 1997). En este caso la diatomea *Nitzschia* sp. utilizada en la investigación mide $18,23 \pm 0,55 \mu\text{m}$ de longitud y $3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de ancho.

5.2. Experimento en tubos de ensayo.

En varios estudios, el régimen de luz usado para el cultivo de diatomeas bentónicas está entre 20 y 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Thompson *et al.*, 1990; Cota- Sánchez, 1998; Roberts *et al.*, 2000). En este estudio, la intensidad de luz utilizada para las microalgas es de $62 \pm 8 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que equivalen a $5403 \pm 649 \text{ lux}$, o a $16 \pm 2 \text{ W m}^{-2}$ y el fotoperiodo constante, 24:00 horas de luz, condiciones frecuentemente utilizadas para cultivos de microalgas en acuicultura.

Según (Sicko-Goad y Andresen, 1991) algunas especies de algas exhiben preferencias en la duración de la intensidad luminosa, el fotoperiodo puede estar relacionado con la temperatura, y algunas especies con un amplio rango pueden no tener un fotoperiodo óptimo. En esta investigación, la diatomea *Amphora* sp., en comparación con las otras diatomeas, es la que muestra la mejor adaptación, en cuanto a producción y tasa de crecimiento, al fotoperiodo y la temperatura a los cuales se desarrolló el experimento.

Efecto de la aeración en los cultivos

Correa y Reyes *et al.* (2001) observaron que la mayor tasa de crecimiento en siete diatomeas, cinco especies de *Nitzschia*, una *Amphiphora* y *Navicula incerta* era a día 2 de cultivo, durante los 10 días que duró el cultivo a $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con luz blanca. En el presente estudio, *Navicula incerta*, a día 3, a la densidad de 50.000 cél/ml tiene la mayor tasa de crecimiento exponencial con $0,87 \pm 0,06 \text{ día}^{-1}$ siendo superior, $1,62 \text{ día}^{-1}$, la encontrada a día 2 por Correa y Reyes *et al.* 2001. También, la densidad celular mayor para *Navicula incerta* a día 7 de cultivo la obtienen Nav. 100. y Nav. 250. con $0,83 \pm 0,054 \times 10^6 \text{ cél /ml}$ y $0,8 \pm 0,102 \times 10^6 \text{ cél/ml}$ respectivamente, encontrando Correa-Reyes *et al.* (2001) una mayor densidad, $1,399 \times 10^6 \text{ cél/ml}$, a día 6

de cultivo. Los cultivos realizados por Correa-Reyes *et al.* (2001) fueron aireados durante 10 días y se observa que a día 8 y 10 de cultivo la densidad celular no se estabiliza entrando en fase estacionaria, alcanzando $2,165 \times 10^6$ cél/ml y $3,064 \times 10^6$ cél/ml respectivamente.

También, en el presente estudio, *Nitzschia* sp. obtiene su mejor tasa de crecimiento en la fase exponencial (día 3) a la densidad de 100.000 cél/ml, siendo de $0,95 \pm 0,031$ día⁻¹. seguida de Nit. 50 con $0,872 \pm 0,072$ día⁻¹, estos datos entrarían dentro del rango 0,80- 0,86 día⁻¹ que encontraron Correa y Reyes *et al.* 2001, para la especie *Nitzschia laevis*. Estas diferencias se deben a que Correa y Reyes *et al.* (2001), cultivaron las diatomeas a menos temperatura que este estudio, a 22 ± 1 °C y con aire, lo que promovería una mayor tasa de crecimiento en los cultivos.

En el presente experimento, los cultivos sin airear también lograron un crecimiento muy importante para *Proschkinia* sp. Esta diatomea muestra la mayor producción a día 7, alcanzando $6,572 \pm 0,425 \times 10^6$ cél/ml a 250.000 cél/ml de inóculo, pudiéndola comparar perfectamente con especies planctónicas de diatomeas que alcanzan una mayor densidad.

Efecto de la temperatura de cultivo

La densidad celular más alta de *Navicula incerta* se da a 20 °C de temperatura del agua, seguida de 15 °C y 25 °C según lo encontrado por Affan *et al.* (2007). El crecimiento de *Navicula incerta* se ve disminuido a temperaturas superiores de 25 °C lo que explica el bajo crecimiento encontrado en esta diatomea, a todas las densidades, 600.000 cél/ml para Nav. 50. y 800.000 cél/ml para Nav. 100. y Nav. 250., no alcanzando el 1×10^6 cél/ml hallado por Affan *et al.* (2007). El patrón de crecimiento de esta especie sugiere que es euritermal, pero una temperatura moderada puede crear las

condiciones más favorables para su crecimiento (Affan *et al.*, 2007). A 25 °C, *Navicula* sp. con un inóculo de 100.000 cél/ml, con aire y CO₂ obtienen una producción muy alta al final de la fase exponencial, $1,79 \pm 0,17 \times 10^6$ cél/ml (Renaud *et al.*, 1994).

Renaud *et al.* (1995) estudiaron el efecto de la temperatura (10- 35 °C) sobre el crecimiento, para dos especies del género *Nitzschia*, (*N. closterium* y *N.paleacea*). Para *N. closterium* hallaron que a 20 y 25 °C obtiene la mayor tasa de crecimiento y mayor biomasa que al resto de temperaturas, con 0,38 día⁻¹ y con $3,23 \times 10^6$ cél/ml respectivamente para ambas temperaturas (no existiendo diferencias significativas). Para *N. paleacea* la máxima tasa de crecimiento ocurre a 15 °C con 0,38 día⁻¹ mientras la producción, tanto a la temperatura de 15, 20 y 25 °C, no presenta diferencias significativas entre ellas, en torno a 3×10^6 cél/ml. En ambas diatomeas, a temperatura de 30 °C la tasa de crecimiento disminuye y la producción también, lo que explicaría que *Nitzschia* sp. en este estudio no logre alcanzar valores tan altos de producción (máxima a densidad de 100.000 cél/ml con $2,222 \pm 0,048 \times 10^6$ cél/ml) para ninguna de las densidades probadas, pudiendo presentar un mejor crecimiento a temperaturas más bajas como observaron Renaud *et al.* (1995).

Efecto de la intensidad de luz en el cultivo

Simental-Trinidad *et al.* (2001) obtuvieron una producción semanal para *Navicula incerta* en torno a $0,5 \times 10^6$ cél/ml, obteniendo en este caso, a día 7, una mayor producción a todas las densidades, siendo la mayor $0,8 \times 10^6$ cél/ml para Nav. 100. y para Nav. 250. La intensidad de luz utilizada por Simental-Trinidad *et al* (2001) es más fuerte con, $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, siendo más del doble que la utilizada en este caso, $62 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, pudiendo provocar saturación y un efecto sobre la fotosíntesis .

5.3. Experimento en placas.

Amphora sp. a todas las densidades de inóculo 50.000, 100.000 y 250.000 cél/ml alcanza la mayor densidad de células fijadas a día 7 de cultivo con $12584,6 \pm 1300,07$, $11974,4 \pm 1456,8$ y $10207,7 \pm 900$ cél/mm² respectivamente. Lo que implica su gran capacidad de fijación a un sustrato descrita por Kawamura y Hirano (1992), en su clasificación de las formas de crecimiento catalogaron a este género con una capacidad muy fuerte de agarre.

La densidad de inóculo influencia el número de células adheridas para *Navicula incerta* y *Proschkinia* sp., siendo la densidad óptima la de 100.000 cél/mm², mientras no tiene influencia para *Amphora* sp. y *Nitzschia* sp. En *Navicula incerta* conforme aumenta la densidad de inóculo el número de células pegadas al sustrato disminuye y en *Proschkinia* sp. a baja densidad (50.000 cél/ml) no se fijan las células al sustrato y a alta densidad (250.000 cél/ml) se fijan poco con una evolución lenta.

La bibliografía, relativa al crecimiento de diatomea sobre sustratos, se refiere a datos de densidad inicial fijada a un sustrato en los experimentos de alimentación de las post-larvas del abalón, en los que se deja crecer una película inicial de diatomeas, en placas de Petri o en placas de fijación en los tanques de cultivo, que sea idónea para que las post-larvas ramoneen.

Searcy-Bernal *et al.* (2003) a iluminación constante la densidad total de diatomeas (*Navicula incerta*) en el fondo de los contenedores de experimentación incrementa rápidamente durante la primera semana (7 días de cultivo), alcanzando 3.570 cél/mm² a 75 μ E y 1.890 cél/mm² a 6 μ E. En el presente experimento, a 62 ± 8 μ E/m² s, *Navicula incerta* alcanzó un mayor crecimiento a día 7 de cultivo, para los inóculos de 50.000 y 100.000 células/ml, teniendo respectivamente $7723,08 \pm 1381,9$ y $6071,79 \pm 1050,71$ cél/mm², no existiendo diferencias significativas entre ellas. Estas

diferencias se deben a que una intensidad de luz alta puede provocar un descenso en la capacidad de adherirse al sustrato de la diatomea, incluso puede ocasionar la muerte celular del cultivo.

5.4. Composición bioquímica.

La calidad nutricional de las microalgas y sus contenidos en, proteínas, lípidos y carbohidratos, depende de las condiciones de cultivo de las diatomeas así como de la especie de microalga cultivada. Escoger especies con buena calidad nutricional y que esta sea potencialmente incrementada modificando las condiciones ambientales, ofrece una gran posibilidad de mejorar la producción de las microalgas.

Cenizas

Las cenizas constituyen el mayor componente en todas las diatomeas. Todas están en torno a un 60%, no existiendo diferencias significativas entre ellas, su alto contenido en cenizas es característico de especies de diatomeas con paredes celulares fuertemente silificadas (Parsons *et al.*, 1961 y Whyte, 1987).

Proteínas.

El nivel de proteínas, que poseen las cuatro diatomeas, es mayor que la composición lipídica. Los lípidos representan el menor componente no superando el 10%, las proteínas representan el segundo en cantidad, entre un 10- 20% dependiendo de la diatomea y de la fase. Para Brown *et al.* (1996) las proteínas son el mayor constituyente ($\geq 30\%$) independiente de las condiciones de luz y de la etapa de recogida del cultivo y para Renaud *et al.*, (1994) las diatomeas tienen como componentes principales las proteínas, lípidos y cenizas, estando los carbohidratos en menores cantidades. Según los resultados del presente experimento, la cantidad de carbohidratos

supera a la de proteínas y a la de lípidos excepto para las diatomeas *Amphora* sp. y *Prochkinia* sp. en la fase exponencial. Donde la cantidad de proteínas, $19,704 \pm 0,95$ y $20,72 \pm 1,4$ (% peso seco) supera a la cantidad de carbohidratos $13,5 \pm 5,01$ y $10,05 \pm 6,7$ (% peso seco) y de lípidos $9,74 \pm 1,7$ y $7,82 \pm 0,72$ (% peso seco) respectivamente. Ambas diatomeas a su vez presentan un 20 % de peso seco de proteínas siendo los valores más altos encontrados. Las únicas que no tienen diferencias significativas entre la fase exponencial y estacionaria son *Navicula incerta*. y *Nitzschia* sp con 13% y 14% de proteínas, en peso seco respectivamente.

Brown *et al.* (1997) encontraron que en los cultivos no aireados de diatomeas, las proteínas es el mayor componente orgánico, seguidos de los lípidos y carbohidratos. Las proteínas y los carbohidratos presentan como promedio los mismos niveles que los obtenidos en los cultivos aireados, cerca de un 30% de peso seco y 7% de peso seco respectivamente. Se diferencian únicamente los lípidos, alcanzando valores mayores en torno a un 20% de peso seco, en cultivos aireados con 1% de CO₂ con respecto a un 15 % de peso seco, para cultivos no aireados. Estos experimentos fueron realizados a 20 °C y a 25 °C para las especies tropicales, $70-80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad. Renaud *et al.* (1999) cultivando dos especies de *Nitzschia* a 25 ± 1 °C encuentran también altos valores de proteínas, seguidas de lípidos y carbohidratos. Las diferencias encontradas en el presente estudio, en comparación con lo descrito anteriormente, podrían ser debidas a la mayor temperatura y el fotoperiodo de luz continua de los cultivos. El óptimo nivel de proteínas en una dieta de abalón depende de las especies, sin embargo el nivel óptimo ha sido reportado entre el rango de 20% a 35 % (Uki y Watanabe, 1992; Mai *et al.*, 1995; Britz y Hecht, 1997 y Coote *et al.*, 2000). En el presente estudio sólo las diatomeas *Amphora* sp. y *Proschkinia* sp. en su fase

exponencial poseen un 20% de peso seco de proteínas, siendo por ello las más adecuadas para la dieta del abalón, en cuanto al aporte proteico.

Carbohidratos

Los niveles de carbohidratos varían entre un 10- 27%, de peso seco, siendo *Navicula incerta* exponencial la que presenta los mayores niveles $27,23 \pm 3,77$ (% peso seco) y *Proschkinia* sp. exponencial la de menor valor con $10,05 \pm 6,7$ (% de peso seco), Las demás diatomeas rondan el 20% de peso seco. Gordon *et al.* (2006) encuentran niveles también muy altos de carbohidratos, 17,55% de peso seco para *Nitzschia laevis* y 25,09% de peso seco para *Navicula cf. Lenzii* y 25,09% de peso seco para *Amphora luciae*, estando dentro del rango de las necesidades de la dieta de los juveniles de abalón (Mercer *et al.*, 1993).

Renaud *et al.* (1994), encontró para *Navicula* sp., *Nitzschia closterium* y *Nitzschia frustulum* que el contenido más bajo lo presentaban los carbohidratos, después en orden ascendente en valor estarían los lípidos y de último las proteínas, con niveles más altos de lípidos y de proteínas para las dos especies de *Nitzschia*. Al contrario, en este estudio *Nitzschia* sp. junto con *Navicula incerta* presenta la cantidad más baja de lípidos y de proteínas. Estas diferencias pueden ser debidas a que el cultivo realizado por Renaud *et al.* (1994) fuera un ciclo no continuo de iluminación, 12:12 h luz/oscuridad, mientras que el presente experimento se realizó con iluminación constante. Brown (1991) observó bajos valores de proteínas cuando las células microalgales crecían bajo iluminación continua, en comparación a las diatomeas que crecen bajo 12:12 h luz/oscuridad.

Estudios realizados por Brown *et al.* (1996) a diferentes intensidades de luz y fotoperiodos muestran que de la composición bioquímica proximal, el porcentaje de carbohidratos es susceptible a la mayor variación entre células cultivadas a diferentes condiciones de cultivo, entre un rango de 6,4 a 36% de peso seco. Obtienen también que los cultivos con fotoperiodos continuos de 24:0 h de luz/oscuridad tienen de un tercio a un cuarto más carbohidratos, que los cultivos con fotoperiodos no continuos 12:12 h luz/oscuridad, tanto en fase logarítmica como en fase estacionaria; esto podría explicar los niveles altos encontrados de carbohidratos en los presentes experimentos.

Lípidos.

Los bajos valores encontrados de lípidos pueden ser explicados por lo observado por Renaud *et al.* (1995), las dos especies de *Nitzschia* objeto de su estudio tenían un decrecimiento lineal en el contenido de lípidos con el incremento de la temperatura. También Aaronson (1973) y Opute (1974) han informado de la disminución en la producción de lípidos a temperaturas extremas, bajas o altas. Opute (1974) sugiere que los efectos son debidos a la cesión del crecimiento a temperaturas extremas, por daños irreversibles en las enzimas de las plantas.

Pocos autores han estudiado como varía la composición bioquímica a medida que avanza el cultivo, es decir en distintos días de crecimiento. El día en el cual las diatomeas se recogen y las condiciones de cultivo afectan a la composición bioquímica (Brown *et al.*, 1993). En el presente estudio, las diatomeas son recogidas en dos fases distintas, en la exponencial y en la estacionaria, y todas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones, para ver el efecto del día de recogida en la calidad nutritiva del cultivo.

En este estudio, *Navicula incerta* se diferencia del resto de las diatomeas, pierde carbohidratos en la fase estacionaria para ganar lípidos, una indicación de otros requerimientos en nutrientes en comparación con las otras diatomeas pudiendo ser un indicio de una deficiencia en sílice antes que una de nitrógeno o fósforo.

Sifrin y Chisholm, (1981); Thomas *et al.* (1984) y Harrison *et al.* (1990) encontraron que las células con el N-limitante siguen esta tendencia: con la caída de la fase estacionaria, los carbohidratos y menos extendido los lípidos se incrementan y las proteínas decrecen. Esto explica el comportamiento de *Amphora* sp. y *Proschkinia* sp. en la fase estacionaria. El incremento de carbohidratos, en la fase estacionaria, se explica con el incremento de la glucosa polimérica durante los periodos de luz y un descenso durante la noche (Várum *et al.*, 1986), que corrobora los valores altos de carbohidratos encontrado para ambas fases.

Brown *et al.* (1996) obtienen que la cantidad de lípidos es casi la misma (21% de peso seco) en las células durante la fase logarítmica independiente de las condiciones de cultivo y que en la fase estacionaria el porcentaje se incrementa. En el presente caso, la concentración de lípidos no supera el 10% de peso seco y el aumento en la cantidad de lípidos en la fase estacionaria sólo se ve en *Navicula incerta*.

Ácidos grasos.

Los ácidos grasos juegan un papel importante en la nutrición animal como fuente de energía, constituyentes de membranas y metabolitos intermediarios. Los PUFA de cadena larga, DHA y EPA considerados ácidos grasos esenciales son de gran importancia (Marty *et al.*, 1992, Sargent *et al.*, 1999) y no pueden ser sintetizados en cantidades suficientes para mantener el crecimiento y supervivencia (Watanabe *et al.*, 1983). Los perfiles de ácidos grasos, de las diatomeas analizadas, son característicos de

la mayoría de las diatomeas: altas proporciones de 16:1n-7 y 16:0, con variable, pero usualmente altas proporciones de 14:0 y 20:5n-3 (EPA), siendo este n-3PUFA el predominante en las diatomeas estudiadas (Brown *et al.*, 1996, 1997). El contenido de EPA y ARA en las diatomeas muestreadas estuvo entre los valores medios descritos para otras diatomeas (Renaud *et al.*, 1999, Liang *et al.*, 2001, Gordon *et al.*, 2006). Como muestran informes típicos de diatomeas, la proporción de DHA fue baja en todas las diatomeas objeto de estudio, siendo la más baja para *Navicula incerta*. También el DHA es bajo en los tejidos de abalón y por lo tanto se supone que de menor importancia cuantitativa en la nutrición del abalón (Dunstan *et al.*, 1996, Mai *et al.*, 1995). *Nitzschia* sp. tuvo altas cantidades de EPA y DHA en comparación con informes previos de especies de *Nitzschia* (Renaud *et al.*, 1994, 1999). Se ha descrito que el EPA promueve un rápido crecimiento en los juveniles de *H. discus hannai* (Mai *et al.*, 1995, Dunstan *et al.*, 1996). EPA tiene especial importancia durante la alimentación temprana de las post-larvas de abalón (Viana *et al.*, 2007) esto muestra que este ácido graso podría ser realmente absorbido de las diatomeas (Gordon *et al.*, 2006). Si nos basamos en estudios nutricionales previos realizados a varias especies de abalón (Mai *et al.*, 1995, Daume *et al.*, 2003, Gordon *et al.*, 2006, Viana *et al.*, 2007), los niveles de PUFA, n-3 PUFA y más específicamente EPA y DHA encontrados en este estudio sugieren que las diatomeas analizadas podrían servir a las post-larvas de *H. tuberculata coccinea* y satisfacer sus requerimientos nutricionales. N-6 PUFA y particularmente ARA, son importantes para las etapas larvarias de peces y también podrían ser para el abalón como describen Viana *et al.* (2007) su incremento en los tejidos de las post-larvas una vez que estas comienzan a ramonear. Lo expuesto contradice a Gordon *et al.* (2006). Todas las diatomeas, en este estudio, mostraron altos niveles de ácidos grasos saturados, especialmente 14:0 y 16:0, lo cual fue comparable a lo que se encontró en *Amphora* sp.

cultivada en sistemas al exterior (De la Peña, 2007). Este hecho podría favorecer a las post-larvas de abalón dado que altos niveles de ácidos grasos saturados sugieren ser beneficiosos para el rápido crecimiento de las larvas, porque la energía se libera más eficientemente (Thompson *et al.*, 1993). Además, los SFA se encontraron en alta proporción en los tejidos de las post-larvas de *Haliotis fulgens* (Viana *et al.*, 2007). En resumen, combinando las diatomeas, modificando las condiciones de cultivo y el protocolo de cosechado de las diatomeas a gran escala, en los criaderos de abalón se mejoraría la calidad de las microalgas producidas como alimento. Esto permitiría adecuar los cultivos de microalgas a los requerimientos nutricionales de las post-larvas de abalón y así mejorar su crecimiento y supervivencia para la sostenibilidad de la producción. Los resultados indican lo adecuado que es seleccionar las diatomeas para las post-larvas de abalón, en términos de: características de las células algales, producción, capacidad de fijación y valor nutritivo.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. Las cuatro diatomeas investigadas, en este estudio, son favorables, en términos de rango de tamaño, para su uso como fuente de alimentación para las post-larvas de *H. tuberculata coccinea*. *Navicula incerta* con $18 \pm 0,95$ μm de largo y $4,10 \pm 0,40$ μm de ancho, *Nitzschia* sp. con $18,23 \pm 0,55$ μm de largo y $3 \pm 0,20$ μm de ancho, *Amphora* sp. con $10,60 \pm 0,20$ μm de largo y $3,67 \pm 0,12$ μm de ancho y la más pequeña *Proschkinia* sp. con $8,20 \pm 0,42$ μm de largo y $3 \pm 0,12$ μm de ancho.
2. La densidad de inóculo de 100.000 cél/ml es la densidad óptima para el cultivo de *Amphora* sp., *Nitzschia* sp., *Navicula incerta* y *Proschkinia* sp. considerando la tasa de crecimiento y la producción obtenida.
3. *Amphora* sp. y *Nitzschia* sp. se comportan igual a nivel de crecimiento, no existiendo diferencias significativas entre ellas, ni en tasa de crecimiento ni en producción tanto a día 3 como a día 7, a ninguna densidad probada.
4. *Proschkinia* sp., a las tres densidades de inóculo probadas, alcanza la mayor tasa de crecimiento y producción semanal de las cuatro diatomeas estudiadas, representando más del doble de la cantidad que obtienen el resto de las diatomeas.
5. Las células de *Amphora* sp. presentan la mejor capacidad de adhesión al sustrato de las cuatro diatomeas bentónicas, con 10- 12.000 cél/mm², mientras las otras se sitúan alrededor de 8.000 cél/mm².

6. La densidad de inóculo influye en el número de células adheridas para *Navicula incerta* y *Proschkinia* sp., siendo la densidad óptima la de 100.000 cél/mm², mientras que no tiene influencia para *Amphora* sp. y *Nitzschia* sp.
7. *Amphora* sp. en fase exponencial tiene la mayor cantidad de lípidos totales de todas las diatomeas con un 10% y la mayor cantidad de proteínas con un 20%.
8. *Navicula incerta*, con un 27%, en fase exponencial, tiene la mayor cantidad de carbohidratos de todas las diatomeas.
9. Todas las diatomeas, *Amphora* sp., *Navicula incerta*, *Nitzschia* sp. y *Proschkinia* sp. presentan el mismo contenido en cenizas, próximo a un 60%, no existiendo diferencias significativas entre ellas ($P < 0.01$).
10. Todas las diatomeas, excepto *Navicula incerta*, muestran un incremento de carbohidratos y un descenso de lípidos y proteínas cuando alcanzan la fase estacionaria. *Navicula incerta* incrementa el almacenamiento de lípidos en vez de carbohidratos y mantiene su nivel de proteínas.
11. Todas las diatomeas presentan una elevada cantidad de PUFAs (especialmente EPA) y un bajo contenido en DHA. Ninguna de las diatomeas presenta diferencias significativas ($P > 0.05$) en cuanto a la cantidad de SFA. *Proschkinia* sp. en fase logarítmica presenta un alto contenido de ARA.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA.

AARONSON, S. 1973. Effect of incubation temperature on the macromolecular and lipid content of the phytoflagellate *Ochromonas daniea*. J. Phycol, 9, 111-113.

ACKMAN, R. G. 1983. Fatty acid metabolism in bivalves. En Pruder, G. D. et al., (Eds). Pp 358-376. Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. Proceedings of the 2nd International Conference on Aquaculture Nutrition. Lousiana, USA.

AFFAN, A., KARAWITA, R., JEON, Y. J. y Lee, J. B. 2007. Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (Bacillariophyceae) from Jeju Island, Korea. J. Phycol. 43, 823-832.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, Virginia chapter 4, p 1-30.

BEHRENS, P. W. y KYLE. D. J. 1996. Microalgae as a source as fatty acids. Journal of Food Lipids 3, 259-272.

BOC, 2001/097. Real decreto 151/2001 de 23 de Julio de 2001.
<http://www.gobiernodecanarias.org/boc/>; www.gobcan.es/boc/

BOROWITZKA, M. A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J. Appl. Phycol. 7, 3-15.

BOROWITZKA, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9 (5), 393-401.

BRITZ, P.T. y HECHT, T. 1997. Effect of dietary protein and energy level on growth and body composition of South African abalone, *Haliotis midae*. *Aquaculture* 156, 195-210.

BROWN, M. R. 1991. The amino acid and sugar composition of sixteen species of microalgae used in mariculture. *J. exp. mar. Biol. Ecol*, 145, 79-99.

BROWN, M. R., GARLAND, C. D., JEFFREY, S. W., JAMESON, I. D. y LEROI, J. M. 1993. The gross and amino acid compositions of bath and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T. ISO), *Paulova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.* 5, 285-296.

BROWN, M. R., DUNSTAN, G. A., NORWOOD, S. J., y MILLER, K. A. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.* 32, 64-73.

BROWN, M. R., JEFFREY, S. W., VOLKMAN, J. K. y DUNSTAN, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315-331.

BUSBY, W. F. y LEWIN, J. C. 1967. Silicate uptake and silica shell formation by synchronously dividing cells of the diatom *Navicula pelliculosa* (Bréb.) Hilse. J. Phycol. 3, 127-131.

CHRISTIE, W. W. 1982. Lipids Analysis. Christie, W. W. (Ed.). Pergamon Press, Oxford, p 17-23, 51-61.

COOTE, T. A., HONE, P. W., VAN BARNEVELD, R. J. y MAGUIRE, G. B. 2000. Optimal protein level in a semipurified diet for juvenile greenlip abalone *Haliotis laevigata*. Aquacult. Nutr. 6, 213-220.

CORREA-REYES, J. G., SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P., SIQUEIROS-BELTRONES, D. A. y FLORES-ACEVEDO, N. 2001. Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under two light conditions. Journal of Shellfish Research 20 (2), 603-610.

COTA-SÁNCHEZ, F. 1998. Cultivo mono y pluriespecífico de tres diatomeas bentónicas en condiciones de luz y temperatura constantes. Bach. Thesis. Facultad de Ciencias del Mar. Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa. pp 99.

DARLEY, W. M. 1977. Biochemical composition. En: The Biology of diatoms, Chapter 7. p 198-223.

DAUME, S. y RYAN, S. 2004. Nursery culture of the abalone *Haliotis laevigata*: Larval settlement and juvenile production using cultured algae or formulated feed. *J. Shellfish Res.* 23, 1019-1026.

DAUME, S., KRSINICH, A., FARRELL, S. y GERVIS, M. 2000. Settlement, early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. *J. Appl. Phycol.* 12, 479-488.

DAUME, S., LONG, B.M. y CROUCH, O., 2003. Changes in amino acid content of algal feed species (*Navicula* sp.) and the effect on growth and survival of juvenile abalone (*Haliotis rubra*). *J. Appl. Phycol.* 15, 201–207.

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.

DUNSTAN, G.A., BAILLIE, H. J., BARETT, S. M., WOLKMAN, J. K., 1996. Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture* 140, 115-127.

EBERT, E. E., HOUK, J. L. 1984. Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* 39, 375-392.

EUROSTAT, 2005. European Statistics. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>

FALCIATORE, A. y BOWLER, C. 2002. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu Rev Plant Biol.* 53, 109-130.

FAO, Departamento de Pesca (1997). Desarrollo de la acuicultura. Roma, FAO. Orientaciones Técnicas sobre la Pesca Responsable 5: 54.

FAO, 2006. El estado mundial de la Pesca y la Acuicultura, 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. pp 198.

FAO, 2009. El estado mundial de la Pesca y la Acuicultura, 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. pp 218.

FAO STATISTIC, 2009. Sistema global de información de pesquerías y acuicultura. <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>

FLORES-AGUILAR, R. (2003). Estudio del Mercado Mundial y Definición de Ventajas Competitivas de Chile para la Producción y Exportación de Abalón Japones y Abalón Californiano.

FLORES-VERGARA, C. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de microalgas bentónicas bajo diferentes condiciones de temperatura y luz. M. Sc. Thesis. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Baja California, México, pp 101.

FOGG, G. E. 1953. The Metabolism of Algae. Methuen. London, pp 149.

FOLCH, J., LEE, M. y STANELY, C. H. S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 226, 497-509.

GARDUÑO, R. A., HALL, B. D., BROWN, L. y ROBINSON, M. G. 1996. Two distinct colonial morphotypes of *Amphora coffeaeformis* (Bacillariophyceae) cultured on solid media. J. Phycol. 32, 469-478.

GLAUDE, R. M. y MAXEY, J. E. 1994. Microalgal feeds for aquaculture. Journal of Applied Phycology 6, 131-141.

GOLDBERG, K. I., BIGOGNO, C., SHRESTHA, P. y COHEN, Z. 2002. Nitrogen starvation induces the accumulation arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae). J. Phycol. 38, 991-4.

GORDON, R. H. y COOK, P. A. 2001. World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future. Journal of Shellfish Research, 20 (2), 567-570.

GORDON, N., NEORI, A., SHPIGEL, M., LEE, J. y HARPAZ, S. 2006. Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. Aquaculture 252, 225-233.

GRANT, J. F. 1981. Abalone culture in Japan: Development and current commercial practice. Tasmanian Fisheries Research. Tasmanian Fisheries Development Authority, Hobart, Tasmania.

GUILLARD, R. R. L. 1973. Division rates. En: Stein, J. (Ed.). Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, New York, p 289-311.

GUILLARD, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. p 26-60. En: Smith, M. L. y Chanley, M. H. (Eds.). Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum Press, New York, pp 338.

HAHN, K. O., 1989. Nutrition and growth of abalone. En: Hahn, K. O. (Ed.), Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods. CRC Press, Boca Raton, FL, p 135-156.

HARRISON, P. J., THOMPSON, P. A. y CALDERWOOD, G. S. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. J. Appl. Phycol. 2, 45-56.

HECHY, E., MOPPER, K. y GEGENS, E. T. 1973. The amino acids and sugar composition of diatom cell walls. Marine Biology, V. 19, 323-331.

HELM, M. M., BOURNE, N. y LOVATELLI, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un Manual Práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. N° 471. Roma. p 182.

HILLEBRAND, H., DU'RSELEN, C. D., KIRSCHTEL, D., POLLINGHER, U. y ZOHARY, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J. Phycol. 35, 403-424.

HU, H. y GAO, K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis sp.* with enriched carbon sources. Biotechnol. Lett. 25, 421-5.

HUCHETTE, S. M. H., KOH, C. S. y DAY, R. W. 2003. Growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in aquaculture tanks: effects of density and ammonia. Aquaculture 219, 457-470.

JACUMAR, 2009. <http://www.mapa.es>.

KAWAMURA, T. 1994. The role of benthic diatom in the early of the Japanese abalone (*Haliotis discus hannai*). En: Watanabe, Y., Yamashita, Y. y Oozeki, Y. (Eds.). Survival strategies in early life stages of marine resources. Balkema, Rotterdam, p 335-367.

- KAWAMURA, T. 1996. The role of benthic diatoms in the early life stages of the Japanese abalone (*Haliotis discus hannai*). En: Watanave, Y., Yamashita, Y. y Oozeki, Y. (Eds.). Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources. Proceedings of an International Workshop. Yokohama, Japan, p 355-367.
- KAWAMURA, T. y HIRANO, R. 1992. Seasonal changes in benthic diatom communities colonizing glass slides in Aburatsubo Bay, Japan. *Diatom Research* 7 (2), 227-239.
- KAWAMURA, T. y KIKUCHI, T. 1992. Effects of benthic diatoms on settlement and metamorphosis of abalone larvae (en Japonés con abstract en Inglés). *Suisanzoshoku* 40, 403-409.
- KAWAMURA, T. y TAKAMI, H. 1995. Analysis of feeding and growth rate of newly metamorphosed abalone *Haliotis discus hannai* fed on four species of benthic diatoms. *Fish. Sci.* 61, 357-358.
- KAWAMURA, T., SAÍDO, T., TAKAMI, H. y YAMASHITA, Y. 1995. Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 194, 189-199.
- KAWAMURA, T., ROBERTS, R. D. y NICHOLSON, C. M. 1998a. Factors affecting the food value of diatom strains for postlarval abalone *Haliotis iris*. *Aquaculture* 160, 81-88.

KAWAMURA, T., ROBERTS, R. D. y TAKAMI, H. 1998b. A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *J. Shellfish Res.* 17, 615-625.

KNUCKEY, R. M., BROWN, M. R., BARRET, S. M. y 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.

LANDS, W. E. M. 1986. *Fish and human health*. Academic Press, Orlando, Florida, USA.

LEBEAU, T., y ROBERT, J. M. 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65 (6), 624-632.

LEE, R. E. 1999. Heterokontophyta. Bacillariophyceae. En: Lee, R. E. (Ed.) *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, p 415-458.

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. *Chin. J. Oceano. Limno.* 19, 249-254.

LINNAEUS, C. 1758. *Systema Naturae*. Ed. X. (*Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata.*) Holmiae, *Systema Nat.* ed 10 I-II, 1-824.

- LÓPEZ, P. J., DESCLE´S, J., ALLEN, A. E. y BOWLER, C. 2005. Prospects in diatom research. En: Inze, D. (Ed.). Plant Biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 16, 180-186.
- LU, C., RAO, K., HALL, D. y VONSHAK, A. 2001. Production of eicosapentaenoic acid (EPA) in *Monodus subterraneus* grown in a helical tubular photobioreactor as affected by cell density and light intensity. J. Appl. Phycol. 13, 517-22.
- MAI, K., MERCE, J. P. y DONLON, J. 1995. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino: IV. Optimum dietary protein level for growth. Aquaculture 136, 165-180
- MANN, D. G. y DROOP, S. J. M. 1996. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. Hydrobiología 336, 19-32.
- MARTY, Y., DELAUNAY, F., MOAL, J., SAMAIN, J-F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 163, 2, 221-234.
- MERCER, J.P., MAI, K.-S. y DONLON, J. 1993. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus and *Haliotis discus hannai* Ino: I. Effects of algal diets on growth and biochemical composition. Invertebr. Reprod. Dev., 23 (2-3), 75-88.

- MULLER-FEUGA, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology* 12, 527-534.
- NEW, M. B. 1990. Freshwater prawn culture- A review. *Aquaculture* 88, 99-143.
- NORMAN-BOUDREAU, K., BURNS, D., COOKE, C. A. y AUSTIN, A. 1986. A simple technique for detection of feeding in newly metamorphosed abalone. *Aquaculture*, 51, 313-317.
- NORTON, T. A., MELKONIAN, M. y ANDERSEN, R.A. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35, 308-326.
- OAKES, F. R. y PONTE, R. D., 1996. The abalone market: Opportunities for cultured abalone. *Aquaculture* 140, 187-195.
- OHGAI, M., WAKANO, M. y NAGAI, S. 1991. Effect of attached microalgae in the settlement of larvae and growth of juveniles in abalone, *Haliotis discos hannai* Ino (en Japonés con abstract en Inglés). *Suisanzoshoku* 39, 263-266.
- OPUTE, F. I. 1974. Studies on fat accumulation in *Nitzschia palaea* Kutz. *Ann. Bol*, 38, 889-902.
- OTERO, A., GARCÍA, D. y FÁBREGAS, J. 1997. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 9, 465-9.

- PARKER, F., DAVISON, M., FREEMAN, K., HAIR, S. y DAUME, S. 2007. Investigation of optimal temperature and light conditions for three benthic diatoms and their suitability to commercial scale nursery culture of abalone (*HALIOTIS LAEVIGATA*). *Journal of Shellfish Research* 26 (3), 751-761.
- PARSONS, T. R., STEPHENS, K. y STRICKLAND, J. D. K. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 18, 1001-1016.
- REITAN, K. I., RAINUZZO, J. R. y OLSEN, Y. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture. Int.* 2, 33-48.
- RENAUD, S. M., PARRY, D. L. y THINH, L. V. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology* 6, 337-345.
- RENAUD, S.M., ZHOU, H-Q., PARRY, D. L., THINH, L.-V. y WOO, K. C. 1995. Effect of temperature on the growth total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgal species *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea* and commercial species *Isochrysis* sp., (clone Tiso). *J. Appl. Phycol.* 7, 597-602.

- RENAUD, S. M., VAN THINH, L. y PARRY, D. L. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170, 147-159.
- REYNOLDS, C. S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 384.
- ROBERTS, R. D., KAWAMURA, T. R. y NICHOLSON, C. M. 1999a. Growth and survival of postlarval abalone (*Haliotis iris*) in relation to development and diatom diet. *J. Shellfish Res.* 18, 243-250.
- ROBERTS, R., KAWAMURA, T. y TAKAMI, H. 1999b. Morphological changes in the radula of abalone (*Haliotis iris*), during post-larvas development. *J. Shellfish Res.* 8 (2), 637-344.
- ROBERTS, R., KAWAMURA, T. y TAKAMI, H. 2000. Diatoms for Abalone Culture: a workshop for abalone farmers. Prepared for 40th International Abalone Symposium. New Zealand, Cawthron Institute. Cawthron Report. N°. 547. pp 28.
- SABBE, K., CHEPURNOV, V. A., VYVERMAN, W. y MANN, D. G. 2004. Apomixis in *Achnanthes* (Bacillariophyceae); development of a model system for diatom reproductive biology. *European Journal of Phycology*, 39, 327-341.

SARGENT, J., MCEVOY, L., ESTÉVEZ, A., BELL, G., BELL, M., HENDERSON, J., y TOCHER, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229.

SCALA, S. y BOWLER, C. 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell Mol Life Sci* 58, 1666-1673.

SEARCY-BERNAL, R., ANGUIANO-BELTRÁN, C. y ESPARZA-HERNÁNDEZ, A. 2003. The effect of irradiance on the survival and growth of abalone postlarvae *Haliotis fulgens* fed *Navicula incerta*. *Aquaculture* 228, 237-248.

SICKO-GOAD, L. y ANDRESEN, N. A. 1991. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *J. Phycol.* 27, 710-718.

SHIFRIN, N. S. y CHISHOLM, S., 17, W. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 17, 374-84.

SIMENTAL- TRINIDAD, J. A., SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P. y CORREA-REYES, J. G. 2001. Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture médium a common agricultural fertilizer. *Journal of Shellfish Research* 20 (2), 611-617.

SIQUEIROS-BELTRONES. D. A. 1999. Análisis Taxonómico y sucesional en películas de diatomeas bentónicas utilizadas como alimento de post-larvas de abalón (*Haliotis* spp.) en cultivo. Thesis, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México. Facultad de Ciencias Marinas. Postgrado en Oceanografía Costera, pp 93.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. y ISAMBERT, A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. Review. Journal of Bioscience and Bioengineering 101 (2), 87-96.

ST. JOHN, M. A., CLEMMESSEN, C., LUND, T. y KOSTER, T. 2001. Diatom production in the marine environment: implications for larval fish growth and condition. ICES J. Mar. Sci. 58, 1106-13.

TAGUCHI, S., HIRATA, J. A. y LAWS, E. A. 1987. Silicate deficiency and lipids síntesis of marine diatoms. J. Phycol. 23, 260-267.

THOMAS, W. H., SEIBERT, D. L. R., ALDEN, M., NEORI, A. y ELDRIDGE, P. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. III. *Isochrysis* sp. and *Monallantus salina* experiments and comparative conclusions. Biomass 5, 299-316.

THOMPSON, P. A., HARRISON, P. J. Y WHYTE, J. N. C. 1990. Influence of irradiance on the fatty composition of phytoplankton. J. Phycol. 26, 278-288.

- THOMPSON, P. A., GUO, M. y HARRISON, P. J., 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional values for larvae of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Mar. Biol. 117, 259-268.
- TORRENTERA, L. y TACON, A. G. J. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. En: AQUILA. Apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para América Latina y el Caribe. Project reports, N° 12. FAO, Brasilia, Brasil, pp 90.
- UKI, N. y KIKUCHI, S. 1979. Food value of six benthic micro-algae in growth of juvenile abalone, *Haliotis discos hannai* (in Japanese with English abstract) Bull. Tohoku Reg Fish Res Lab 40, 47- 52.
- UKI, N. y WATANABE, 1992. Review of the nutritional requirements of abalone (*Haliotis* spp.) and development of more efficient artificial diets. En: Shepherd, S. A., Tegner, M. J., y Guzmán Del Prío, S. A (Eds.) Abalone of the world: biology, fisheries and culture, Proceedings of the 1st International symposium on abalone. Fishing news books. London: Blackwell Scientific Publications Ltd. pp. 504-517.
- VAN DEN HOEK, C., MANN, D. G. y JOHNS, H. M. 1997. Algae. An Introduction to Phycology, Cambridge University Press, London.

- VÁRUN, K. M., OSTGAARD, K. y GRIMSRUD, K. 1986. Diurnal rhythms in carbohydrate metabolism of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol, 102, 249-56.
- VOLTOLINA, D.1991. A comparison of methods for the dispersion of cultures of benthic diatoms. Cryptogamie, Algol.12 (3), 183-187.
- VIANA, M. T., CORREA, G., LAZO, J. P., FRÍAS-DÍAZ, R., DURAZO-BELTRÁN, E. y VASQUEZ-PELAEZ, C., 2007. Digestive physiology and metabolism of green abalone *Haliotis fulgens* from postlarvae to juvenile, fed three different diatoms. Aquaculture 271, 1-4, 449-460.
- VRIELING, E. G., BEELEN, T. P. M., SUN, Q., HAZELAAR, S., VAN SANTEN, R. A. y GIESKES, W.W.C. 2004. Ultrasmall, small, and wide angle X-ray scattering analysis of diatom biosilica: interspecific differences in fractal properties. J. Mater. Chem. 14, 1970-1975.
- WANG, Q., WANG, S., DING, M., Li, R. SHI y CHENG, A. 1997. Studies on culture conditions of benthic diatoms for feeding abalone. I. Effects of temperature and light intensity on growth rate. Chinese J. Oceanol. Limnol. 15, 296-302.
- WATANABE, T., KITAJIMA, C. y FUJITA, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture, 34, 115-143.

WEN, Z. y CHEN, F. 2000. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnol Lett* 22, 727-733.

WHYTE, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60, 231-241.

WOOD, B. J. B. 1974. Fally acids and saponifiable lipids. En: Stewart. W. D. P. (Ed). *Algal Physiology and Biochemistry*. University California Press. Berkeley. 236-65.

YONGMANITCHAI, W. y WARD, O. P. 1991. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry* 30, 2963-7.

8. ANEXO I:

Formas de crecimiento de las especies de diatomeas bentónicas.

Species ^{a)}	Mode of attachment	Solitary or colonial ^{b)}	Motility ^{c)}	Adhesive strength ^{d)}	Type
<i>Achnanthes brevipes</i> var. <i>intermedia</i>	Mucous thread	Solitary	+	+++	E
<i>Achnanthes longipes</i>	Mucous thread	Solitary	+	+++	E
<i>Amphora acutiuscula</i> (1)	Prostrate	Solitary	++	+++	B
<i>Amphora angusta</i> var. <i>venaricola</i>	Prostrate	Solitary	+++	+	A
<i>Amphora arcus</i>	Prostrate	Solitary	++	++	B
<i>Amphora coffeaeformis</i> (1)	Prostrate	Solitary	++	+++	B
<i>Amphora subacutiuscula</i> (1)	Prostrate	Solitary	++	+++	B
<i>Amphora</i> sp.-1 (2)	Prostrate	Solitary	++	+++	B
<i>Amphora</i> sp.-2 (2)	Prostrate	Solitary	++	+++	B
<i>Bacillaria paxillifer</i>	Upright	Colonial	+	++	D
<i>Berkeleya mucosa</i>	Mucous tube	Colonial	+	+++	G
<i>Berkeleya rutilans</i> (3)	Mucous tube	Colonial	+	+++	G
<i>Cocconeis aculeatum</i> var. <i>parva</i>	Prostrate	Solitary	++	+++	B
<i>Cylindrothoa closterium</i> (4)	Prostrate	Solitary	+++	+	A
<i>Gyrosigma tenuissimum</i>	Prostrate	Solitary	+++	+	A
<i>Licmophora threbergii</i>	Mucous thread	Colonial	-	+++	F
<i>Licmophora flabellata</i>	Mucous thread	Colonial	-	+++	F
<i>Licmophora gracilis</i> var. <i>anglica</i>	Mucous thread	Colonial	-	+++	F
<i>Mastogloia cistensis</i>	Mucous thread	Solitary	+	+++	E
<i>Navicula britannica</i>	Prostrate	Solitary	+++	+	A
<i>Navicula ramosissima</i> (2)	Mucous tube	Colonial	+	+++	G
<i>Nitzschia panduriformis</i> var. <i>minor</i>	Prostrate	Solitary	++	+	A
<i>Nitzschia longissima</i> var. <i>reversa</i> (4)	Prostrate	Solitary	+++	+	A
<i>Nitzschia rectilonga</i>	Prostrate	Solitary	+++	+	A
<i>Nitzschia</i> sp.	Prostrate	Solitary	+++	+	A
<i>Partholus delognei</i>	Mucous tube	Colonial	+	+++	G
<i>Stauroneis membranacea</i>	Mucous thread	Solitary	+	+++	E
<i>Synedra imentiana</i> (2)	Upright	Solitary	-	++	C
<i>Synedra tabularata</i> (2)	Upright	Solitary	-	++	C
<i>Tropidoneis</i> sp.	Mucous thread	Solitary	+	+++	E

a) Some species were counted together; (1): species counted together as *Amphora* spp.-1, (2): as *Amphora* spp.-2, (3): as *Amphora* spp.-3, (4): as *Nitzschia* spp.-1, (5): as *Synedra* spp.

b) "Solitary" includes small colonies consisting of several cells.

c) +++: move actively and swiftly, ++: move occasionally and slowly, +: motile species, but they do not move in the mode of attachment, -: non-motile.

d) +++: very strong, and able to resist separations by jet stream from capillary tube, ++: strong, but peels off by jet stream, +: very weak, and readily comes off by slight shaking of culture vessel.