



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

DETERMINACION DE LA DILUCION OPTIMA DEL CULTIVO  
SEMICONTINUO DE LA MICROALGA Monochrysis lutheri  
EN TANQUES DE 400 LITROS



**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**OCEANOLOGO**  
PRESENTA  
SERGIO ALEJANDRO BADILLO CASTRO

Ensenada, B.C. Febrero de 1989

## RESUMEN


Se trabajó con cultivos semicontinuos con la microalga Monochrysis lutheri en tanques de 400 litros haciendo diluciones diarias del 10, 20, 30, 35, 40, 50, 60 y 70% para obtener el volumen de cosecha y su recuperación con medio de cultivo con las cuales se obtuvo la dilución óptima de los cultivos semicontinuos. Estos cultivos utilizaron el medio de cultivo F/2 de Guillard (1974). Se llevaron registros diarios de la concentración de cél/ml con un espectrofotómetro Hatch ( $dc/2$ ), temperatura, pH y se obtuvieron parámetros poblacionales. Se aplicó el modelo de Monod (1950) y una regresión polinomial para ajustar los datos experimentales de los cultivos semicontinuos. Con el modelo de Monod (1950) se obtuvo una dilución óptima del 40%, mientras que la regresión polinomial fué del 45%. Al obtener los resultados se escogió la dilución óptima del 40% ya que fue la de mayor rendimiento y producción, para hacer comparaciones de producción y costos con el sistema discontinuo. Además con la dilución del 40% obtenida se diseñaron varias estrategias, una de las cuales permite la cosecha constante de 6 tanques/día de producción y otra permite la cosecha de 6 a 9 tanques/día, lo que proporciona un incremento del 20% y 30% en producción y los costos de estas estrategias se reducen en estos mismos porcentajes.


DETERMINACION DE LA DILUCION OPTIMA DEL CULTIVO  
SEMICONTINUO DE LA MICROALGA Monochrysis lutheri  
EN TANQUES DE 400 LITROS.


TESIS  
QUE PRESENTA:  
SERGIO ALEJANDRO RADILLO CASTRO

Aprobada por:

  
-----  
Presidente del Jurado  
Dc. Lewis S. McAnally Salas

  
-----  
Sinodal Propietario  
M.C. Guillermo Torres Moya

  
-----  
Sinodal Propietario  
Dc. Alfredo Salas Garza

  
-----  
Sinodal Suplente  
Dc. Enrique Valenzuela Espinoza

  
-----  
Sinodal Suplente  
Dc. Arturo Siqueiros Valencia

## AGRADECIMIENTOS

Al Oc. Lewis S. McAnally Salas por haber dirigido desde su inicio el desarrollo de éste trabajo

Al Oc. Enrique Valenzuela Espinoza por haberme permitido trabajar dentro del laboratorio de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

A cada uno de los sinodales de esta tesis que con sus críticas y sugerencias me auxiliaron para una mejor redacción de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por habernos permitido trabajar dentro de sus instalaciones, ya que sin esto, no se hubiera podido realizar esta tesis.

A mis compañeros de la generación XXV y demás amigos que de una u otra forma intervinieron en la realización de este trabajo.

A los señores Hugo Hernández L. y Martín Rosas M. encargados del Departamento de Informática.

## DEDICATORIA

Al esfuerzo y gran oportunidad que me brindaron mis padres  
Raúl y Alejandrina Raquel.

A mis hermanos:

Grizelda

Raúl Jr.

Plutarco

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	9
1.-ESTERILIZACION.....	9
2.-INOCULACION.....	10
3.-TANQUES DE CULTIVO.....	11
4.-PARAMETROS.....	11
5.-FASE EXPERIMENTAL PARA OBTENER LA DILUCION OPTIMA.....	14
6.-OBTENCION DE LA DILUCION OPTIMA (DX).....	16
6.1.-OBTENCION DE DX SEGUN MONOD (1950).....	16
6.2.-OBTENCION DE DX POR REGRESION POLINOMIAL.....	21
7.-EVALUACION ECONOMICA ENTRE LOS DOS SISTEMAS DE CULTIVO.....	21
RESULTADOS.....	22
1.-TEMPERATURA.....	22
2.-pH.....	22
3.-PARAMETROS POBLACIONALES.....	22
4.-DILUCION OPTIMA SEGUN MONOD(1950).....	28
5.-DILUCION OPTIMA CON LA REGRESION POLINOMIAL.....	29
6.-PRODUCCION COMPARATIVA.....	31

7.-EVALUACION ECONOMICA.....	36
DISCUSION.....	38
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
LITERATURA CITADA.....	48

## LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Diluciones experimentales y volumen de cosecha (litros/día) para <u>Monochytrium lutheri</u> .....	15
Tabla II.	Diluciones de los cultivos semicontinuos (%); Velocidad de crecimiento máximo en cada dilución y su promedio; Tiempo en equilibrio (T.E.); Tasa de crecimiento exponencial y su promedio (k); tiempo de generación en días (Tg) y concentración promedio en cultivo discontinuo y los semicontinuos (U cél./ml.).....	23
Tabla III.	Comparación de costos (dolares) y rendimientos en sistemas discontinuos y semicontinuos.....	33
Tabla IV.	Comparación de la estrategia de producción máxima en cultivos discontinuos y semicontinuos a nivel laboratorio durante 28 días.....	34

## LISTA DE FIGURAS

Fig.1.- Crecimiento del cultivo de Monochrysis lutheri en sus fases discontinua y semicontinua diluidas al 10, 20, 30 y 35%, con sus diluciones diarias a partir del sexto día. Tiempo en equilibrio(●—●)..25

Fig.2.- Crecimiento del cultivo de Monochrysis lutheri en sus fases discontinua y semicontinua diluidas al 40, 50, 60 y 70%, con sus diluciones diarias a partir del sexto día. Tiempo en equilibrio(●—●)..27

Fig.3.- Ajuste del modelo de Monod (1950) y la regresión polinomial con los datos experimentales de Monochrysis lutheri, donde el punto de inflexión en los modelos determinan la dilución óptima. Datos experimentales(▲).....30

## INTRODUCCION

El fitoplancton es la base en la cadena alimenticia de los océanos. Su cultivo en condiciones controladas por el hombre ha hecho posible su uso como alimento vivo de otros organismos acuáticos. En nuestro país ha sido utilizado en la alimentación de larvas de moluscos, crustáceos, rotíferos y peces (De la Cruz, 1985).

El gran interés en el incremento de la propagación de moluscos y crustáceos para consumo humano, ha creado la necesidad de desarrollar sistemas más eficientes para abastecer de alimento a estos invertebrados. Como estos métodos son comúnmente practicados, requieren de una extensiva labor para la producción de microalgas (Palmer et al., 1975).

El método más tradicional es el cultivo discontinuo ó "estático", el cual parte de inocular las células en un recipiente con medio de cultivo, el cual permite su desarrollo hasta su máximo crecimiento, para después cosecharse totalmente (Droop, 1966 ; Guillard, 1972).

Otros dos métodos de cultivo de microorganismos son los continuos y semicontinuos que han sido hasta la fecha técnicas de gran importancia. Se han venido desarrollando desde la tercera década para uso principalmente en microbiología y su aplicación para cultivo de microalgas está aún perfeccionándose para algunas especies (Droop, 1975).

Un cultivo continuo, es un sistema en el cual la población de microalgas se encuentra en un volumen constante cerca ó en el estado de equilibrio, el que se establece por la continua adición de medio de cultivo y su recuperación proporcional como cosecha (Fencel, 1966; Hemerick, 1973). Un sistema de cultivo semicontinuo se diferencia del cultivo continuo por la remoción a intervalos de tiempo regulares de un volumen determinado de medio de cultivo y se reemplaza por medio nuevo para mantener el volumen original (Fencel, 1966; Ukeles, 1973).

La necesidad de producción masiva de microalgas como alimento para filtroalimentadores, larvas de peces marinos, ó para el cultivo de invertebrados usados como alimento para larvas de peces, ha promovido el desarrollo de sistemas de cultivos continuos y semicontinuos. Estos

sistemas pueden servir como base para inocular grandes volúmenes de cultivo (de 100 litros a varios metros cúbicos), o para ser utilizados directamente (Trotta, 1981).

Para establecer cultivos de microalgas en altas densidades, es necesario proporcionarles los factores ambientales esenciales en niveles óptimos (luz, temperatura, salinidad y nutrientes orgánicos e inorgánicos) para las especies cultivadas (Trotta, 1981; Alfonso y Nuñez, 1985). Para optimizar los sistemas es importante tomar en cuenta el tamaño y configuración de los recipientes de cultivo (Trotta, 1981). ↗ Los recipientes más frecuentemente usados para el cultivo son esféricos ó cilíndricos, de plástico y de polietileno. Todos estos proporcionan una máxima transparencia, paredes lisas y condiciones no tóxicas que facilitan la producción eficiente en condiciones de cultivo (Trotta, 1981).

## ANTECEDENTES

Para la realización de cultivos de microalgas se han aprovechado las técnicas de esterilización, manipulación y siembra usadas en bacteriología a partir del aislamiento de las especies (Pringsheim, 1946).

→ Algunos aplicaciones y aspectos teóricos de cultivos masivos de microalgas se tienen en cuenta en varios trabajos (Ukeles, 1965; Fencel, 1966 y Golman, 1978). Estos cultivos de gran escala se han llevado a cabo en los tres tipos de sistemas; discontinuos, continuos y semicontinuos (Golman, 1979a, 1979b; Soeder, 1980 en Marshall, 1987).

Investigaciones que se han hecho con la microalga Monochrysis lutheri en cultivos continuos, han sido realizadas para estudiar la limitación de nutrientes (Droop, 1967 y 1974), efectos tóxicos (Sunda y Lewis, 1978), efectos de temperatura para el crecimiento (Ukeles, 1961; Golman, 1979) y su producción masiva (Palmer et al., 1975).

→ Ukeles (1965) trabajó con un medio de agua de mar artificial en cultivos continuos masivos en el exterior, con tanques de fibra de vidrio de 280 litros, utilizó Monochrysis lutheri; donde obtuvo buenos resultados durante

su crecimiento por 10 días y usandolo como alimento para juveniles de ostiones y almejas.

En la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California (U.A.B.C.) y en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la U.A.B.C., se han venido realizando experimentos referentes a cultivos discontinuos, continuos y semicontinuos, desde volúmenes de pequeña escala hasta recipientes que alcanzan magnitudes de 1000 litros. Granados y Buckle (1984) trabajaron con cultivos discontinuos, experimentaron con medio de cultivo preparado con biodigeridos de estiércol y Paniagua y Buckle (1985) con macrofitas marinas en volúmenes de 16 litros, comparandolos con el medio químico de Matthiessen y Turner (1966). Tradicionalmente en el I.I.O. se utilizaba unicamente el sistema discontinuo para el cultivo y producción de microalgas. Fue Cáceres en 1979 quien implementó un aparato de cultivo continuo con la microalga Monochrysis lutheri y controló la densidad con la intensidad de cosecha ó lavado. El sistema consistió de un tubo de plástico de 50 cm de longitud con 26 cm de diámetro como cámara de cultivo; el recipiente del medio de cultivo se compone de un tubo de plástico de 150 cm con el mismo diámetro y utilizó el F/2 de Guillard (1972) como medio de cultivo. Este cultivo fue mantenido a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C con iluminación constante y su condición fue

unialgal. Llevandolo al equilibrio mediante el desarrollo de un método de aproximación a la ecuación de Monod (1950). Obtuvo el valor de la dilución máxima de 0.45 vol/día y una producción de  $230 \times E9$  cél/semana en un volumen de 28 litros.

Parés y Leyva (1982) en base al trabajo que realizó Cáceres (1979), utilizaron el mismo principio básico, adaptaron el sistema para cultivo semicontinuo en bolsas de polietileno transparentes de 26 cm de diámetro, experimentaron con un volumen útil de 5 litros y utilizaron las microalgas Isocrysis galbana y Tetraselmis suecica. Mediante el modelo de Monod (1950), obtuvieron el valor de la dilución óptima de producción de Isocrysis galbana de 0.38 con una producción de  $2.9 \times E6$  cél/vol/día y para Tetraselmis suecica de 0.46 con una producción de  $4.46 \times E5$  cél/vol/día. La temperatura de estos cultivos fue mantenida a  $20 \pm 3^\circ C$  con iluminación de lámparas fluorescentes y condición unialgal.

Actualmente, en el laboratorio de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas se utiliza un sistema de cultivos discontinuos en 12 tanques de fibra de vidrio, con un volumen útil de cultivo de 385 litros c/u. Las demandas de alimento en cantidad y calidad, hacen

necesario la búsqueda de alternativas para incrementar y optimizar la producción. A pesar de la gran diferencia en volumen y características del recipiente, una alternativa que se plantea es la implementación de cultivos de microalgas en sistemas semicontinuos en este laboratorio de producción. (Badillo Castro 1989)

## OBJETIVOS

\* Determinación de la dilución óptima en cultivos semicontinuos con Monochrysis lutheri en tanques de 400 litros.

\* Comparar costos y rendimientos en los sistemas de cultivo discontinuo y semicontinuo.

## MATERIALES Y METODOS

Esta investigación se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Cultivos Anexos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Se obtuvo la cepa de Monochrysis Lutheri del mismo laboratorio, y se cultivo con el medio F/2 de Guillard (1974). Las condiciones de temperatura que se tuvieron en el cuarto de cultivo durante el desarrollo del experimento fue entre los 18 y 20 °C.

### 1.-ESTERILIZACION

La esterilización de los matraces Erlenmeyer con 75 ml de medio de cultivo se realizó en una autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 15 min (Guillard, 1974), posteriormente se le agregaron las vitaminas previamente esterilizadas a cada uno de los matraces.

Los garrafones de 20 litros se desinfectaron mediante un método químico (Pruder y Bolton, 1978). Primeramente se le añade al recipiente 0.2 ml de cloro comercial por cada litro de agua de mar, dejandola reposar 24 horas. Después se retira agua del recipiente hasta dejar 16 litros, añadiendole 0.01 gr de tiosulfato de sodio por cada litro

de agua de mar por 2 horas con aireación para neutralizar la acción del cloro

La esterilización del agua que se utilizó en el llenado de los tanques requirió de filtros de cartucho (3 y 1 micras) y un sistema de luz ultravioleta mod H-50 (Hamilton, 1973).

## 2.-INOCULACION

Después de la esterilización de los matraces Erlenmeyer se agregaron las vitaminas y se realizaron las inoculaciones. Cada uno de los matraces fue inoculado con 3 ml de cepa en una atmósfera aséptica. Posteriormente se colocaron en un campo de iluminación con lámparas fluorescentes de luz fría con intensidad de 1.008 watts/m<sup>2</sup>.

Al término de 7 días de crecimiento en los matraces se transfirieron las microalgas a garrafrones previamente esterilizados; el procedimiento efectuado fue el siguiente: se suministraron nutrimentos, vitaminas y la inoculación de 3 matraces Erlenmeyer por garrafón bajo condiciones asépticas. Aquí se inició el suministro de aire a razón de 7.5 litros/min.

Después de 10-15 días de cultivo las microalgas alcanzaron su máxima densidad y se transfirieron a tanques con capacidad de 400 litros.

El llenado de los tanques fué con agua de mar irradiada con luz ultravioleta a flujo lento. Posteriormente se inoculó cada tanque con un garrafón, añadiéndole los nutrientes y vitaminas necesarias.

### 3.-TANQUES DE CULTIVO

Los recipientes que se utilizaron fueron tanques de fibra de vidrio de 1.26 metros de diámetro por 40 cm de profundidad, con un volumen utilizable de 385 litros y 19300 cm<sup>2</sup> de exposición a la luz. Se instaló un tubo de vidrio en el centro del tanque para el suministro de aire a un flujo de 15 litros/min, para tener así una mejor homogenización en el cultivo, distribución de nutrientes y favorecer la exposición de las microalgas a la luz. En la parte central superior de cada uno de los tanques se encuentra una fuente de luz de 500 watts a una distancia de 12 cm, en donde su intensidad luminica fue de 236 watts/m<sup>2</sup>.

### 4.-PARAMETROS

Se llevaron registros diarios de la concentración de

cél/ml con la ayuda de un espectrofotómetro Hatch (dr/2) a una longitud de onda de 675 nm, así como registros de temperatura en cada uno de los tanques y de pH con un potenciómetro Fisher mod 156.

Los parámetros poblacionales estimados fueron: la velocidad de crecimiento máximo ( $\mu_m$ ) la cual se utilizó como lo establece el modelo de Monod (1950) para la obtención de la dilución óptima; tasa de crecimiento exponencial (k), tasa de crecimiento (K) y el tiempo de generación (Tg).

a) La velocidad de crecimiento máximo ( $\mu_m$ ) es cuando el material celular alcanza su máximo crecimiento en el cultivo y se obtiene con el logaritmo natural de las concentraciones de células, que se determinan en la fase exponencial de su crecimiento según la ecuación de Guillard (1973):

$$\mu = \frac{1}{t_2 - t_1} \left( \ln \frac{X_2}{X_1} \right) \quad \text{Donde:}$$

$\mu$  = Velocidad de crecimiento

máximo.

X1=Logaritmo natural de la  
concentración de células  
al tiempo t1.

X2=Logaritmo natural de la  
concentración de células  
al tiempo t2.

b) La tasa de crecimiento exponencial (k) y tasa de crecimiento (K) es la proporción de material celular duplicado en el intervalo de tiempo y se calcula según Guillard (1973); donde la diferencia entre las dos tasas es que k se calcula cuando se encuentra en la fase exponencial del cultivo discontinuo y la K se puede calcular para cualquier momento del cultivo:

3.322

$k, K = \frac{3.322}{t_2 - t_1} (\log N_2 / N_1)$

t2 - t1

Donde:

3.322=Factor de conversión del  
logaritmo base 2 a base  
10 (3.322=log<sub>2</sub> 10)

N1=Concentración celular al  
tiempo t1

N2=Concentración celular al  
tiempo t2

c) El tiempo medio de generación (Tg) es el tiempo que tarda en duplicarse un cultivo y se determina como lo recomienda Eppley y Strickland (1968):

$$Tg = \frac{\log_2 (T2 - T1)}{\log N2 - \log N1} = \frac{\log_2}{K}$$

##### 5.-FASE EXPERIMENTAL PARA OBTENER LA DILUCION OPTIMA

Para la obtención de la dilución óptima de Monochrysis lutheri se colocaron 3 tanques, cada uno con su réplica respectivamente. Se mantuvieron hasta el sexto día como cultivo discontinuo después del cual se iniciaron las diluciones correspondientes que se presentan en la tabla I, donde se muestra el volumen de cosecha, equivalente al agua

de mar con medio de cultivo añadido para recuperar el volumen original. A cada par de tanques se les asignó una dilución, la cual fue llevada a cabo diariamente hasta que se colapsó el cultivo.

Tabla I.- Diluciones experimentales y volumen de cosecha (litros/día) para Monochrysis lutheri.

Diluciones(%)	Cosecha Litros/día
10	38
20	77
30	115
35	135
40	154
50	192
60	231
70	269

Durante las diluciones se registraron las concentraciones de cél/ml antes y después de cada dilución, para saber la recuperación diaria a las diferentes

diluciones.

## 6.-OBTENCION DE LA DILUCION OPTIMA (DX)

La dilución se determinó de dos maneras, por medio de la ecuación de Monod (1950) y mediante un análisis de una regresión polinomial.

### 6.1.- OBTENCION DE DX SEGUN MONOD (1950)

Con los valores de la velocidad de crecimiento máximo ( $\mu_{max}$ ) y el promedio obtenido de cada dilución; es posible calcular las constantes A y B que nos permitirán obtener la dilución óptima de acuerdo a la metodología de Monod (1950):

$$X = \frac{A \cdot B}{C - D}$$

Donde:

X= Densidad de la población de microalgas expresado en número de células por unidad de volumen.

D= Dilución del sistema expresado por día; numericamente igual al valor del porcentaje del volumen total del recipiente sustituido, expresado en cifras decimales.

A= Constante que involucra la producción y concentración en la entrada del sustrato limitante.

B= Constante que involucra a la producción y la constante de saturación.

C= Constante; valor de la velocidad de crecimiento máximo ( $\mu_m$ ) para la especie de microalga usada. Calculada de acuerdo a la metodología descrita por Guillard (1973).

Mediante mínimos cuadrados es posible obtener las constantes A y B.

Al usar los datos experimentales para obtener la minimización de cuadrados se obtiene que:

$$E(A,B) = \sum_{i=1}^n \left( X_i - \frac{A - B D_i}{C - D_i} \right)^2 \quad (2)$$

Posteriormente esta ecuación (2) es derivada parcialmente con respecto a A y luego con B, para obtener

dos ecuaciones simultaneas que permiten estimar las dos constantes anteriores de lo cual resulta que:

$$\frac{\partial E}{\partial A} = 2 \sum_{i=1}^n \frac{D_i}{C-D_i} [X_i - (A - B \frac{D_i}{C-D_i})] \quad (3)$$

$$\frac{\partial E}{\partial B} = 2 \sum_{i=1}^n \frac{D_i}{C-D_i} [X_i - (A - B \frac{D_i}{C-D_i})] \frac{D_i}{C-D_i} \quad (4)$$

Al simplificar, tenemos:

$$\frac{\partial E}{\partial A} = \sum_{i=1}^n X_i - nA + B \sum_{i=1}^n \frac{D_i}{C-D_i} \quad (5)$$

$$\frac{\partial E}{\partial A} = \sum_{i=1}^n \frac{D_i}{C-D_i} X_i - A \sum_{i=1}^n \frac{D_i}{C-D_i} + B \left( \frac{D_i}{C-D_i} \right)^2 \quad (6)$$

Se tiene :

$$S1 = \sum_{i=1}^n X_i$$

$$S3 = \sum_{i=1}^n X_i \frac{D_i}{C-D_i}$$

$$S2 = \sum_{i=1}^n \frac{D_i}{C-D_i}$$

$$S4 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{D_i}{C-D_i} \right)^2$$

Al sustituir en las ecuaciones (5) y (6) e igualando a cero se obtiene:

$$S1 - NA + BS2 = 0 \quad (7)$$

$$S3 - AS2 + BS4 = 0 \quad (8)$$

Estas ecuaciones (7) y (8) se resuelven por determinantes y se obtiene A y B como:

$$A = \frac{S_2 S_3 - S_1 S_4}{S_2 - N S_4}$$

$$B = \frac{N S_3 - S_2 S_1}{S_2 - N S_4}$$

Estos valores de A y B se sustituyen en la ecuación(1) y se multiplica por D lo que nos indica la producción del sistema:

$$DX = D \left( \frac{A-B}{C-D} \right) \quad (9)$$

La dilución óptima se obtiene al derivar esta última ecuación con respecto a D e igualando a cero, estimación que representa el máximo de la función DX. Así, el valor de dilución que corresponde a la máxima producción es la dilución óptima (Cáceres, 1979; Parés y Leyva, 1982).

## 6.2.-OBTENCION DE DX POR REGRESION POLINOMIAL

Los valores de concentración que se obtuvieron para cada dilución, se analizaron por medio de una regresión polinomial de segundo grado, donde el punto de inflexión de la curva corresponde a la dilución óptima para esta especie.

## 7.-EVALUACION ECONOMICA ENTRE LOS DOS SISTEMAS DE CULTIVO

Se obtuvieron costos del medio que se utilizó (F/2); basandose en la cotización que hacen los laboratorios de Sigma (1988) al tipo de cambio actual(\$1.00 Dlls.X\$2,300 M.N.).

Posteriormente se hicieron comparaciones de costos entre el cultivo discontinuo y semicontinuo; para poder saber el costo de la producción de células.

Al considerar la capacidad instalada del laboratorio de microalgas se diseñaron estrategias de producción discontinua y semicontinua, estableciendose un ciclo de 28 días para su evaluación.

## RESULTADOS

### 1.-TEMPERATURA

Durante el desarrollo de este trabajo la temperatura promedio en la etapa del cultivo discontinuo fue de 22°C, con una mínima de 18.0°C y una máxima de 23.7°C. En tanto que en la etapa de las diluciones la temperatura promedio fue de 21°C, con una mínima de 17.8°C y una máxima de 23°C.

### 2.- pH

Durante la etapa de los cultivos semicontinuos el pH tuvo un promedio general de 8.3; con una mínima de 7.8 y una máxima de 8.9 durante todas las diluciones.

### 3.-PARAMETROS POBLACIONALES

La velocidad de crecimiento máximo que alcanzaron los cultivos durante la fase exponencial para cada una de las diluciones con que se trabajó, se muestran en la tabla II. Donde el promedio de la velocidad de crecimiento máximo fue de 0.44 divisiones/día, que es el valor que se utilizó dentro de la ecuación de Monod (1950) como la constante C.

TABLA II.-Diluciones de los cultivos semicontinuos (%); Velocidad de crecimiento máximo en cada dilución y su promedio; Tiempo en equilibrio (T.E.); Tasa de crecimiento exponencial y su promedio (k); Tasa de crecimiento en tiempo en equilibrio (K); tiempo de generación en días (Tg) y concentración promedio en cultivo discontinuo y los semicontinuos (I) cel./ml.).

CULTIVOS	DILUCIONES (%)	VELOCIDAD CREC. MAX.	T.E.	TASA CRECI. EXPONEN. (k)	TASA CRECIMIE. (K)	Tg(días)	I) cel./ml
DISCONTINUO	-	-	-	0.56	-	1.60	1,455,884
SEMICONTINUOS	10	0.35	10	0.51	0.04	5.60	2,071,409
	20	0.53	12	0.76	0.07	3.12	1,689,066
	30	0.36	3	0.52	0.20	2.30	1,069,210
	35	0.44	13	0.75	0.34	1.033	1,343,238
	40	0.40	7	0.57	0.50	0.635	1,417,346
	50	0.66	6	0.69	0.68	0.443	1,036,001
	60	0.47	6	0.60	0.80	1.987	809,667
	70	0.34	3	0.50	0.44	0.82	426,625
		$\bar{k}=0.44$		$\bar{k}=0.62$	$\bar{K}=0.66$		

El cultivo discontinuo alcanzó una concentración promedio de 1,455,884 cél/ml, la tasa de crecimiento exponencial promedio fue de 0.56 y el tiempo de generación promedio de 1.60 días (tabla II).

En la figura 1 se representa el crecimiento del cultivo discontinuo (primeros 6 días) y semicontinuo a una dilución del 10%. Se obtuvo una concentración de 2,071,409 cél/ml promedio durante los 10 días que duró en equilibrio, la tasa de crecimiento (K) fue de 0.04 y el tiempo de generación (Tg) de 5.60 días (tabla II).

La dilución del 20% (fig. 1), tuvo una concentración de 1,689,066 cél/ml, la cual se estabilizó hasta el onceavo día y duró en equilibrio 12 días, con una tasa de crecimiento (K) de 0.07 y el tiempo de generación (Tg) de 3.12 días (tabla II).

La dilución del 30%, tuvo un tiempo en equilibrio de 3 días, este lo alcanzó hasta el doceavo día (fig.1), donde tuvo una concentración de 1,069,210 cél/ml, con un tasa de crecimiento (K) de 0.20 y el tiempo de generación (Tg) de 2.30 días (tabla II).

En la figura 1 se representa el crecimiento alcanzado

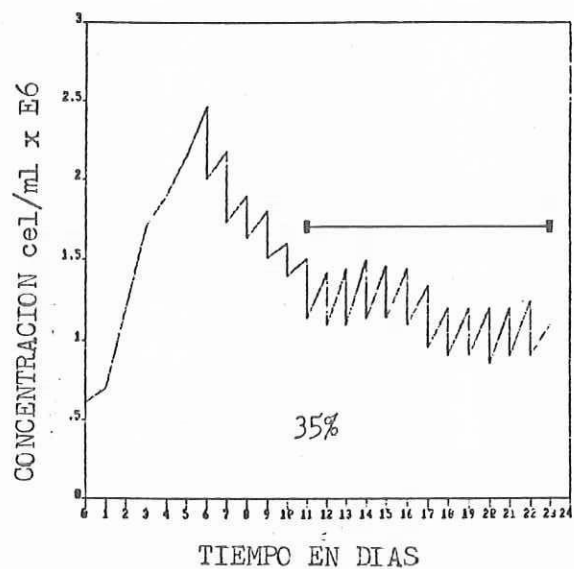
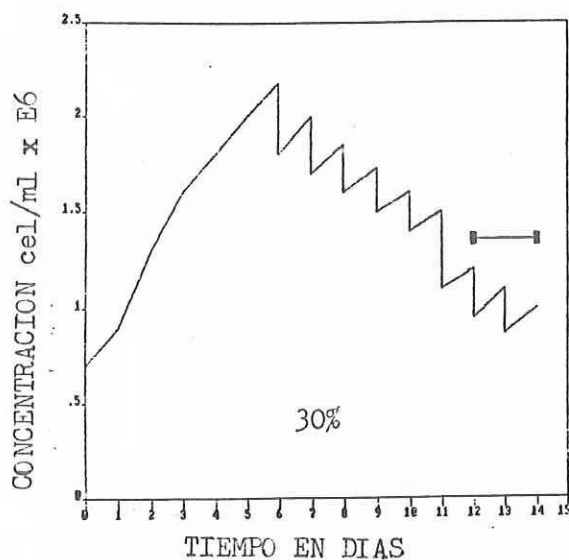
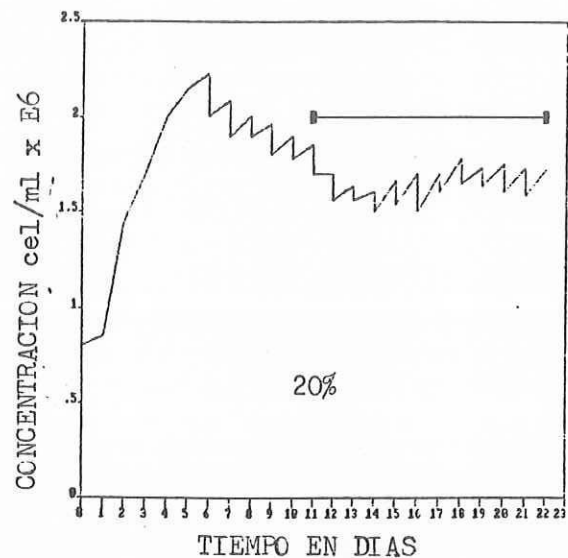
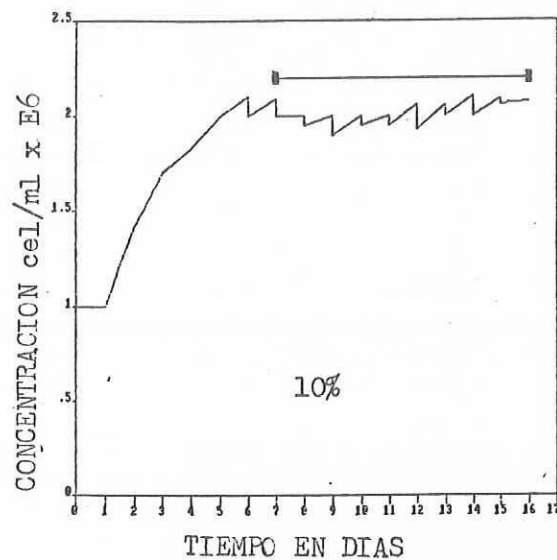


Fig.1.- Crecimiento de *Monochrysis lutheri* en sus fases discontinua y semicontinua diluidas al 10,20,30 y 35% con sus diluciones diarias a partir del sexto día. Tiempo en equilibrio (●—●).

en la dilución del 35%, este comenzó a estabilizarse hasta el onceavo día, con un tiempo en equilibrio de 13 días, con una concentración promedio de 1,343,238 cél/ml, la tasa de crecimiento (K) de 0.34 y el tiempo de generación (Tg) de 1.033 días (tabla II).

En la figura 2 se encuentra la dilución del 40%, esta comenzó a estabilizarse hasta el decimo día, su tiempo en equilibrio fue de siete días, con una concentración promedio de 1,417,346 cél/ml, la tasa crecimiento (K) de 0.50 y el tiempo de generación (Tg) de 0.635 días (tabla II).

La dilución del 50% que se representa en la figura 2 se estabilizó hasta el décimo día, donde se tuvo un tiempo en equilibrio de seis días, con una concentración de 1,036,001 cél/ml, obteniendose la tasa de crecimiento (K) de 0.68 y un tiempo de generación (Tg) de 0.443 días (tabla II).

En la figura 2 muestra la dilución del 60%, empezó a estabilizarse hasta el noveno día, obtuvo un tiempo en equilibrio de seis días, alcanzó una concentración promedio de 809,667 cél/ml, con una tasa de crecimiento (K) que fue de 0.80 y el tiempo de generación (Tg) 1.987 días (tabla

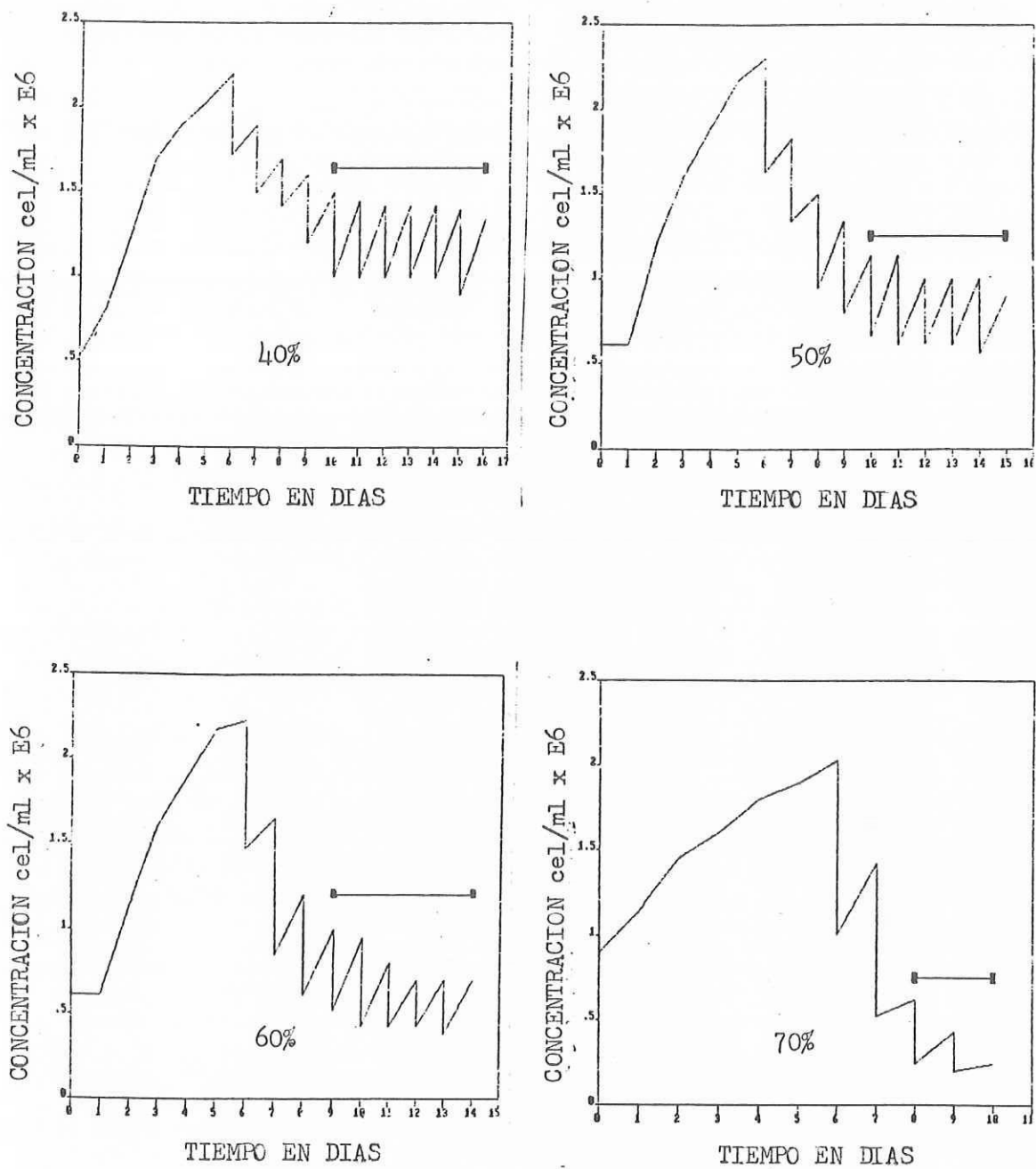


Fig.2.- Crecimiento de *Monochrysis lutheri* en sus fases discontinua y semicontinua diluidas al 40,50,60 y 70% con sus diluciones diarias a partir del sexto día. Tiempo en equilibrio (●—●).

II).

Por último la dilución del 70% (fig.2) empezó a estabilizarse hasta el octavo día, tuvo un tiempo en equilibrio de tres días, con una concentración promedio de 426,625 cél/ml, con una tasa de crecimiento (K) de 0.44 y el tiempo de generación (Tg) de 0.82 días (tabla II).

En los valores obtenidos durante la etapa del cultivo discontinuo la tasa de crecimiento exponencial (k) promedio para todas las diluciones fue de 0.62, con una mínima de 0.50 y una máxima de 0.76 (tabla II).

#### 4.-DILUCION OPTIMA SEGUN MONOD (1950)

Mediante la minimización de cuadrados se obtuvieron los valores de 1.22 para la constante A y 0.038 para la constante B. Con estas constantes, se sustituyen los valores obtenidos en la ecuación (9) y al multiplicar esta ecuación por D, se obtuvo la ecuación que nos define la producción del sistema:

$$DX = \frac{1,22 D - 0,038 D^2}{0,44 - D}$$

La ecuación de segundo grado nos define una parábola no simétrica (fig.3) donde el punto de inflexión es la dilución óptima:

$$F(DX) = 1,26 D - 1,103 D^2 + 0,24$$

Por último se resolvió esta ecuación por medio de la ecuación general, para obtener así la dilución óptima, y se tomó el valor negativo de la raíz de acuerdo a Cáceres (1979); obteniéndose un valor de dilución óptima de:

$$D = 0,40 \text{ vol./día}$$

##### 5.- DILUCION OPTIMA MEDIANTE LA REGRESION POLINOMIAL

Con los valores de las diluciones y las concentraciones promedio, mediante la regresión polinomial se obtuvo la siguiente ecuación de segundo grado:

$$Y = (-0,08839) + (2,523) * X + (-2,716) * X^2$$

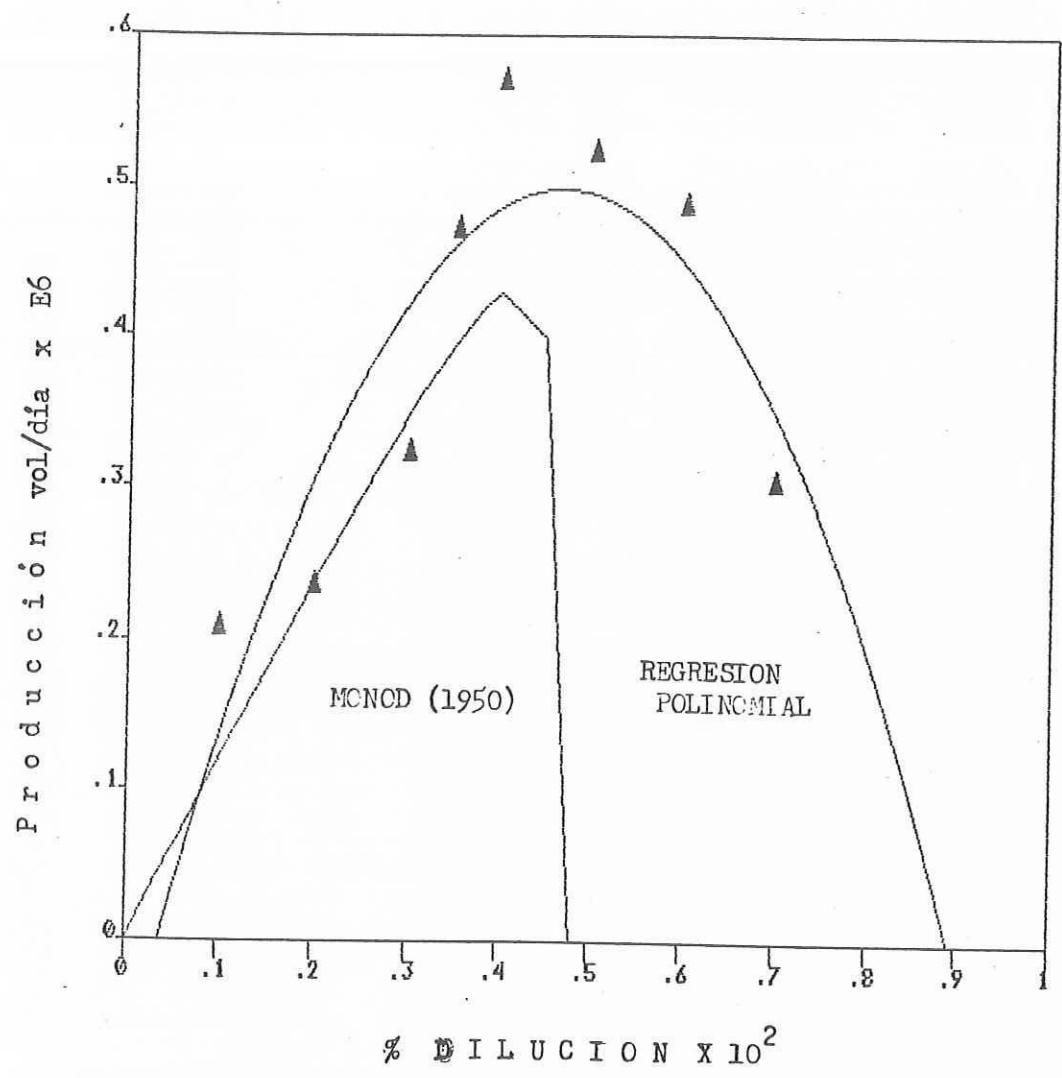


Fig.3.- Ajuste del modelo de Monod (1950) y la regresión polinomial con los datos experimentales de Monochrysis lutheri, donde el punto de inflexión en los modelos determinan la dilución óptima. Datos experimentales (▲).

Esta ecuación muestra una parábola simétrica (fig.3), donde el punto de inflexión corresponde a la dilución óptima, de 0.45 vol/día.

#### 6.-PRODUCCION COMPARATIVA

Se hicieron comparaciones de costos y rendimientos en los dos sistemas a los 6 y 10 días. Para comparar con los 6 días del cultivo discontinuo se tomaron 6 días del tiempo en equilibrio del cultivo semicontinuo de la dilución óptima (40%). Los 10 días se evaluaron debido a que el cultivo semicontinuo (40%) tiene una duración de 10 días. Se obtuvieron también costos totales de producción, para evaluar la producción total en los sistemas (tabla III).

La producción que se tuvo en el cultivo discontinuo que se cosecha al sexto día fue de 385 litros totales, su concentración promedio fue de 1,455,884 cél/ml, por lo que se obtuvo una producción de 5.6 X E11 células totales (tabla III).

En tanto la producción que se obtuvo en la dilución óptima del 40% durante su tiempo en equilibrio; tomándose solamente 6 días; se cosechó un total de 1309 litros, con una concentración promedio de 1,429,507 cél/ml y una producción final de 18.7 X E11 células totales, que es

3.34 veces más que en el cultivo discontinuo (tabla III).

La producción total que se obtuvo en la dilución óptima del 40% durante 10 días, desde el inicio hasta la última dilución (cosecha total), se obtuvo una cosecha de 1925 litros, con una concentración promedio de 1,504,507 cél/ml y una cantidad de células totales de  $28.9 \times E11$  (tabla III).

A nivel de todo el laboratorio de microalgas se diseñó una estrategia para obtener la producción máxima para los sistemas discontinuos y semicontinuos.

Para el sistema discontinuo, la máxima producción se alcanzará mediante la inoculación de dos tanques diarios, hasta mantener el total de tanques en producción, lo cual permite la cosecha diaria de dos unidades, y no deja ningún tanque ocioso en producción. Durante 28 días de producción existe una cosecha máxima de 770 litros/día y una producción de 21560 litros/28 días. La producción celular sería equivalente a  $1.121 \times E12$  cél/día y una producción total de  $3.13 \times E13$  células (tabla IV).

Para el sistema semicontinuo, y para fines comparativos, se buscó establecer una estrategia de manejo que permitiera la cosecha diaria de un número estable de tanques. Se optó por formar cuatro grupos de 3 tanques

Tabla III.-Comparacion de costos (dolares) y rendimientos en sistemas discontinuos y semicontinuos, tomando 6 y 10 dias en el cultivo semicontinuo.

TIEMPO EN DIAS	CULTIVO	LITROS TOTALES	PROMEDIO cel./ml.	CELULAS TOTALES	COSTO DIARIO (dolares)	COSTO TOTAL (dolares)	COSTO <sup>11</sup> 1X10 cel.
6	DISCONTINUO	385	1,455,884	$5.6 \times 10^{11}$	\$ 0.155	\$ 0.93	\$ 0.16
6	SEMICONTINUO (40%)	1309	1,429,507	$18.7 \times 10^{11}$	\$ 0.28	\$ 2.61	\$ 0.14
10	SEMICONTINUO (40%)	1925	1,504,507	$28.9 \times 10^{11}$	\$ 0.28	\$ 3.73	\$ 0.13

Tabla IV.- Comparacion de la estrategia de produccion maxima en cultivos discontinuos y semicontinuos a nivel laboratorio durante 28 dias.

CULTIVO	COSECHA MAXIMA TANQUES/DIA	PROMEDIO MAX. LITROS/DIA	LITROS TOTALES	PROMEDIO cel/dia	CELULAS TOTALES	COSTO TOTAL
DISCONTINUO	2	770	21560	$1.121 \times 10^{12}$	$3.13 \times 10^{13}$	\$56.00
SEMICONTINUO (40%)	6	1047	29337	$1.612 \times 10^{12}$	$4.51 \times 10^{13}$	\$61.00
SEMICONTINUO (40%)	6-9	1617	45276	$2.224 \times 10^{12}$	$6.22 \times 10^{13}$	\$72.00

para realizar las inoculaciones lo que permitira cosechar constantemente 6 tanques diarios. Primero se realiza la inoculación del primer grupo, en el quinto día de su cultivo se inocular el segundo grupo, en el sexto día del segundo grupo se inocular un tercer grupo y por último el cuarto grupo se inocular en el quinto día de cultivo del tercer grupo. Al seguir esta rutina de inoculación, y al tener todos los tanques en producción, se obtiene una cosecha de 6 tanques/día, con una producción de 1047 litros /día y una producción de 29337 litros/28 días. Donde la producción celular sería de  $1.612 \times E12$  cél/día y una producción total de  $4.51 \times E13$  células (tabla IV).

Debido a que la estrategia anterior, aunque se cosechan diariamente 6 tanques, en algunos días del proceso productivo se quedan tanques osciosos, se buscó otra estrategia que minimizará los tanques osciosos, diseñandose una estrategia que permite la cosecha diaria de 6 a 9 tanques, que dependen del ciclo productivo. Así, a cuatro días de inoculado el cultivo del primer grupo se inocular el segundo grupo y durante el cuarto día de cultivo se inocular el tercer grupo, y después del cuarto día se inocular el cuarto grupo, para reiniciar el ciclo nuevamente. Así, con esta estrategia después de que se obtienen todas las inoculaciones en los 12 tanques, se comienza a obtener la producción máxima. Durante el tiempo de 28 días se obtiene

una cosecha máxima de 6 a 9 tanques/día, con una producción máxima promedio de 1617 litros/día y una producción de 45276 litros/28 días. Se obtuvo así una producción celular de  $2.224 \times E12$  cél/día y una producción total de  $6.22 \times E13$  células (tabla IV).

## 7.-EVALUACION ECONOMICA

Una vez efectuado el trabajo se evaluaron los sistemas de cultivos discontinuos y semicontinuos. Donde el cultivo discontinuo tuvo un costo económico de \$2139.00 M.N. (\$0.93 Dlls.) por seis días de duración. Para el cultivo semicontinuo con la dilución óptima (40%) los primeros seis días fué similar su costo al del cultivo discontinuo. Posteriormente los primeros seis días de dilución tuvieron un costo de \$3864.00 M.N. (\$1.68 Dlls.), su costo diario por dilución en estos seis días fue de \$644.00 M.N. (\$0.28 Dlls.) y el costo total del cultivo semicontinuo en los doce días fue de \$6000.00 M.N. (\$2.61 Dlls.). En cuanto, a la producción que se obtuvo en los diez días en el cultivo semicontinuo, el costo total fue de \$8579.00 M.N. (\$3.73 Dlls) (tabla III).

El costo que se tiene al producir  $1 \times E11$  células en un cultivo discontinuo es de \$368.00 (\$0.16 Dlls.) en un

periodo de 6 días. Mientras que en el cultivo semicontinuo producir 1XE11 células tiene un costo de \$322.00 (\$0.14 Dlls.) durante sus 6 días de dilución con un 15% menos en costos que el cultivo discontinuo. El costo que se tiene para producir la misma cantidad de células en el cultivo semicontinuo de 10 días, es de \$299.00 M.N. (\$0.13 Dlls.), equivalentes al 20% menos en costo que el cultivo discontinuo (tabla III).

Para la estrategia del sistema discontinuo al termino del tiempo establecido (28 días) se tendría un costo total de \$128,800.00 M.N. (\$56.00 Dlls.) en la producción máxima, mientras que la estrategia del sistema semicontinuo al cosechar 6 tanques diarios en su máxima producción tendría un costo total de \$140,300.00 M.N. (\$61.00 Dlls.), que es un 20% menos en costos que la estrategia que se tiene para el sistema discontinuo. La estrategia que permite la cosecha diaria de 6 a 9 tanques diarios tendría un costo total de \$165,000.00 M.N. (\$72.00 Dlls.) en la producción máxima, lo que representa un 30% menos en costo económico en comparación de la estrategia del sistema discontinuo (tabla IV).

## DISCUSION

El pH no fue un factor limitante para el crecimiento de los cultivos, éste se mantuvo estable dentro de los intervalos reportados como óptimos en todas las diluciones, probablemente debido al porcentaje de medio de cultivo añadido cada 24 horas. Humbrey (1975) y Colman (1976) reportan que numerosas especies de microalgas marinas son incapaces de tolerar valores de pH mayores de 9.5. Así mismo Kain y Fogg (1958 a, b), Hayward (1968) y Humbrey (1975) reportan que en el rango de pH de 8.1 y 8.3 se encuentra el crecimiento óptimo de las microalgas en el agua de mar.

En el trabajo efectuado, las diluciones del 20%-35% fueron semejantes en sus concentraciones a las que obtuvo Ukeles (1965). Su trabajo lo desarrolló en recipientes de fibra de vidrio con capacidad de 280 litros donde obtuvo buenos resultados durante 10 días de cultivo continuo y alcanzó concentraciones de hasta  $1.9 \times 10^6$  cél/ml con una cosecha de 60-100 litros/día, equivalentes a diluciones del 21%-36%.

Los recipientes utilizados en este trabajo tienen

características que los hacen estar en desventaja con los recipientes cilíndricos transparentes de polietileno ó con las columnas de fibra de vidrio transparentes en relación a los parámetros físicos, y esto afecta por consiguiente el crecimiento del cultivo de microalgas. Droop (1969) y Ukeles (1976) mencionan que este tipo de recipientes son poco eficientes, debido a que poseen un fondo plano que provoca : dificultades en la homogenización , promueve la sedimentación y la iluminación que no es homogénea, y todo esto repercute en un bajo rendimiento del sistema.

La intensidad de dilución tuvo una marcada influencia sobre la tasa de crecimiento. Esto se relaciona con las características encontradas por Sorokin (1973), en donde las microalgas presentan ciertas fases de crecimiento en un cultivo discontinuo. Así, las condiciones encontradas durante la fase estacionaria están favorecidas para las diluciones bajas del 10% y 20% en donde su densidad es alta, hay poca penetración de luz, baja concentración de nutrimentos y esto provoca sedimentación, debido principalmente a que se obtiene poca cosecha y el volumen añadido es bajo, lo que ocasiona que las microalgas más viejas que no han sido cosechadas queden sedimentadas en el fondo. Fencel (1966) menciona que la causa de mortalidad en un sistema de cultivo, son las altas concentraciones de metabolitos en recipientes con altas

concentraciones de microalgas. Sin embargo, Marshall (1987) considera que a penetración de luz muy baja la tasa de respiración de las células es igual a la tasa bruta de fotosíntesis, lo cual provoca que las células detengan su crecimiento y estas se mantengan equilibradas en un intervalo de crecimiento, donde este equilibrio corresponde a la mortalidad de microalgas viejas y la reproducción de microalgas nuevas.

Las condiciones del cultivo mejoraron en las mayores diluciones hasta alcanzar las condiciones óptimas de crecimiento en la fase exponencial. En las cosechas del 40% al 60% las tasas de crecimiento ( $K$ ) tuvieron un valor promedio de 0.66, lo que indicó la similitud al promedio obtenido de las tasas de crecimiento exponencial ( $k$ ), que fue de 0.62, esto demuestra que las condiciones de luz y la incorporación de medio de cultivo nuevo favorecieron el crecimiento exponencial de las microalgas. Lo que hace creer en base a los resultados, que estas diluciones en su tiempo en equilibrio tienen un comportamiento exponencial, esto mismo lo menciona Sorokin (1973) en la fase exponencial de un cultivo discontinuo.

Ahora bien las condiciones para la dilución mayor del 70%, la cuál presentó una alta penetración de luz y

alta concentración de nutrientes, no fueron favorables, ya que en esta dilución se presentó una mayor cosecha en el recipiente, quedándose con poca concentración de microalgas, lo que provocó que el cultivo no tuviera una recuperación adecuada. Es posible que la alta iluminación en el cultivo, haya provocado inhibición en las microalgas y por consiguiente pudo presentarse el retardamiento del cultivo. Sorokin (1973) hace mención a este tipo de retardo en los cultivos discontinuos. Investigadores como Belay y Fagg (1978) mencionan que la inhibición parece que se debe a una fotooxidación de las reacciones tanto fotoquímicas como enzimáticas y esta inhibición aumenta más con las exposiciones prolongadas a altas intensidades de luz y altas concentraciones de nutrientes, condiciones que presentó la dilución del 70% en el trabajo efectuado.

El ajuste que presentó el modelo de Monod (1950) a los datos experimentales de las diluciones del 40% y menores se consideró bueno, en cambio para las diluciones mayores del 40% el modelo se desvió ampliamente de los datos experimentales. Esta desviación encontrada en las diluciones mayores es una característica semejante a la reportada por Parés y Leyva (1982) en su trabajo con Isocrysis galbana. Ellos suponen que esto se debió a que el tratamiento de los datos fue hecho en base a la teoría

de cultivos continuos y no en base a la teoría de cultivos semicontinuos.

El ajuste que presentó el modelo de Monod (1950) a los datos experimentales (fig.3) se debió a la baja velocidad de crecimiento máximo que se obtuvo en los tanques y éste, comparado con la que obtuvo Cáceres (1979) del 0.87 es relativamente bajo. Sin embargo, es de esperarse que si se hubiesen tenido recipientes con las características de los utilizados por Cáceres (1979) ó Parés y Leyva (1982) el ajuste del modelo habría sido mejor al obtenido, esto debido en parte, a que los recipientes no presentaron ciertas condiciones factibles para el crecimiento del cultivo.

A pesar de que los dos modelos tuvieron un buen ajuste, la utilización de una regresión polinomial (fig. 4) para ajustar los datos experimentales no involucró factores biológicos, en cambio en el modelo de Monod (1950) los factores biológicos si fueron involucrados y la dilución óptima encontrada en éste modelo coincide con la dilución del 40% que es la de mayor producción. Sin embargo, como se obtuvo un buen ajuste en la regresión polinomial esto hubiera permitido su utilización en caso de que el modelo de Monod (1950) no tuviera ajuste alguno.

La densidad promedio que se obtuvo en el sistema semicontinuo (1,455,884 cél/ml) es menor en relación a lo que obtuvo Cáceres (1979) con el sistema continuo (9,000,000 cél/ml). Esta diferencia de rendimiento es atribuible a las diferentes características que tienen los sistemas de cultivo con que se trabajó, principalmente el tipo de recipiente que utilizó Cáceres (1979), ya que permite una mejor homogenización e iluminación comparado con los tanques utilizados en este trabajo. Es de esperarse que si se mejoran las condiciones de homogenización e iluminación en los tanques, sería factible incrementar la producción, aunque no necesariamente la dilución óptima.

Con las estrategias que se establecieron para tener una mayor capacidad de producción en las instalaciones del laboratorio de microalgas, la estrategia que se puede implementar para una producción homogénea es en la que se cosechan 6 tanques/día, ya que posee una mayor producción en células, volumen y un 20% menos en costos en comparación con la estrategia del cultivo discontinuo. Sin embargo, si una mayor producción es más importante que una producción homogénea, la estrategia que cosecha entre 6 y 9 tanques al día sería la adecuada.

En cuanto a la calidad de las microalgas se sabe que

en su fase exponencial un cultivo discontinuo se encuentra en condiciones óptimas, ya que al pasar esta fase de mejor desarrollo se presentan desventajas (mayor pH, altas concentraciones de metabolitos e incremento en la proporción de microalgas viejas sobre nuevas), lo que provoca posteriormente la descomposición y muerte de las microalgas. En cambio, un cultivo semicontinuo permite que sus diluciones promuevan un crecimiento exponencial y que las concentraciones de nutrientes, pH y concentración de metabolitos se mantengan constantes, asegurando así una mejor calidad en las propiedades fisiológicas de las microalgas.

Si se comparan a un nivel práctico los sistemas discontinuos y semicontinuos con toda la estanquería del laboratorio estos tendrían ventajas y desventajas. Los cultivos discontinuos requieren un fuerte respaldo de cultivos a niveles inferiores para las inoculaciones necesarias, esto implica un mayor esfuerzo comparado con los cultivos semicontinuos en los cuales se requiere tener más cuidado en la realización, ya que éstos, son más complejos.

Los cultivos semicontinuos permiten aminorar los efectos de colapsos prematuros de los tanques de cultivo, ya que con la estrategia establecida de 6 tanques/día si se

llegara a tener un colapso en uno de los tanques se tendría la pérdida del 17% de producción, en cambio para los cultivos discontinuos se perdería el 50% de la producción, lo que ocasionaría un grave problema si se requiere de una producción máxima diaria en el laboratorio.

## CONCLUSIONES

1.-La dilución óptima obtenida para la producción máxima en los cultivos semicontinuos en estos recipientes de 400 litros fue de 40% según el modelo de Monod (1950).

2.-Con la dilución del 40% se obtuvo un rendimiento mayor en producción en células comparado con el cultivo discontinuo.

3.-Con la implementación de las estrategias con la dilución óptima en cultivos semicontinuos para la producción máxima, se obtiene una cosecha de 6 tanques/día ó de 6-9 tanques/día, que es del 20% al 30% más que la estrategia del sistema discontinuo en producción de células.

4.-En lo que respecta a los costos, la dilución óptima obtenida presentó un 20% y 30% menos en las estrategias realizadas, al compararlas con los sistemas discontinuos.

## RECOMENDACIONES

1) Utilizar el sistema semicontinuo para la producción masiva de Monochrysis lutheri en el Laboratorio de Cultivos Anexos del I.I.O., y aplicar las estrategias planteadas

2) En la medida de lo posible, reemplazar los tanques de 400 litros por columnas transparentes cilíndricas de volumen similar.

3) Realizar análisis químicos de las microalgas cultivadas en sistemas semicontinuos y discontinuos para determinar la calidad nutricional de las mismas.

## LITERATURA CITADA

- Alfonso, E. y C. Nuñez 1985. Uso de nuevos fertilizantes para cultivar fitoplancton. Revista de Investigaciones Marinas, Vol. VI, No.1. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana.
- Belay, A. y Fogg, G.E. 1978. Photoinhibition of photosynthesis in Asterionella formosa (Bacillariophyceae). F. Phycol., 14, 341-347.
- Cáceres, C. 1979. Cultivo continuo de la microalga Monochrysis lutheri bajo condiciones rudimentarias. Ensenada B.C. Unidad de Ciencias Marinas. Tesis de Licenciatura 51 p.
- De la Cruz, A. 1985. Crecimiento de fitoplancton en cultivo bialgal. Revista de Investigaciones Marinas, Vol. VI, No. 2-3. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana.
- Droop, M.R. 1966. Vitamin B12 in marine ecology. III. An experiment with chemost. J. Mar. Biol.

- Ass. U.K. 46: 659-671
- Droop, M.R. 1967. Variable levels of nutrient requirement in a marine Chrysophyte. Rep. Challenger Soc. 3 XIX 1p.
- Droop, M.R. 1969. Algae. In: Methods In Microbiology. J.N. Norris and D.W. Ribbons (Eds.), Vol. 3B. London: Academic Press, p. 269-313.
- Droop, M.R. 1974. The nutrient status of algal cells in continuous culture. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 54, 825-855.
- Droop, M.R. 1975 b. The chemostat in mariculture. In: 10th European Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, 1: 17-23
- Eppley, R.W. y Strickland, J.D.H. 1968. Kinetics of marine phytoplankton growth. Adv. Microbiol. Sea. 14: 601-622.
- Fencel, L. 1966. Theoretical analysis of continuous culture systems. Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms, p. 69-153.
- Golman, J.C. 1976. Phytoplankton response to waste-water nutrient enrichment in continuous culture.

- J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Vol. 23, p. 31-43.
- Golman, J.C. 1978. Outdoor algal mass cultures-I. Applications. Water Research, Vol. 13. p. 1-19.
- Golman, J.C. 1979. Temperature effects on Steady-State growth, phosphorus uptake, and the chemical composition of a marine phytoplankter. Microbial Ecology 5: 153-166.
- Granados, C. y L.F. Buckle 1984. Cultivo de las microalgas Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. An. Inst. Cienc. del Mar Limnol. Univ. Nal. Autón. México, No. 11 Vol. 1: 241-256.
- Guillard, R.R.L. 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture Of Marine Invertebrates Animals. New York: Plenum, 409 p.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: Handbook Of Phycological Methods. Stein, J.R. (Ed.) London: Cambridge U. Press, p. 181-194.

- Guillard, R.R.L. 1974. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. p. 29-60. In: Culture Of Marine Invertebrates Animals. Smith, W.L. and M.H. Chanley (Eds.) Plenum Publishing Corp., New York. 338p.
- Hamilton, R.D. 1973. Sterilization. In: Handbook Of Phycological Methods. Stein, J.R. (Ed.) London: Cambridge U. Press, p. 181-194.
- Hayward, J. 1968. Studies on the growth of Phaeodactylum tricorutum. IV. Comparison of different isolates. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., Vol. 48, pp. 657-666.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. In: Handbook Of Phycological Methods. Stein, J.R. (Ed.) London: Cambridge U. Press, p. 255-266.
- Hemprey, G.F. 1975. The photosynthesis: respiration ratio of some unicellular marine algae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 18, pp. 111-119.
- Kainn, J.M. y G.E. Fogg. 1958 a. Studies on the growth of marine phytoplankton. I. Asterionella japonica Gran. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., Vol. 37, p. 397-413.

- Kainn, J.M. y G.E. Fogg. 1958 b. Studies on the growth of marine phytoplankton. II. Isachrysis galbana Park. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., Vol. 37, p. 781-788.
- Marshall, W. 1987. Biología De Las Algas. Factores Fisiológicos. Editorial Limusa, 236 p.
- Matthiessen, G.C. y Toner, R.C. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's County, Massachusetts. Marine Research Foundation, Edgartown, Mass., 138pp.
- Monod, J. 1950. La Technique de culture continue; théorie et applications. Ann. Inst. Pasteur 79, 390-410.
- Paniagua, J. y L.F. Bockle. 1985. Cultivo en condiciones controladas de Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con extractos de macrofitas marinas. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. No.12, Vol. 1:59-70.
- Palmer, F., Ballard, K. y Taub, F.A. 1975. A continuous culture apparatus for the mass production of algal. Aquaculture, 6: 319-331.

- Parés, G. y Leyva G. 1982. Cultivo semicontinuo de las microalgas Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica para uso como alimento de larvas y adultos de Mutilus californianus. Ensenada, B.C. Unidad de Ciencias Marinas. Tesis de Licenciatura. 57 p.
- Pringsheim, E.G. 1946. Pure Cultures Of Algae, Their Preparation And Maintenance. Great Britain, Cambridge University Press, 119 p.
- Pruder, G.D. y Bolton, E.T. 1978. System configuration and performance: Bivalve molluscan mariculture. Proc. of the ninth annual meeting World Mariculture Society, 747-759.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. p. 322-343. In: Handbook Of Phycological Methods. Stein, J.R. (Ed.) Ced Cambridge Univ. Press, London. New York, p. 289-376.
- Sunda, W.G. y Lewis J.M. 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, Monochrysis lutheri. Limnol. Oceanogr., 23(5), 870-876.

- Trotta, P. 1981. A simple and inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae. *Aquaculture*, 22: 383-387.
- Ukeles, R. 1961. The effect of temperature on the growth and survival of several marine algal species. *Biological Bulletin*, Vol. 120, No. 2, p. 255-264.
- Ukeles, R. 1965. A simple method for the mass culture of marine algae. *Limnol. Oceanogr.*, 10: 492-495.
- Ukeles, R. 1973. Continuous culture - A method for production of unicellular algal foods. p. 233-254. In: *Handbook Of Phycological Methods*. Stein, J.R. (Ed.) Ced Cambridge Univ. Press. London, New York. 348 p.
- Ukeles, R. 1976. Cultivation of unicellular plants In: *Marine Ecology*, Vol. III, Part. 1. London: Wiley, p. 367-466.