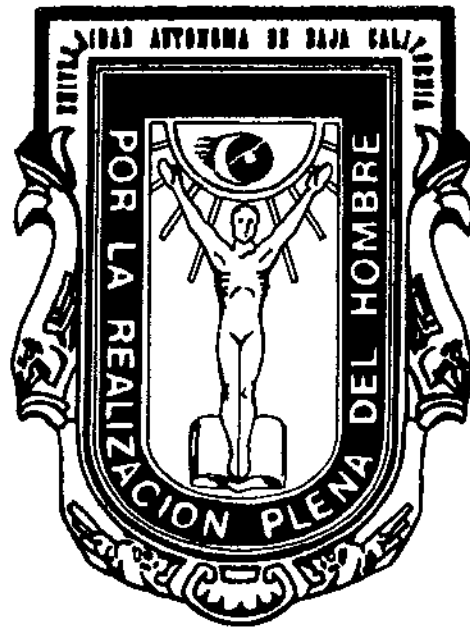
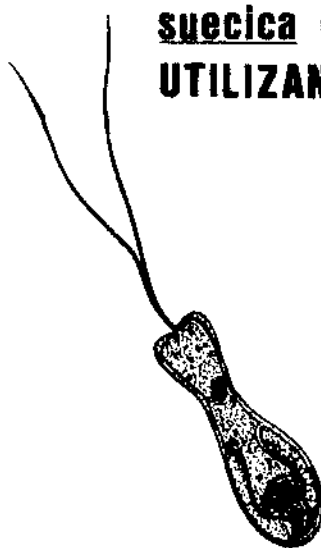


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS



CULTIVO MASIVO DE LAS MICROALGAS Tetraselmis suecica (Kyllin) Butch E Isochrysis galbana (Green) UTILIZANDO PRODUCTOS ORGANICOS BIODIGERIDOS.

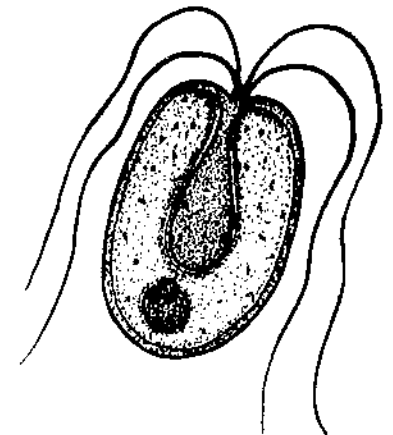


TESIS PROFESIONAL QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

JOSE LUIS BELLO LEON



ENSENADA, B.C.

DICIEMBRE DE 1987

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS

CULTIVO MASIVO DE LAS MICROALGAS Tetraselmis suecica
(KYLIN) Butch E Isochrysis galbana (Green) UTILIZANDO
PRODUCTOS ORGANICOS BIODIGERIDOS.

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA

JOSE LUIS BELLO LEON

APROBADO POR:



M.C. GORGONIO RUIZ CAMPOS

Presidente del Jurado



M.C. JOSE LUIS STEPHANO HORNEDO

Secretario



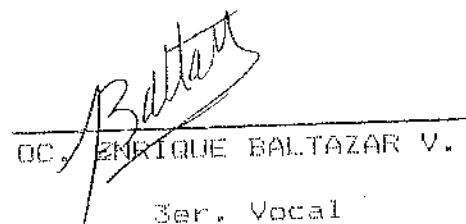
BIOL. EUSEBIO BARRETO E.

1er. Vocal



BIOL. WALTERIO GARCIA FRANCO

2do. Vocal



OC. ENRIQUE BALTAZAR V.

3er. Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al Oceanologo Enrique Baltazar por su disponibilidad incondicional para dirigir esta tesis, le agradezco la orientación y el apoyo que me brindó a lo largo de la elaboración de la misma.

Al Instituto de Investigaciones Oceanologicas (I.I.O.) por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y por las facilidades del material utilizado.

Al Doctor Fernando Buckle por su disponibilidad de escuchar y asesorar mis dudas.

A los sinodales por su colaboración desinteresada colmada de buenos consejos tendientes a lograr una mejor presentación del trabajo realizado.

Mis agradecimientos sinceros a la Oceanologa Evarista Arellano y al Biologo Eusebio Barreto quienes tuvieron la gentileza de asesorarme estadísticamente.

Al M.C. José Luis Stephano por sus acertadas criticas y orientaciones a quien admiro como ejemplo a la dedicación y tenacidad en la investigación.

Al Centro de Computo de la Escuela Superior de Ciencias
por permitirme realizar este escrito.

Mi reconocimiento al P.B. Lorenzo Meza por su valioso
asesoramiento en el procesamiento del escrito.

DEDICATORIA

A mi Madre quien gracias a su ejemplo, consejos y apoyo constante ha logrado realizar la formación plena de cada uno de sus hijos.

A mi Padre por su apoyo y ejemplo de buen hombre.

A mis hermanos

Con especial gratitud a mi tío Ruben

A mi tía Amalia

A mi Escuela

A mis amigos: Chuy, Ruben, Paty, Lupita y Lorenzo de quien tengo muy gratos recuerdos.

Y a ti Ana por haber estado siempre a mi lado ayudandome en los momentos difíciles de la tesis.

RESUMEN

Se realizó el cultivo masivo de Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana bajo condiciones controladas reemplazando la fuente de nutrientes convencionales con extractos líquidos biodigeridos aeróbicamente de estiércoles de vaca, de gallina y de la macroalga Macrocystis pyrifera en el medio de cultivo.

La técnica se resume en dos fases: enriquecimiento inorgánico (medio control) del Nivel Erlenmeyer al Nivel Carboy, y parte de este al Nivel Tanque con enriquecimiento orgánico.

El crecimiento de Tetraselmis suecica en un volumen de 500 litros no fue significativamente diferente en base a la prueba "t" de Student y Anova comparado con el medio de cultivo Matthiessen y Toner(1966) adoptado en esta investigación como control.

Para Isochrysis galbana la cinética de crecimiento si resultó significativamente diferente contrastada con el medio control.

Se discuten las alternativas de mejorar la metodología propuesta y los factores que intervinieron en el crecimiento de las especies.

ABSTRACT

Tetraselmis suecica and Isochrysis galbana massive cultures under controlled conditions replacing the conventional nutrient source with liquid aerobic biodigested extract from cow and chicken manure and from the macroalgae Macrocystis pyrifera in the culture media were developed.

The technique is summarized in two phases: inorganic enrichment (control medium) from Erlenmeyer to Carboy level and a part from this level to Tank level with organic enrichment.

Tetraselmis suecica growth in a 500 l volume and in the Matthiessen & Toner (1966) culture medium, utilized like a control in this experiment were compared with no significant differences in the "t" Student and Anova test.

Isochrysis galbana kinetics growth turned out with significant differences when was compared with the control medium.

Alternatives to improve the proposed methodology and the factors affecting the species growth are discussed.

INDICE GENERAL

	Pag.
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
3. OBJETIVO.....	11
4. METODOLOGIA.....	12
4.1 Diseño de los biodigestores.....	12
4.2 Colecta de los productos.....	15
4.3 Carga orgánica.....	16
4.4 Análisis de nutrientes.....	17
4.5 Elaboración de los medios de cultivo control y experimental.....	18
4.6 Sistema y técnica de cultivo.....	20
4.6.1 Nivel Erlenmeyer y Fernbach.....	23
4.6.2 Nivel Carboy.....	25
4.6.3 Nivel Tanque.....	29
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Elaboración del medio de cultivo experimental... ..	32
5.1.1 Nivel Carboy.....	32
5.1.2 Nivel Tanque.....	34
5.2 Cinética Microalgal.....	37
5.2.1 Cultivo Control.....	37
5.2.2 Cultivo Experimental.....	38
5.2.3 Cultivo Testigo.....	39
6. DISCUSION.....	44
7. CONCLUSIONES.....	58
8. RECOMENDACIONES.....	59
9. LITERATURA CITADA.....	60
10. APENDICES	

INDICE DE TABLAS

TABLA	Pagina
I. Concentración de macronutrientes registradas en cada uno de los extractos biodigeridos.....	33

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1.	Sistema digestor de laboratorio. Donde: 1) capa de roca, 2) soporte del recipiente perforado, 3) calentador, 4) llave de colecta, 7) eliminador de espuma, 8) desfoque de gases, 9) retorno, 10) descarga del licor, 11) recipiente perforado.....	13
2.	Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de volumen limitado. A. fase de inducción; B. fase de crecimiento exponen- cial; C. fase de declinamiento relativo del crecimiento; D. fase estacionaria y E. fase de muerte (Tomado de Fogg, 1975).....	22
3.	Transferencia secuencial de los diferentes volumenes de cultivo.....	24
4.	Técnica de transferencia para cultivos semicontinuos. A).- Fuente de aire, B).- microalgas, C).- Carboy con medio inor- gánico (Matthiessen y Toner, 1966) D).- Carboy con medio orgánico.....	28
5.	Comparación de curvas de crecimiento en <u>Tetraselmis suecica</u> cultivadas en 500 li- tros de agua de mar con tres diferentes proporciones de extractos biodigeridos combinados.....	35
6.	Comparación de curvas de crecimiento en <u>Isochrysis galbana</u> cultivadas en 500 litros de agua de mar con tres diferentes propor- ciones de extractos biodigeridos combinados...	36

7. Curvas de crecimiento de Tetraselmis suecica cultivada en 500 litros de medio químico control (a) medio experimental (b) y con agua de mar sin enriquecer (c). 42

8. Curva de crecimiento de Isochrysis galbana cultivada en 500 litros de medio de cultivo control (a) medio de cultivo experimental (b) y con agua de mar sin enriquecer..... 43

APENDICES

AFENDICE

- A. Medio f/2 de Robert R. L. Guillard, para un litro de agua de mar filtrada
- B. Medio de Mattihessen y Toner, para un litro de agua de mar filtrada
- C. Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo control en el nivel Erlenmeyer
- D. Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo control en el nivel Fernbach
- E. Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo control en el nivel Carboy
- F. Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo control en el nivel tanque
- G. Esquema secuencial de la metodología para llevar a cabo la producción masiva de las microalgas
- H. Constitución potencial del medio experimental y del medio control
- I. Densidades microalgales estimadas en las réplicas del medio de cultivo control para Tetraselmis suecica
- J. Densidades microalgales estimadas en las réplicas del medio de cultivo experimental para Tetraselmis suecica.
- K. Densidades microalgales estimadas en las réplicas del medio de cultivo control para Isochrysis galbana.
- L. Densidades microalgales estimadas en las réplicas del medio de cultivo experimental para Isochrysis galbana
- M. Densidades microalgales de Tetraselmis suecica estimadas en el cultivo testigo con agua de mar exenta de nutrientes.
- N. Densidades microalgales de Isochrysis galbana estimadas en el cultivo testigo con agua de mar exenta de nutrientes

- O. Comparación estadística mediante la Prueba "t" de Student entre el medio control y el medio experimental para Tetraselmis suecica.
- P. Comparación estadística mediante la Prueba "t" de Student entre el medio control y el medio experimental para Isochrysis galbana.
- Q. Resultados del Anova practicado a los valores de crecimiento de Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana comparados contra sus respectivos medios control, experimental y testigo a un nivel de significancia del 5% y 1% para cada caso.

I. INTRODUCCION

Al analizar la situación actual de la acuicultura, es evidente que los resultados hasta ahora obtenidos confirman las perspectivas de esta actividad, como una forma de solventar los problemas de alimentación y generación de empleo, fundamentalmente en el medio rural.

Siendo el fitoplancton el primer eslabón de la trama alimentaria, tanto en el mar como en sistemas acuiculturales, su cultivo en condiciones controladas ha abierto numerosas posibilidades para el conocimiento del mar y del dominio de la naturaleza por el hombre. El uso de algas planctónicas como alimento para larvas o adultos de organismos comerciales o de laboratorio, ha creado la necesidad de su cultivo masivo.

Se ha probado además, que las microalgas son de gran valor nutritivo, siendo mayor su contenido en proteínas, grasa y vitaminas respectivamente que otras fuentes vegetales. es por eso también que en áreas sobrepobladas son consideradas como un suplemento potencial de alimento para el consumo humano directo (Ukeles, 1976).

Tradicionalmente el agua de mar enriquecida es la base para la preparación de muchos medios de cultivo de

microalgas marinas, empezando con las fórmulas más sencillas basadas en la de Miquel (1892), hasta las mezclas actuales más complejas (Provasoli et. al., 1957; Guillard, 1973). Independientemente de la efectividad de los medios como tales, uno de los aspectos que requiere de atención sobre todo de los cultivadores de animales filtroalimentadores de países en vías de desarrollo, es una producción económica y masiva de fitoplancton, ya que por lo general los medios tradicionales de cultivo de microalgas se realizan enriqueciendo el agua de mar con compuestos químicos, los que se obtienen de casas comerciales a precios elevados. Esto hace que el cultivar fitoplancton en estos medios resulte costoso, ocasionando que los organismos alimentados con éste, lleguen con un alto costo al mercado (Granados-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984).

La utilización de un medio de cultivo basado en nutrientes originados con estiércol de vaca y de gallina, así como el uso de una determinada especie de macroalga marina tratados en un biodigestor apropiado, sería la manera con la cual se obtendrían los nutrientes necesarios, en este caso de tipo orgánico para la alimentación del cultivo de fitoplancton (Paniagua-Michel, 1984).

El principal valor del estiércol de origen animal

radica en su contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y sustancias promotoras del crecimiento, como la creatina, auxinas y el ácido B indol acético, además de elementos traza en menor cantidad (Teusher y Adler, 1982). Así también el contenido químico de los extractos de macroalgas (NO_3 , PO_4 , SiO_3 , Cu, Zn, Co, Mn, vitaminas B1 y B 12, quelantes organicos, auxinas, giberelinas, aminoacidos, elementos traza (Stephenson, 1974), y otros compuestos comparados con los medios quimicos de cultivo de Mattiessen y Toner (1966) y de Guillard (1973) son cualitativamente similares en varios componentes lo que lo hace una fuente potencial de nutrientes para el cultivo del fitoplancton.

Independientemente del contenido de nutrientes y sustancias promotoras del crecimiento de las macroalgas y de los estiercoles, se requiere de un sistema de tratamiento para la recuperación de nutrientes y estabilidad de desechos, tal como la digestión aeróbica (Paniagua-Michel op. cit.). Esta se define como la destrucción de solidos organicos degradables por mecanismos biologicos aerobicos (Adams, et al., 1974). Es una extensión del proceso de tratamiento aeróbico de las aguas residuales donde los compuestos organicos son oxidados a productos organicos e inorganicos terminales estables (Brody, 1979).

En cuanto a volumen experimentado y especies a utilizar, esta investigación contribuye a ser la primera en su tipo hasta ahora realizada. Los volúmenes empleados anteriormente en esta clase de estudios han sido a escala experimental no excediendo de 16 litros. Así mismo las especies Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica, no han sido estudiadas con este método a escala de producción masiva, a pesar de que presentan excelentes propiedades nutricionales y características de cultivo (Loosanof y Davis, 1963; Droop, 1969 y Laing, 1985).

II. ANTECEDENTES

Uno de los primeros investigadores que inició con los cultivos algales fue Farmitzin (1871), que enfatizó sobre la posibilidad de determinar las necesidades nutritivas de un alga con el auxilio de soluciones inorgánicas. En 1890 Miquel al formular dos soluciones nutritivas para el cultivo de diatomeas planctónicas, menciona que las aguas naturales tienen que enriquecerse con sales minerales.

Otro trabajo como el de Allen (1914) señala que el éxito en la búsqueda de un medio de cultivo es diseñar una solución de agua de mar de tal manera que la ausencia o disminución en cantidad de alguno de sus constituyentes tenga un profundo efecto en el cultivo de las microalgas.

Recientemente la mayor parte de los medios para producir microalgas están basados en la Ley del Mínimo de Liebig que establece que el crecimiento está limitado por la sustancia presente en cantidad mínima con respecto a las necesidades del organismo.

Actualmente, de entre otros intentos se han logrado dos tipos principales de medios para el cultivo de microalgas marinas, que son: el medio de agua de mar enriquecido con

nutrientes orgánicos e inorgánicos y el medio químicamente definido. Los medios de agua de mar enriquecida son tan variados como el número de sus autores. Existen una gran variedad de medios y modificaciones de los mismos buscando su eficiencia en el cultivo de microalgas (Granados-Machuca y Paniagua-Michel, 1984).

Entre la gran variedad de medios para el cultivo de fitoplancton como alimento para invertebrados marinos se puede mencionar entre los más usados el f/2 de Guillard (1973), (Apendice A) y el de Matthiessen y Toner (1966), (Apendice B).

Debido a que todos estos medios son enriquecidos con reactivos químicos, lo que resulta oneroso, algunos autores han explorado la posibilidad de utilizar productos orgánicos, como fuente de nutrientes de bajo costo para el cultivo de microalgas (Paniagua-Michel, op. cit.). Así, De la Cruz y Alfonso (1975), describieron una metodología sencilla y económica para producir cultivos masivos a escala experimental de las microalgas Dunaliella tertiolecta, Chlamydomonas coccoides, Tetraselmis tetraathele y Nannochloris sp., alimentadas con fertilizantes orgánicos como: harina de pescado, harina de girasol, levadura de cerveza desecada, nitrato de amonio y

superfosfato simple. Por otro lado el cultivo de peces en estanques y lagunas, han recogido la práctica tradicional de muchos pueblos de Asia, Africa, Europa y América de fertilizar los cuerpos de agua con compuestos inorgánicos (fertilizantes agrícolas) para aumentar la producción de peces (Pillay, 1967).

Además hay estudios recientes sobre la utilización de las aguas de albañal, con su aporte barato de elementos nutritivos para el cultivo masivo de fitoplancton (Tenore y Dunstan, 1973). Aunque no es objetivo de este trabajo probar el uso de fertilizantes como alimento, cabe mencionar que técnicas encaminadas a minimizar el costo y simplificar la metodología de cultivos masivos de organismos marinos han sido también utilizadas.

De Pauw y De Leenheer (1979), realizaron de manera aceptable la reproducción masiva de algas marinas y de agua dulce con estiércol de cerdo. Por otro lado Yang y Haung (1981), durante el tratamiento anaerobico del mismo estiércol, agregaron microalgas como una manera de estabilizar el residuo.

Buckle-Ramírez y Paniagua-Michel en 1984, cultivaron con éxito las microalgas marinas Monochrysis lutheri y

Skeletonema costatum en un medio orgánico experimental elaborado a base de extractos biodigeridos aeróbicamente de la macroalga marina Macrocystis pyrifera y el pasto marino Zostera marina.

Utilizando excretas de vaca y de gallina, Buckle Ramírez y Granados-Machuca (1984), propusieron el mismo método a escala experimental para obtener nutrientes y cultivar microalgas marinas en base a la descomposición líquida aeróbica de éstos. Estimaron el crecimiento de las microalgas antes mencionadas también en volúmenes de uno a 16 litros.

De igual modo, por su parte Paniagua-Michel en 1984, determinó la eficiencia en el crecimiento de la microalga Pavlova lutheri en un medio de cultivo orgánico experimental, preparado mediante el enriquecimiento de agua de mar con extractos biodigeridos aeróbicamente de estiércol de vaca, gallina y la macroalga Macrocystis pyrifera, utilizando para dicho medio volúmenes de 2.71 litros.

En lo que se refiere a organismos a prueba, Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica, son dos especies que se han utilizado ampliamente para alimentar larvas y adultos de moluscos (Loosanof y Davis, 1963; Droop, 1969 y Laing, 1985).

Isocrhysis galbana es una especie que presenta ventajas para cultivarse debido a la abundante información publicada sobre sus requerimientos nutricionales y su crecimiento a cambios de temperatura e iluminación (Caperon, 1981; Laing, 1985).

Se trata de células de 6-8 Micras de tamaño y con dos flagelos móviles. Su organelo más importante es el haptoma circundado por pequeños relieves. Es un flagelado de color amarillo que habita en climas templados. Conocida también como Isocrhysis "tahiti" (Laing, 1985), su crecimiento óptimo se encuentra a una temperatura que varía de 16-20 °C a una salinidad de 25 ppm y una iluminación de 4000 lux.

Debido a su tamaño y a que es un flagelado desnudo es fácilmente digerible por los consumidores. Con un alto valor nutritivo, la sitúan como la especie más importante para la alimentación de bivalvos marinos (Laing y Utting, 1980; Fábregas et al., 1985 ; Romberger y Epifanio, 1981).

Tetraselmis suecica se considera una especie de buen valor alimenticio para larvas, semillas y adultos de bivalvos (Laing y Helm, 1981). También ha probado ser nutritiva para larvas de peces, crustáceos y microherbívoros .

Es un alga comprimida elipsoidal con el extremo posterior agudo y el extremo anterior de 4 lóbulos, y es conocida también como Platymonas sp. Tiene de 6-9 Micras de diametro y 10-16 Micras de largo y un color verde brillante con 4 flagelos móviles. Es una especie eurihalina, con capacidad de formar esporas cuyos limites de tolerancia son muy amplios. Posee una pared celular delgada formada principalmente de carbohidratos (Padilla, 1975), a lo que Epifanico (1979) atribuye su lenta digestibilidad al compararla con Isochrysis galbana. Esta microalga crece bien en el rango de temperatura de 18-22°C, a pH de 7.5-8.0 y salinidad de 25-30 ppm. Por estas razones es una especie de considerable potencial de cultivo a gran escala.

3. OBJETIVO

Probar la factibilidad de producir masivamente en laboratorio las microalgas Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana, alimentándolas con nutrientes obtenidos a base de productos orgánicos biodigeridos.

4. METODOLOGIA

Esta investigación se llevo a cabo en el área de Acuicultura dentro del Programa Producción de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas dependiente de la Universidad Autonoma de Baja California.

4.1. Diseño de los biodigestores

Para el tratamiento de cada uno de los productos (estiércol de vaca, gallina y la macroalga Macrocystis pyrifera) se diseñaron tres unidades de digestión aeróbica a escala de laboratorio, donde se aplicó el sistema de funcionamiento discontinuo de alimentación (carga) única y de una etapa (Irvine y Richter, 1978).

Cada unidad consistió de un recipiente cilíndrico de 43 y 28 cm de altura y un diámetro, respectivamente, con un volumen total de 18 litros (Fig. 1).

En su parte interna y en la base del recipiente se colocó una capa de grava de 2-5 mm de diámetro, con un area

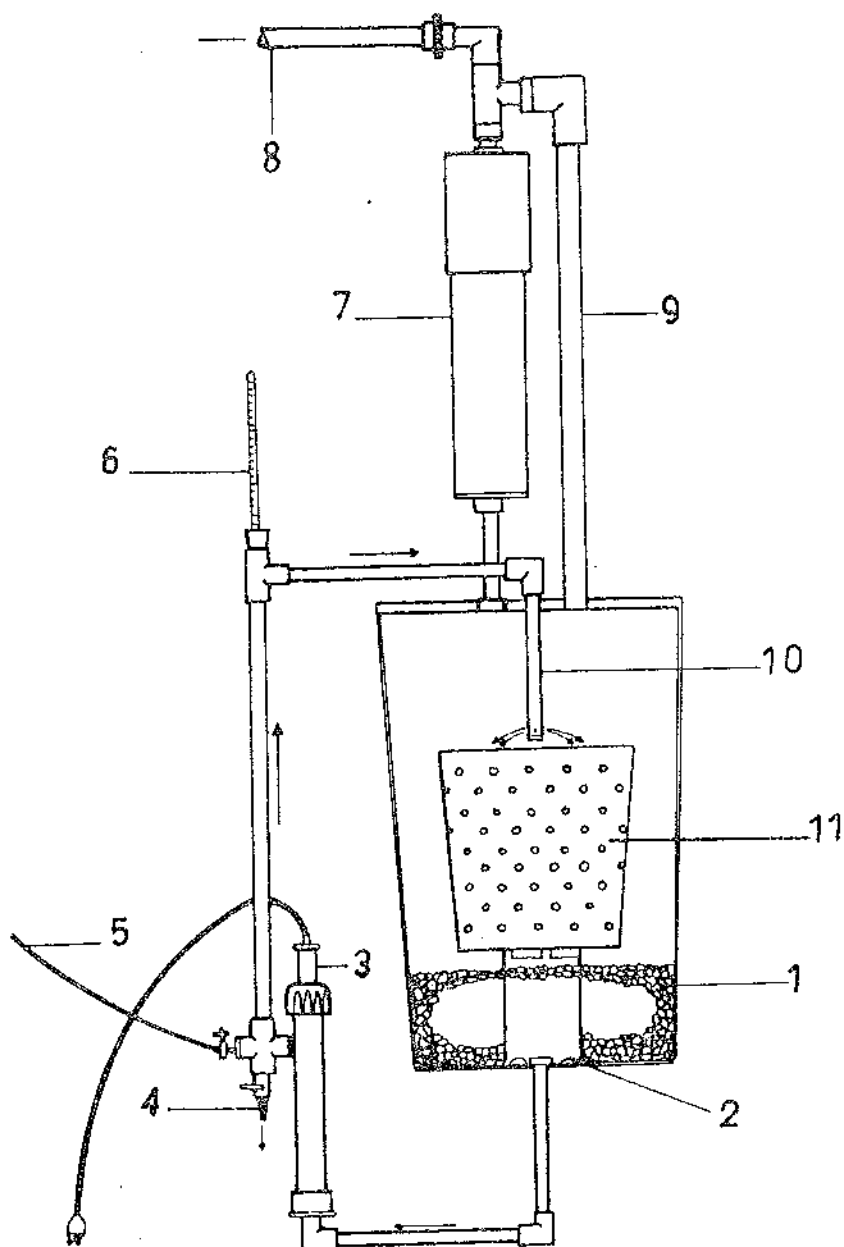


Fig. 1.- SISTEMA DIGESTOR DE LABORATORIO

Donde: 1)Capa de roca, 2)Soporte del recipiente perforado, 3)Calentador, 4)Llave de colecta, 5)Inyección de aire, 6)Termómetro, 7)Eliminador de espuma, 8) Desfogue de gases, 9)Retorno, 10)Descarga del licor, 11)Recipiente perforado. (Tomado de Paniagua-Michel, 1984).

de superficie de 551.25 cm^2 y un espesor de 11 cm en el que se introdujeron los productos para su lixiviación, remoción y transformación de sus fuentes carbonosas y nitrogenosas.

A través de un orificio localizado en el fondo del recipiente, sale un ducto que se conecta a un contenedor que alberga un calentador de inmersión el cual incrementa la temperatura necesaria para el proceso de digestión y nitrificación. Del contenedor emerge una conexión tipo cruz, la cual tiene integradas la llave de colecta del extracto y una válvula para la inyección del aire requerido para la ascensión del líquido, mezcla de los productos, agitación del licor y aporte de oxígeno para los procesos de nitrificación.

Esta conexión lleva el extracto hacia la parte superior del bioreactor mediante un tubo unido a la línea de descarga con una union "T" en la cual se instaló un termómetro de escala de 0 a 50°C para el registro de temperatura del proceso. El conducto poseé en su parte terminal cuatro orificios equidistantes que al descargar el licor recirculado en la parte superior interna del bioreactor, distribuye uniformemente al líquido sobre el recipiente perforado.

El biodigestor se encuentra tapado para evitar

perdidas de líquido y espuma generada en el proceso de digestión, además de conservar la temperatura y evitar la dispersión de posibles patógenos de los productos.

De la tapa que cubre al bioreactor, sale un ducto para desfogue de gases. Dado que éste logra sacar espuma por efectos de presión, se le integró un fraccionador de espuma de 7,5 cm de diámetro y 13 cm de altura para la conversión parcial de la espuma al estado líquido que retorna y se reintegra al volumen de la unidad.

En su porción terminal, el eliminador tiene una conexión que lleva el desfogue de gases hacia el ambiente fuera del laboratorio (Paniagua-Michel, 1984).

4.2. Colecta de los productos

Una vez diseñados los bioreactores, el siguiente paso importante fue seleccionar los productos orgánicos para su tratamiento.

Los tres productos utilizados se colectaron en lugares circunvecinos a Ensenada, Baja California, México.

El estiércol de gallina provino de la granja avícola

"Azucena" localizada en la Colonia Jalisco de esta Entidad. Este se encontraba fresco, originado por gallinas ponedoras. Las excretas de vaca también fueron de reciente deposición y se tomaron de un establo de vacas lecheras en Maneadero. Para el caso del alga Macrocystis pyrifera, esta se recolectó mediante buceo libre en los mantos localizados en la periferia de Punta Banda.

4.3. Carga orgánica

Por la importancia que representa la óptima nitrificación del sistema, los biodigestores se cargaron primeramente con un 10% de su volumen con tierra de jardín, esto con el fin de activar la siembra de bacterias nitrificantes quimioautotróficas. El proceso de aireación y reciclado hidráulico fué durante seis semanas (Paniagua-Michel, 1984).

Concluido éste, la carga orgánica determinada para cada bioreactor fue de 1 kilogramo de su producto. Así al biodigestor 1 le correspondió un kilogramo en peso fresco de estiércol de vaca y 16 litros de agua dulce, al número 2 un kilogramo en peso fresco de estiércol de gallina y 16 litros de agua dulce, por último al bioreactor número 3 también un kilogramo en peso fresco de la macrofita, la

cual previamente se homogenizó en una licuadora mezclando tanto fronda como estipe para así ser tratadas con el mismo volumen de agua dulce en su respectivo biodigestor.

Una vez cargado cada bioreactor y controladas sus temperaturas de tratamiento ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) se inició el funcionamiento.

El tiempo de tratamiento de cada uno de los productos fué el siguiente: estiércol de gallina 25 días; estiércol de vaca 10 días y por último 15 días para la biodigestión de Macrocystis pyrifera (Paniagua-Michel, op. cit.).

Obtenido el licor de cada producto, éste se esterilizó en un autoclave a 15 lb/cm de presión y 121°C durante 15 minutos a pH bajo (4.5-5.0) con el fin de excluir las bacterias y conservar las vitaminas (Granados-Machuca y Buckle-Ramirez, (1984)).

4.4 Análisis de nutrientes

El análisis cuantitativo de los nutrientes obtenidos en los extractos biodigeridos, se llevo a cabo siguiendo los lineamientos establecidos por el método de Strickland y Parson (1972) Para dicho análisis se utilizó un

espectrofotometro marca "Bausch & Lomb Spectronic 2000".

Dada su importancia como macronutrientes limitantes en el crecimiento microalgal, los Nitratos, Fosfatos y Amonio fueron los principales constituyentes cuantificados y considerados para la preparación del medio experimental.

4.5. Elaboración de los medios de cultivo control y experimental.

La metodología que se utilizó para los cultivos control, fué la de Matthiessen y Toner (1966), ya que ésta además de hacer posible la obtención de cultivos masivos debido a las características cualitativas y cuantitativas de los elementos que la componen, es la utilizada en la producción rutinaria del Laboratorio de Microalgas donde se llevó a cabo esta investigación.

El medio de cultivo control se prepara agregando las soluciones primarias y secundarias de nutrientes mayores, metales traza y vitaminas en las proporciones correspondientes a cada volumen (Apéndices C,D,E y F).

La preparación del medio de cultivo experimental, se hizo en base a las experiencias reportadas por Paniagua-

Michel, (1984); Paniagua-Michel y Buckle-Ramírez, (1984); Granados-Machuca y Buckle-Ramírez (1984) y con el apoyo de un número dado de experimentos realizados para elegir la proporción y volumen adecuado de las mezcla de los extractos correspondientes a cada producto.

Para enriquecer con nutrientes orgánicos el medio de cultivo a nivel Carboy (16 litros), se eligió la proporción 4:1:1, de la cual 400 ml. correspondían al biodigerido de estiércol de gallina, 100 ml. al biodigerido de estiércol de vaca y 100 ml. del biodigerido de la macroalga.

Mientras tanto para nivel tanque (500 litros) correspondió la proporción 8:4:4 donde 800 ml. eran del biodigerido de la macroalga, 400 ml. del biodigerido de estiércol de vaca y por último 400 ml. del extracto de estiércol de gallina.

Es de hacer notar que las proporciones antes descritas están basadas en estudios sobre las concentraciones mayores de nutrientes y oligoelementos (Guillard, 1973; Provasoli, et al, 1966; Stephenson, 1974; Teusher y Adler, 1982; Paniagua-Michel, 1984) que debieron tener las muestras utilizadas para competir con el medio convencional. Por eso

la importancia de haber determinado la cantidad de macronutrientes contenidos en los extractos utilizados en este trabajo, para así compararlos y/o ajustarlos a las proporciones encontradas por los autores antes citados.

4.6 Sistema y técnica de cultivo.

Debido a la necesidad de realizar una producción masiva de fitoplancton, se han desarrollado sistemas de cultivo discontinuos y continuos (Trotta, 1981).

En este caso se trabajó con el sistema de cultivo discontinuo o estático, ya que de esta manera, es posible aprovechar y cosechar el volumen total producido. Estos parten de inocular las células en un recipiente con agua de mar enriquecida (medio de cultivo) y únicamente permiten su crecimiento (Kubistschek, 1970).

Como se mencionó anteriormente, la técnica de cultivo que se utilizó en los cultivos control, fué la de Matthiessen y Toner (op. cit). En general, para cualquiera de los dos cultivos; orgánicos e inorgánicos, la rutina seguida una vez controlados los parámetros físico-químicos y los requerimientos nutricionales de las microalgas, fué llenar el recipiente de cultivo (hasta nivel Fernbach) con

agua de mar y enriquecerlo con nutrientes esenciales. El medio de cultivo se esteriliza por autoclave para eliminar organismos contaminantes, y se deja reposar 24 horas para que obtenga una temperatura ambiente o del cuarto de cultivo. Transcurridas las 24 horas de su esterilización, el medio se inocula con microalgas y se expone a condiciones favorables de luz, temperatura y aereación. Las células se incrementan en número siguiendo un patrón característico de crecimiento, el cual idealmente se resume en las siguientes fases: A) Fase de retardo o de inducción; B) Fase exponencial; C) Fase de declinación relativa de crecimiento; D) Fase estacionaria y E) Fase de muerte (Fig. 2).

El conocimiento del tiempo de duración de estas fases es importante en el cultivo de estanques abiertos para identificar el tiempo de cosecha cuando las microalgas alcanzan su fase exponencial de crecimiento, la cual está directamente relacionada con el tamaño de inóculo inicial y estado fisiológico del alga (Fogg, 1975).

Las cepas de Leptiselmis suecica e Isochrysis galbana utilizadas a lo largo del experimento, fueron obtenidas del Laboratorio de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas U.A.B.C. estas a su vez fueron adquiridas en el National Marine Fisheries Service, La Jolla, California.

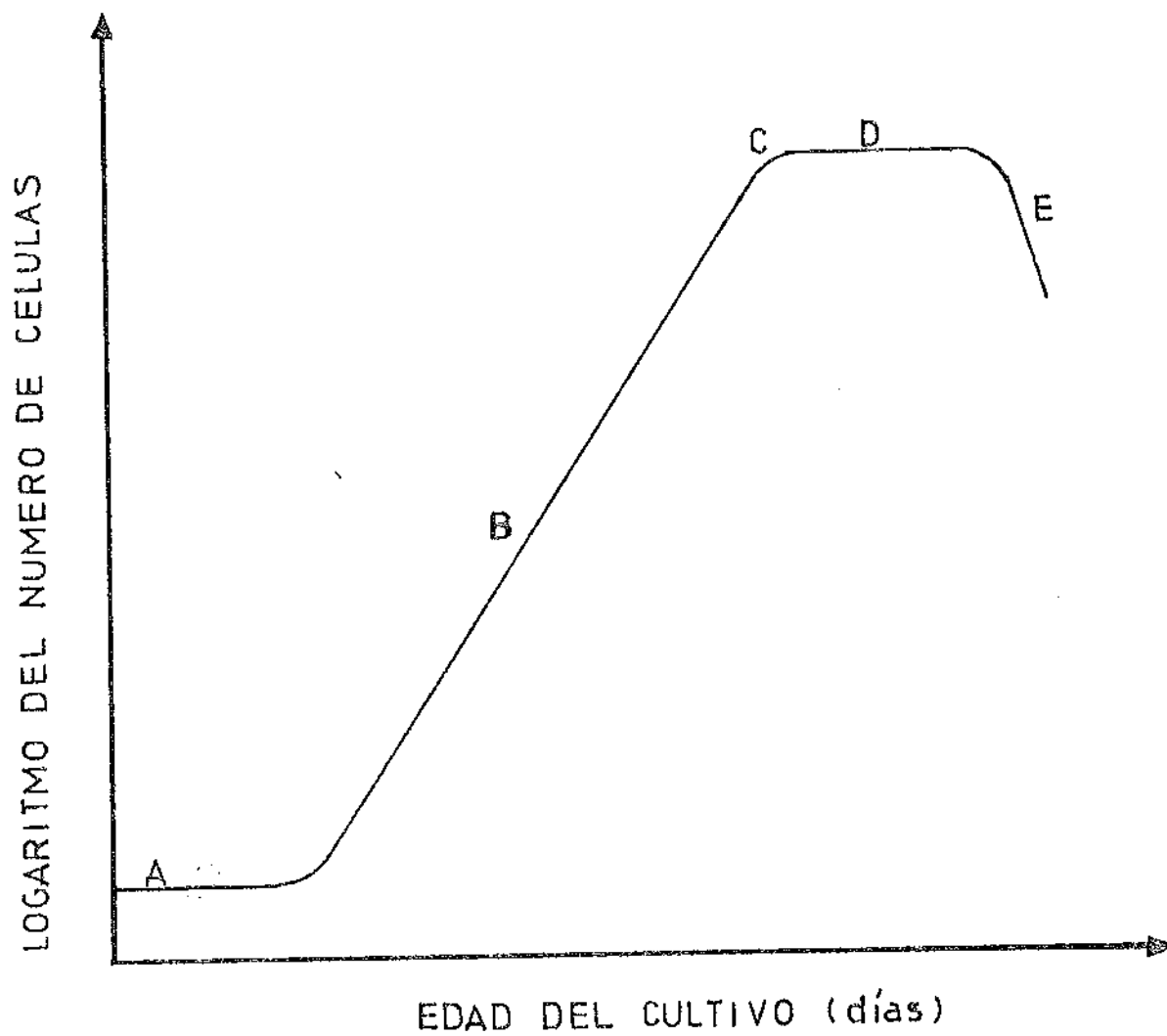


FIG. 2 . Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de volumen limitado. A. fase de inducción; B. fase de crecimiento exponencial; C. fase de declinamiento relativo del crecimiento; D. fase estacionaria y E. fase de muerte (Tomado de Fogg, 1975).

El orden secuencial para la transferencia de un cultivo a otro fué el siguiente: Nivel Erlenmeyer al Nivel Fernbach, este al Nivel Carboy y por último el Carboy al Nivel Tanque (Fig. 3).

4.6.1 Nivel Erlenmeyer y Fernbach

En lo que se refiere a la técnica de cultivo, se preparó un número igual de matraces Erlenmeyer para cada especie, elaborados en base a la fórmula propuesta por Matthiessen y Toner (op. cit.) correspondiendo de esta manera 4 recipientes para Isochrysis galbana y 4 para Tetraselmis suecica. La preparación de la solución stock para los Erlenmeyer se realizó como se muestra en el Apéndice C.

Una vez conteniendo cada matraz 50 ml. de medio de cultivo, se procedió a llevar a cabo la inoculación (Apéndice B-d), correspondiendo así 10 ml. de cepa original con Tetraselmis suecica a cada uno de los recipientes destinados para dicha especie. Se practicó el mismo procedimiento para la microalga Isochrysis galbana.

Los matraces inoculados se mantuvieron en el laboratorio de cultivo a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ estimada con un termómetro de máxima y mínima. La luz se proporcionó con

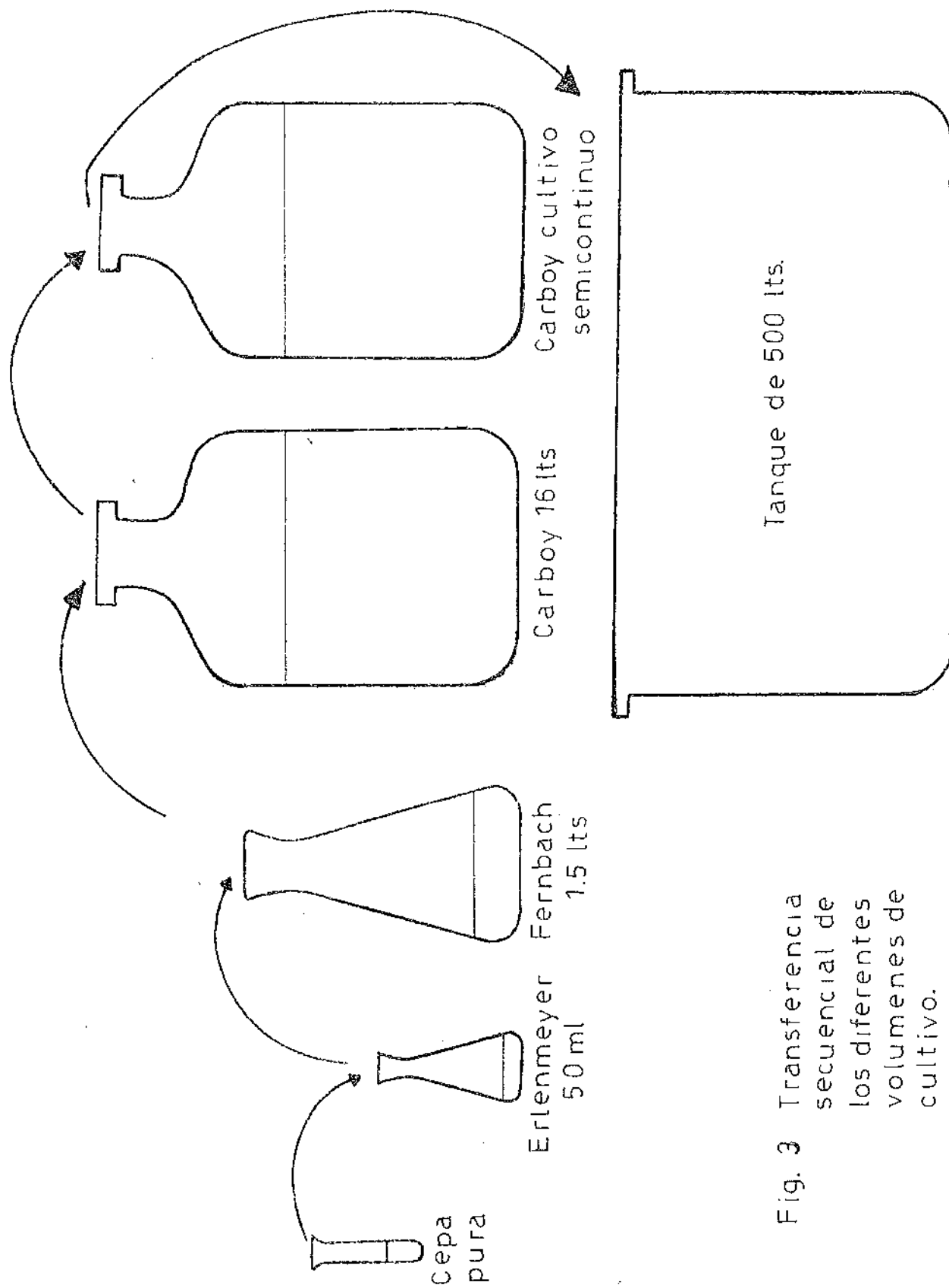


Fig. 3 Transfencia
secuencial de
los diferentes
volumenes de
cultivo.

lámparas fluorescentes tipo luz fría de 40 watts con 4 pies de largo, recibiendo los cultivos una intensidad luminosa de 1000-5000 lux. A este nivel no se incluyó aireación, ya que basta la agitación normal diaria para que ocurra la difusión completa de los nutrientes y evitar la decantación de los cultivos. La boca de los Erlenmeyer fue cubierta con tapones de algodón recubiertos de gasa para de esta forma permitir el intercambio de gases entre el medio ambiente y el cultivo. La salinidad de cada medio contenido en los recipientes de cultivo, se estimó con un salinómetro o refractómetro marca AO Golberg. Transcurridos ocho días de crecimiento microalgal en los matraces Erlenmeyer, se llevó a cabo la transferencia de dos recipientes conteniendo su respectiva especie a un Fernbach preparado de la misma manera que los Erlenmeyer.

4.6.2. Nivel Carboy.

Al trabajar al Nivel Carboy, varió la metodología descrita a la anterior, utilizándose en esta fase Carboys de capacidad 16 litros. Se preparó un Carboy con dicho volumen de medio de cultivo para Isochrysis galbana y otro para Tetraselmis suecica como se describe en el Apéndice E.

Una vez que los Carboys estuvieron listos para ser

inoculados, y que los Fernbach alcanzaron una concentración visual optima (ocho días), estos ultimos fueron transferidos a su correspondiente Carboy (Apendice G-k).

Ya inoculados los Carboys con su respectiva especie, se sometieron a las condiciones constantes de luz y temperatura empleadas en los niveles Erlenmeyer y Fernbach. Se trabajo con una salinidad de 32 ‰ y un pH de 7-7.5.

En este caso para tapar la boca de los Carboys, se usaron tapones de neopreno, teniendo cada uno tres orificios, uno para la entrada de la varilla de vidrio que introduce el aire al sistema, con el fin de proporcionar aire y lograr la difusion de nutrientes, evitar el asentamiento celular y proporcionar un suplemento parcial de bioxido de carbono. La fuente de aire fue suministrada por un compresor "Conde" numero 6. Los dos orificios restantes con su respectiva varilla de vidrio se utilizaron para muestrear y permitir la salida de aire del cultivo.

La técnica de cultivo en esta seccion fue modificada e inovada a la propuesta en un principio, ya que fue necesaria esta práctica para poder lograr la produccion masiva de las microalgas.

Fue en esta etapa donde entró en vigor la utilización de los nutrientes orgánicos y de esta manera suplir a los inorgánicos. Para dicho fin se prepararon dos Carboys para cada especie, uno control y el otro experimental.

Para el ensayo experimental se llenó un Carboy con 16 litros de agua de mar esterilizada, y se le añadieron los nutrientes orgánicos en la proporción 4:1:1, de la cual 400 ml correspondían al biodigerido de estiércol de gallina, 100 ml del biodigerido de estiércol de vaca y 100 ml. del biodigerido de Macrocystis pyrifera, haciendo así un total de 600 ml. de licor enriquecido añadido a los 16 litros de agua de mar (Apéndice G-o).

Una vez preparado el medio de cultivo experimental para cada especie y alcanzada la concentración óptima de transferencia (nueve-diez días) en los Carboys con el medio convencional, se procedió a llevar a cabo la inoculación de las microalgas del medio químico inorgánico al medio con nutrientes orgánicos (Apéndice G-p) para dicho fin se recurrió al sistema del cultivo semicontinuo (Fig.4), inoculando así con un litro de cultivo denso de microalgas (medio donador) al medio de cultivo experimental (medio receptor). Esta operación se realizó también para su correspondiente Carboy control y para cada especie.

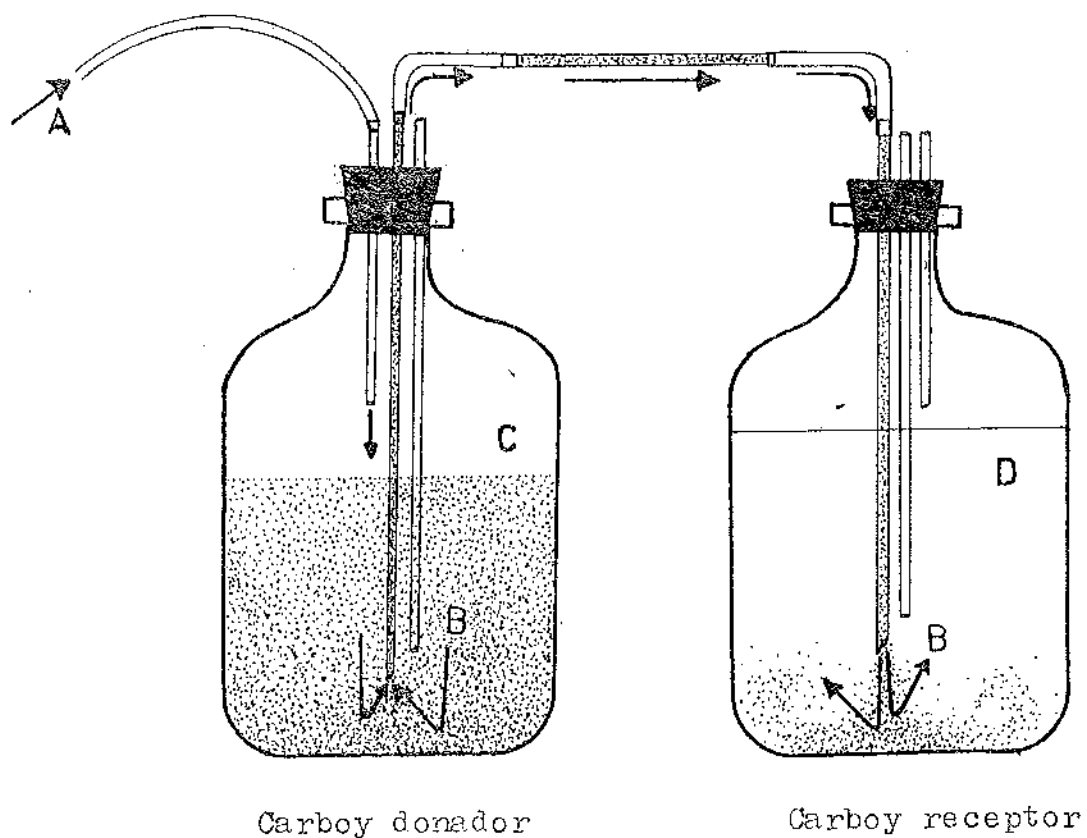


FIG. 4. Técnica de transferencia para cultivos semicontinuos A).- Fuente de aire, B).- Microalgas, C).- Carboy con medio inorgánico (Matthiessen y Toner, 1966) D).- Carboy con medio orgánico.

Transcurridos dos días de crecimiento microalgal en el medio orgánico (considerando como día cero el día de inóculo), se añadió la mitad de la proporción de los extractos conteniendo los nutrientes orgánicos, a la proporción agregada inicialmente (Apéndice G-s). Mientras tanto el Carboy control continuaba su ritmo de crecimiento, hasta alcanzar ambos su fase de transferencia (ocho-nueve días).

4.6.3. Nivel Tanque

El último paso consistió en transferir el cultivo del Carboy a un Tanque de capacidad 500 litros, fabricado de fibra de vidrio.

Transcurridos ocho y diez días, posteriores al día de inóculo en los Carboys experimental y control correspondientemente estos se transfirieron a su respectivos tanques, preparandose para tal efecto tres tanques por especie, es decir: para Isochrysis galbana un tanque experimental, uno control y un tanque testigo solo con agua de mar sin ningún tipo de nutriente. Este último, fué inoculado con un Carboy experimental, realizándose el mismo procedimiento para Tetraselmis suecica.

El enriquecimiento del tanque control se llevó a cabo como se resume en el Apéndice F. Mientras tanto para enriquecer con nutrientes orgánicos el tanque experimental se agregó la proporción de extractos 8:4:4 a un volumen de 500 litros de agua de mar filtrada y esterilizada en una cámara de luz ultravioleta (Apéndice G-u)

De la proporción antes mencionada, 800 ml. correspondían al biodigerido de la macroalga Macrocystis pyrifera, 400 ml al biodigerido de estiércol de vaca y por último 400 ml del biodigerido de estiércol de gallina.

Dos días después fué añadida al cultivo la mitad de la proporción inicial antes mencionada (Apéndice G-x).

Con el fin de mantener constantes el pH del cultivo al tercer día de crecimiento se aplicó al mismo CO₂ durante tres minutos a una presión de 30 atmosferas. Para tal práctica se utilizó un tanque de 210 Kg/cm marca "INFRA" (Apéndice G-y).

En este nivel la aireación fué más vigorosa debido a las dimensiones de los tanques. La intensidad luminosa para proporcionar luz al cultivo, varió respecto a las fases anteriores, ya que en este caso se utilizaron focos de una unidad de 500 W 220/230 V marca OSRAM HWL.

Los niveles de pH, temperatura y salinidad se trataron de mantener constantes también en esta fase.

Para determinar la relación entre la transmitancia (Densidad Óptica) y concentración de células/mililitro, se utilizó un espectrofotómetro marca HACH dr/2, leyendo a una longitud de onda de 680 nm. Las lecturas de las muestras se llevaron a cabo diariamente a las 2:00 p.m. desde el día de inóculo (día cero) hasta el décimo día de crecimiento.

Con el fin de estimar la respuesta de crecimiento en cada medio de cultivo al nivel tanque, se graficaron curvas de crecimiento promedio y se compararon con las curvas del crecimiento control, mediante la Prueba "t" de Student para pruebas pareadas, incluidas en el Paquete Estadístico "EPISTAT". Esto con el propósito de detectar si existía o no diferencia significativa al cultivar las microalgas en el medio de cultivo inorgánico y el medio orgánico (Granados-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984).

El Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% para Tetraselmis suecica y 1% para Isochrysis galbana, fué otro estadístico empleado para corroborar la diferencia en crecimiento entre los cultivos control, experimental y testigo de cada especie (Parker, 1976).

5. RESULTADOS

5.1. Elaboración del medio de cultivo experimental

En la tabla I aparecen las concentraciones de macronutrientes encontradas en cada uno de los extractos biodigeridos. Donde se observa que el extracto de estiércol de gallina, contiene en promedio las mayores proporciones de nutrientes.

La relación de constituyentes químicos presentes en el medio control y la constitución química potencial del medio experimental, se presenta en el Apéndice H.

5.1.1. Nivel Carboy

Una vez determinada la concentración de nutrientes, se investigó la cantidad óptima de cada extracto necesaria para la elaboración de la mezcla orgánica enriquecida (proporción de extractos combinados), tomando como criterio para su elección aquellos cultivos enriquecidos con esta, que alcanzaron una concentración eficiente (3,760,000 cel/ml para Tetraselmis suecica y 14,496,000 cel/ml para Isochrysis galbana) contrastada con el medio control (5,720,000 cel/ml y 16,536,000 cel/ml respectivamente para cada especie) al

TABLA I. Concentración de macromolinos registradas en cada uno de los extractos biodigeridos.

PRODUCTO	DIAS DE TRATAMIENTO	C O N C E N T R A C I O N		
		AMONIO	FOSFATOS	NITRATOS
Extracto de <u>Macrocystis pyriferá.</u>	15	10 mg/l	2.40 mg/l	125 mg/l
Extracto de estiércol de gallina	25	13.0 mg/l	35 mg/l	270 mg/l
Extracto de estiércol de vaca	10	9.0 mg/l	15 mg/l	330 mg/l

octavo día de crecimiento.

Las proporciones experimentadas fueron; 4:2 g.v. (400 ml de extracto de estiércol de gallina y 200 ml de extracto de estiércol de vaca), 4:1:1 a.v.g (400 ml de biodigerido de la macroalga, 100 ml de biodigerido de estiércol de vaca y 100 ml de biodigerido de estiércol de gallina) y 4:1:1 g.v.a. (400 ml de biodigerido de estiércol de gallina, 100 ml de extracto de estiércol de vaca y 100 ml de extracto de Macrocystis pyrifera).

Esta exploración dió como resultado que la proporción 4:1:1 g.v.a. permitía un desarrollo más favorable de Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana, al compararla con los controles al octavo día de crecimiento.

El nivel de pH varió entre 6.5-8.0 durante los ocho días de crecimiento. La salinidad del medio también tuvo fluctuaciones entre 30-32‰.

5.1.2 Nivel Tanque

En las figuras 5 y 6 se observan las curvas de crecimiento de Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana cultivadas en volúmenes de 500 litros de agua de mar

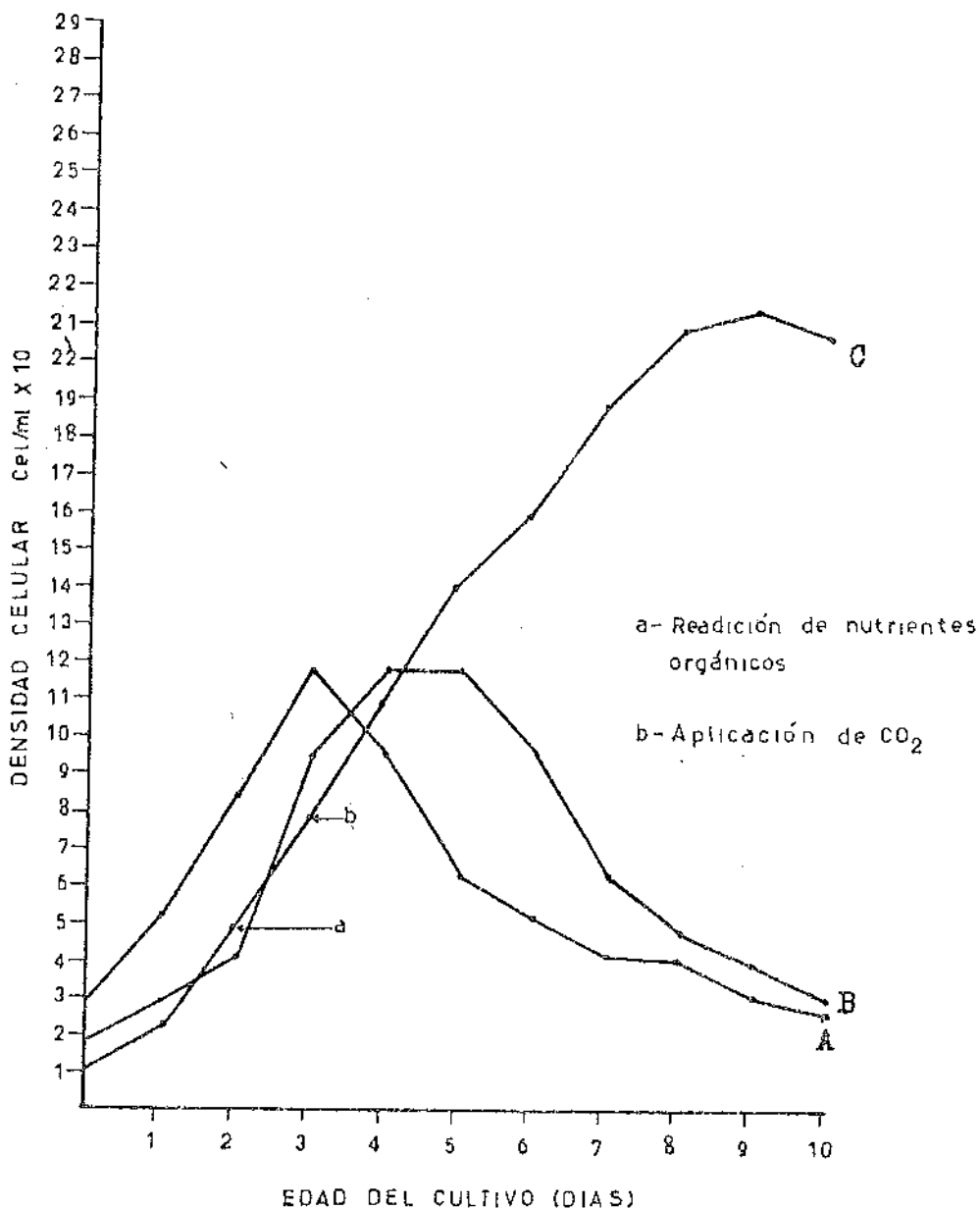


FIG. 5.- Comparación de curvas de crecimiento en Tetraselmis suecica cultivada en 500 litros de agua de mar con tres diferentes proporciones de extractos biodigeridos combinados.

A- cultivo con la proporción 8:2:2-g.v.a. ; B- proporción 8:4:2-a.v.g. ; y C- en la proporción 8:4:4-a.v.g. con adición de la mitad de ésta, y CO₂ al segundo y tercer día de crecimiento respectivamente.

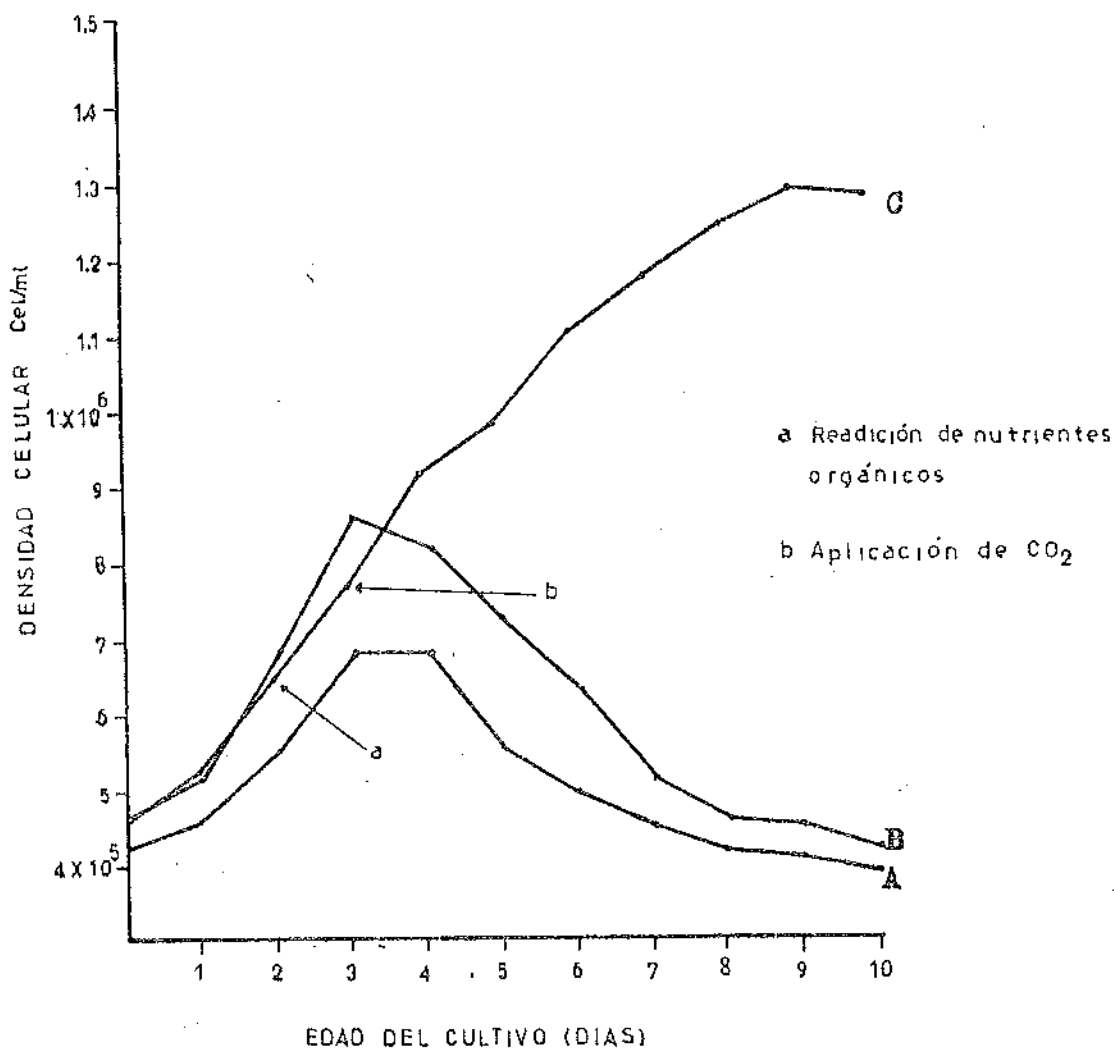


FIG. 6.- Comparación de curvas de crecimiento en Isochrysis galbana cultivada en 500 litros de agua de mar con tres diferentes proporciones de extractos biodigeridos combinados.

A- cultivo con la proporción 8:2:2-g.v.a. ; B- proporción 8:4:2-a.v.g. ; C- en la proporción 8:4:4-a.v.g. con adición de la mitad de ésta, y CO₂ al segundo y tercer día de crecimiento respectivamente.

enriquecida con las tres diferentes proporciones de extractos combinados. Este registro visual y cuantitativo de las densidades alcanzadas en cada ensayo, permitió identificar que la proporción 8:4:4 a.v.g. (800 ml. de biodigerido de la macroalga, 400 ml. del biodigerido de estiércol de vaca y 400 ml. del biodigerido de estiércol de gallina) fué la más aceptable para cultivar las microalgas en el medio experimental y compararlo con el medio control al décimo día de cultivo (Figuras 5-C y 6-C).

La salinidad del medio de cultivo en este nivel fué en promedio de 32‰ y el pH entre 7-8.

5.2. Cinética Microalgal.

5.2.1. Cultivo Control (Nivel Tanque)

Las concentraciones celulares de Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana obtenidas para las réplicas en el medio control se indican en los Apéndice I y K respectivamente.

Se observó una densidad promedio máxima de 280,250 cel/ml para Tetraselmis suecica y 1,456,050 cel/ml para Isochrysis galbana.

En Tetraselmis suecica la fase exponencial se determinó

del día dos al décimo, con concentraciones promedio de 46,500 y de 280,250 cel/ml para cada caso. Mientras que en Isochrysis galbana, esta se determinó del primero al décimo día con concentraciones promedio de 464.175 y 1,458,050 cel/ml respectivamente.

La figura 7-a muestra la curva de crecimiento promedio de las densidades celulares obtenidas durante los diez días de crecimiento para Tetraselmis suecica. Se observa en ésta curva la fase de inducción, que se prolonga hasta el segundo día de vida del cultivo, a partir del cual, se inicia la fase exponencial que termina al doceavo día, presentándose después la fase estacionaria y de muerte microalgal, las cuales ya no se denotan en la gráfica.

La curva de crecimiento promedio para Isochrysis galbana se muestra en la Figura 8-a. En ésta se observa la fase de inducción que se prolonga hasta el primer día de vida a partir de la cual comienza la fase exponencial que termina al décimo día.

5.2.2 Cultivo Experimental (Nivel Tanque)

Las concentraciones microalgales de Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana en sus cuatro réplicas de este medio se muestran en los Apendices J y L respectivamente.

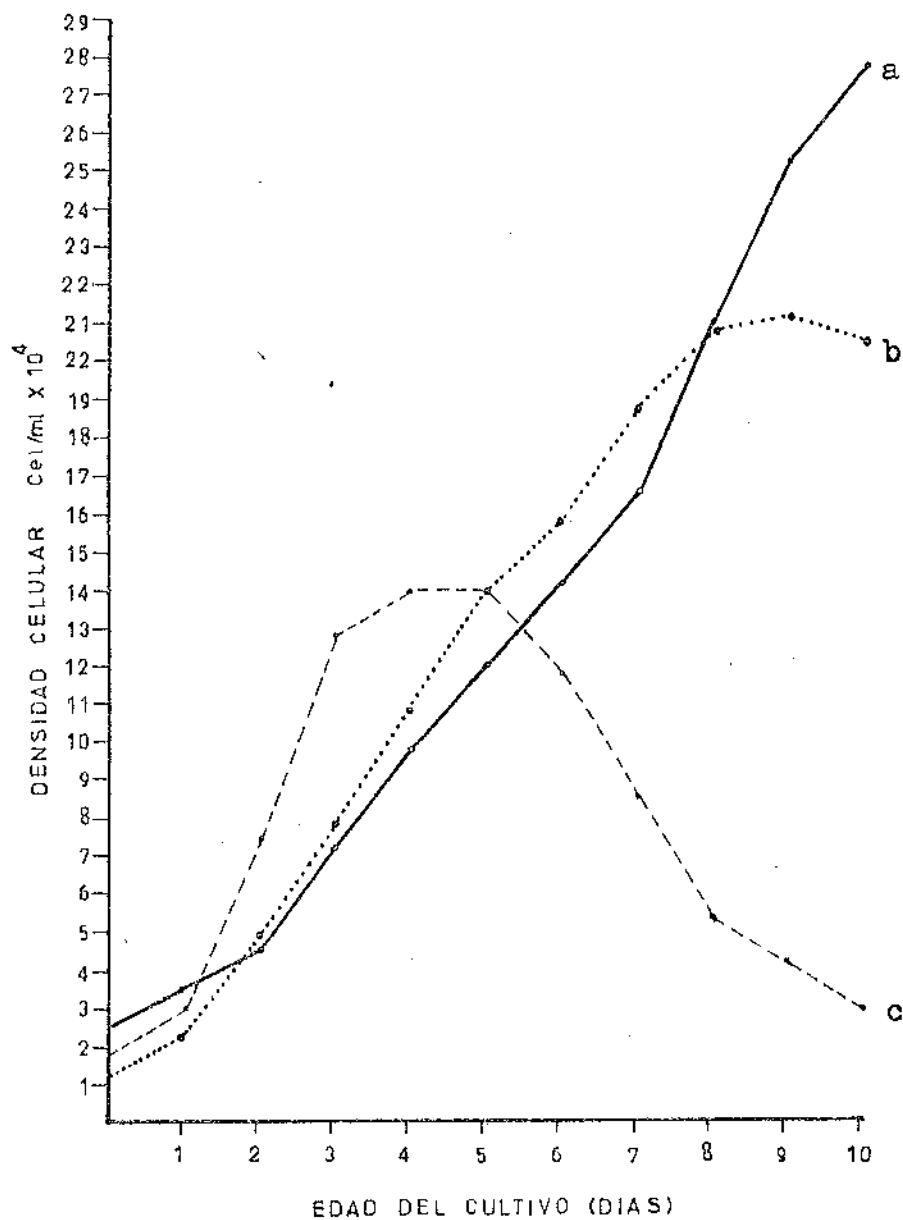


FIG. 7.- Curva de crecimiento de Tetraselmis suecica cultivada en 500 litros de medio químico control (a) medio experimental (b) y con agua de mar sin enriquecer (c).

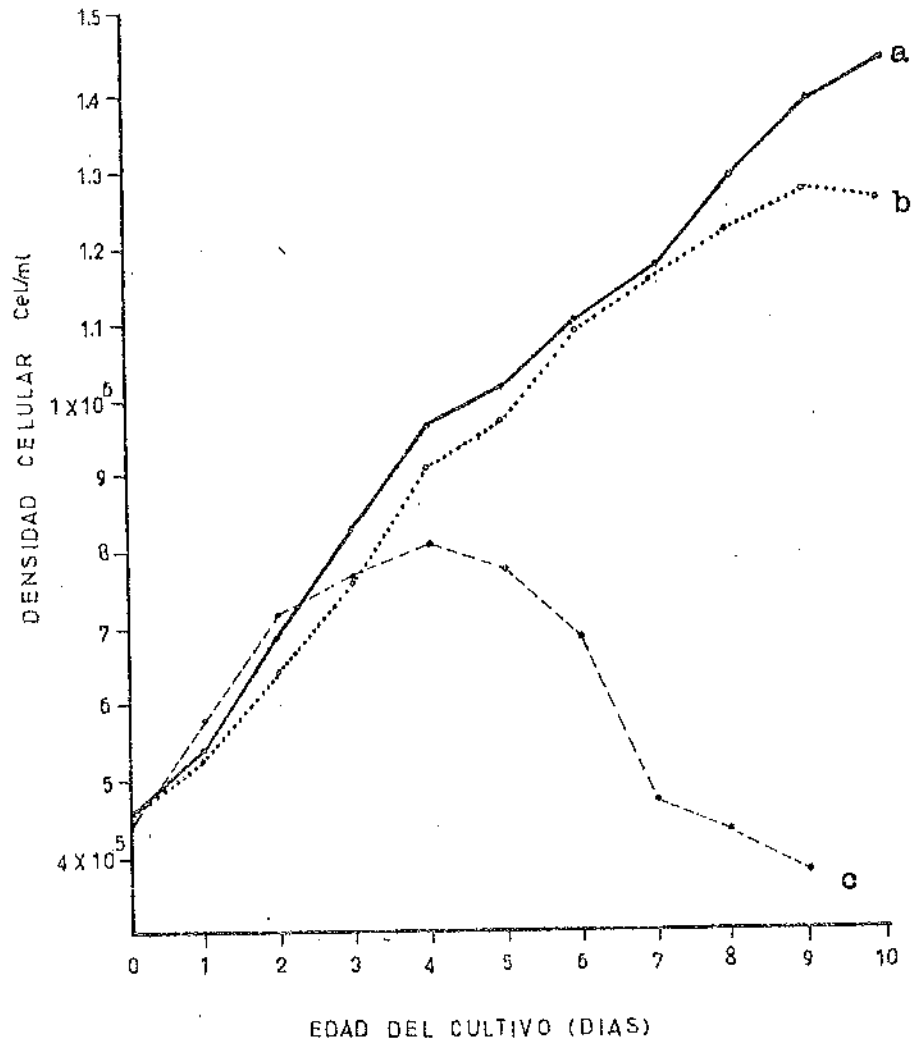


FIG.8 .- Curva de crecimiento de Isochrysis galbana cultivada en 500 litros de medio de cultivo control(a) medio de cultivo experimental (b) y con agua de mar sin enriquecer (c).

fue de 211,500 cel/ml determinada al noveno día. La fase de crecimiento exponencial se detectó del primero al séptimo día de cultivo (Fig. 7-b).

En Isochrysis galbana, la densidad promedio máxima fué de 1,273,075 cel/ml determinada al noveno día de crecimiento. Se observa la fase de crecimiento exponencial del primero al sexto día, presentandose posteriormente la fase estacionaria hasta el décimo día para culminar con la fase de muerte al día doce (Fig. 8-b).

5.2.3 Cultivo Testigo (agua de mar exenta de nutrientes)

En los Apendices M y N se indican las concentraciones celulares obtenidas para Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana en los cultivos con agua de mar sin adición de nutrientes.

Se observó una densidad máxima de 140.000 cel/ml al quinto día de crecimiento en Tetraselmis suecica, mientras que para Isochrysis galbana, fué en el cuarto día de crecimiento cuando se alcanzó una concentración de 812,000 cel/ml.

En Tetraselmis suecica la fase exponencial se determinó del primero al tercer día con concentraciones de 30,000 y 129,000 cel/ml. La fase estacionaria solo duro un día y del día cinco al diez sobrevino la muerte del cultivo (Fig.7-c).

La fase exponencial en Isochrysis galbana se observó del primero al segundo día de crecimiento con concentraciones de 580,900 y 724.600 cel/ml respectivamente, para posteriormente continuar con la fase de muerte microalgal, del quinto al noveno día de crecimiento del cultivo (Fig. 8-c).

El análisis estadístico no indicó una diferencia significativa entre el medio control y el medio experimental para Tetraselmis suecica, en base a la prueba "t" de Student (Apéndice D).

Para el caso de Isochrysis galbana, estadísticamente se estableció que si existía una diferencia significativa al cultivar las microalgas en el medio control y el medio experimental (Apéndice P).

La interpretación estadística del Anova practicado para cada especie en sus respectivos medios control, experimental y testigo, apoyaron los resultados reportados por la prueba

"t" de Student, que nos muestra que para Tetraselmis suecica no hubo diferencias al hacer la estimación a un nivel del 5% de significancia, mientras que para Isochrysis galbana si se detectaron diferencias altamente significativas en la estimación al 5% y 1% (Apéndice Q).

6. DISCUSIONES

Por la finalidad de esta investigación, no se exploraron a fondo los mecanismos físicos y bioquímicos que se presentan y dan origen a la obtención de los nutrientes orgánicos a partir de los productos biodigeridos.

Experiencias y resultados al respecto se pueden encontrar en los trabajos reportados por Granados-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984; Paniagua-Michel y Buckle-Ramírez, 1984; y Paniagua-Michel, 1984.

Considerando que la combinación de extractos presentan una gran gama de elementos químicos asimilables por las microalgas (Apéndice H), en éste caso solo se examinaron para la elaboración de las proporciones orgánicas enriquecidas, los macronutrientes encontrados en cada producto, como lo fueron, los Nitratos, Fosfatos y Amonio, los resultados de sus concentraciones se comparan por su similitud a los encontrados por Paniagua-Michel (op. cit.) los cuales sirvieron de base para realizar las proporciones orgánicas enriquecidas.

Durante el desarrollo de este trabajo, se presentaron ciertos problemas que impedían o retrasaban la

secuencia de los ensayos, como lo fueron la contaminación de los cultivos por bacterias y protozoarios no identificados o de una microalga a otra (en especial de Tetraselmis suecica sobre Isochrysis galbana), insuficiencia de nutrientes en los biodigeridos por el mal procesamiento de los productos, lo cual iba aunado a la falta de experiencia, desajustes de pH y salinidad en el medio de cultivo, así como una serie de factores físicos y químicos que se discutirán sobre la marcha de este capítulo.

Originalmente se tenía programado lograr la producción de las microalgas alimentándolas con los nutrientes orgánicos desde el nivel Erlenmeyer (lo que sería prácticamente el acondicionamiento de la cepa), para de esta manera ser transferida sucesivamente a los respectivos niveles de cultivo. Pero como se mencionó anteriormente se presentaron contratiempos y problemas técnicos que impidieron la secuencia de cultivo para poder llevar a cabo la alimentación orgánica desde el nivel Erlenmeyer al nivel tanque.

Debido a lo anterior, se recurrió a modificar la metodología original, combinándose para tal efecto los 2 métodos de alimentación; el inorgánico de Matthiessen y Torner (op. cit.) del nivel Erlenmeyer, hasta parte del nivel Carboy, y el de alimentación orgánica (Paniagua-Michel et al.) a partir del nivel Carboy al nivel tanque, cumpliendo de

esta manera aunque ya menos significativo uno de los objetivos del presente trabajo; el minimizar los costos de producción de alimento para organismos filtroalimentadores de interés comercial.

Dentro de lo planteado en un principio, se utilizó para el nivel Erlenmeyer la razón 40 m.l de la proporción 4:2:1 donde 40 ml correspondían al biodigerido de Macrocystis pyrifera, 20 ml al biodigerido de estiércol de gallina y 10 ml del biodigerido de estiércol de vaca (Paniagua-Michel, op. cit.). Trascurridos siete días de cultivo en este nivel la concentración visual no igualaba ni superaba al control, por lo que se hicieron ajustes de pH al medio experimental, se cambió gradualmente la proporción de extractos y ni de ésta manera alcanzaba a los ocho días la concentración deseable para poder ser transferido al Nivel Fernbach.

Visto lo anterior se procedió a iniciar el cultivo a partir del Nivel Fernbach, cambiando la razón de nutrientes proporcional a 1.5 litros de agua de mar.

Se obtuvieron resultados favorables sobre todo en Tetraselmis suecica, pero estos no excedieron más allá de los seis días de crecimiento en el cultivo y por lo tanto no era posible su transferencia a Nivel Carboy.

En general para cualquiera de las dos especies, la

respuesta de crecimiento fue eficiente solo durante los primeros 4 días de vida del cultivo en estos niveles.

A pesar de que Paniagua-Michel *et al.*, (op. cit.) y Granados-Machuca *et al.*, (op. cit.) encontraron resultados satisfactorios en estos niveles trabajando con *Pavlova lutheri*, *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum*; Fábregas *et al.*, (1984) experimentando con *Tetraselmis suecica* en cultivos discontinuos, sin aireación y con un exceso de nutrientes (inorgánicos) encontró que los dos factores limitantes del crecimiento fueron el CO₂ y pH, los cuales podían o no relacionarse entre sí. Además determinó que tal exceso de nutrientes podía introducir otros factores limitantes como la toxicidad producidas por las concentraciones de TRIS. la presión osmótica y la falta de equilibrio en las reacciones iónicas.

Por otra parte, Fogg (1975) refiere que tarde o temprano la fase exponencial de un cultivo de algas en volumen limitado y condiciones controladas decae, mencionando que las razones pueden ser por el agotamiento de nutrientes, Oxígeno y CO₂, alteración de pH, deficiencia en la penetración de luz del cultivo y autoinhibición. Tales factores limitantes se describen mas adelante en lo que se refiere a Nivel Tanque, ya que en este también se presentaron dichos factores.

Una vez que se trabajo directamente enriqueciendo los Carboys experimentales se obtuvieron mejores resultados.

Un factor favorable de haber inoculado un Carboy experimental (con uno control) para obtener una concentración aceptable, fue precisamente la inoculación del medio de microalgas cultivadas previamente en un ambiente rico en nutrientes y en particular nitratos (tal como el medio de Matthiessen y Tonner, 1969).

A este respecto, Caperon y Meyer (1972) señalan que las tasas de crecimiento del fitoplancton no dependen de las concentraciones ambientales, sino de la experiencia de nitratos durante el período precedente al cultivo en el cual se hizo la estimación de crecimiento.

Eppley y Thomas (1969) Collos (1982), postulan que el nitrógeno es uno de los nutrientes más limitantes en la producción y tasa de crecimiento de fitoplancton. El fitoplancton requiere como materia prima para el anabolismo de proteínas y formación de protoplasma celular, el nitrógeno inorgánico usualmente en forma de nitratos.

Otro de los nutrientes limitantes del crecimiento algal es el fosfato, ya que se considera la fuente de energía de

los procesos metabólicos, su deficiencia en los cultivos ocasiona según Chu (1943) entre otras cosas, la decoloración de las microalgas. Lo que sucedió al menos en ese nivel del quinto al décimo día de cultivo, cuando se experimentaba añadiendo diferentes proporciones al cultivo, para de esta manera determinar cual era la que facilitaba un crecimiento mas eficiente en las microalgas.

En base a lo anterior, se escogio la proporción 4:1:1 donde 400 ml. corresponden al biodigerido de estiércol de gallina, 100 ml. al biodigerido de estiércol de vaca y 100 ml. al biodigerido de la macrofita.

La razón de haber elegido mayor volumen del biodigerido de estiércol de gallina en este Nivel, fué porque como se observa en la tabla I, se encontró mayor concentración de fosfatos en comparación con el de vaca y la macroalga, debido probablemente a que el animal recibe una dieta con gran contenido de fosfatos en condiciones fáciles de digerir (Granados-Machuca y Paniagua-Michel, op. cit.). Además de contener aunque menos que en el extracto de estiércol de vaca, una concentración considerable de nitratos y amonio.

De acuerdo a lo anterior, al agregar esta proporción al cultivo experimental, se logró una concentración y coloración

de las microalgas mas aceptable para poder ser transferido a los ocho días a su correspondiente nivel Tanque.

Después de enriquecer el agua de mar con los extractos biodigeridos en el medio de cultivo experimental la salinidad bajo 2‰ quedando 30‰, lo cual no afectó significativamente la salinidad requerida por Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica que son dos especies eurihalinas.

Laing y Utting (1980) encontraron que los rangos de salinidad óptima para el crecimiento en el medio preparado a partir de agua de mar artificial se encontraron entre 15-25‰ para Isochrysis galbana y 25-30‰ para Tetraselmis suecica.

El pH del medio experimental (7.5) se mantuvo en el rango requerido para el crecimiento del fitoplancton (7.2-8.4) (Guillard, 1972). Este valor posiblemente se deba a las combinaciones de los extractos con el agua de mar, ya que el pH del agua de mar es aproximadamente 8 y el de los extractos fué en promedio de 7.5.

Considerando que las microalgas cultivadas en el medio experimental a Nivel Carboy provenían de un ambiente rico en Nitratos y Fosfatos, la preparación de la combinación de extractos para Nivel Tanque se elaboró con mayor volumen de biodigerido de Macrocystis pyrifera, tomando como antecedente

las experiencias de Paniagua-Michel y Buckle-Ramírez (1984).

El extracto de macrofita estimula el crecimiento y la actividad metabólica en las plantas debido a la presencia de auxinas y giberelinas hormonas promotoras y reguladoras del crecimiento de células vegetales respectivamente (Stephenson, 1974). El contenido químico de los extractos de macroalgas (NO_3 , PO_4 , SiO_2 , Cu, Zn, Co, Mn, vitaminas B1 y B12, quelantes orgánicos, auxinas, giberelinas aminoácidos, elementos traza y otros compuestos) hace posible en la práctica la producción de las microalgas a este nivel por tratarse de un sistema abierto y de mayor volumen, donde el cultivo debe aumentar su producción de biomasa ya que es en este nivel donde se cosecharán las microalgas para servir de alimento a los organismos consumidores.

La proporción elegida para este nivel esta apoyada en la que utilizó Paniagua-Michel (1984) al cultivar en un volumen de 2.7 litros la microalga Skeletonema costatum. Dicho autor preparó su medio de cultivo tomando 4 partes del extracto de Macrocystis pyrifera, 2 del biodigerido de vaca y 1 parte del extracto de estiércol de gallina aforados a 100 ml de agua de mar.

En esta investigación se eligieron para la alimentación

del cultivo; 8 partes del extracto de Macrocystis pyrifera, 4 partes del biodigerido de estiércol de gallina y 4 partes del biodigerido de vaca.

La importancia esencial de los estiércoles de origen animal radica en su contenido de Nitrógeno, Fósforo, Potasio y sustancias promotoras del crecimiento como la creatina, Auxinas y Acido B indol acético, además de elementos traza en menor cantidad (Teusher y Adler, 1982).

Granados -Machuca y Buckle-Ramírez (1984) realizaron una comparación química cuantitativa de mezcla de los estiércoles de gallina y de vaca con el medio químico convencional, encontrando que la concentración de nutrientes en tal mezcla era alrededor de un 99 % mas baja que el medio de cultivo Matthiessen y Toner (1966). Aun así, obtuvieron un crecimiento aceptable comparado con el control, de la microalga Monochrysis lutheri.

La razón de haber aplicado CO₂ al cultivo al tercer día de crecimiento fue porque el cultivo bajaba en 1.5 unidades el pH al ser agregada la proporción de nutrientes en agua dulce, siendo tal vez esta una de las causas por las que en los primeros ensayos no se obtuvieron buenos resultados cuando no se aplicaba éste. Según Guillard (1975) la

aplicación de CO_2 en cultivos de volumen limitado mantiene constante los niveles de pH.

Fábregas, et. al., (1984) realizando estudios con Tetraselmis suecica en cultivos discontinuos con diferencias en concentraciones de salinidad y nutrientes encontró que la fuente de carbono fué el factor limitante debido a que el incremento en la concentración de nutrientes no produjo un incremento en la producción de biomasa, pero la adición del CO_2 a los cultivos incremento la producción final de la misma. Lo que hizo suponer que también en el presente trabajo la fuente de carbón pudo influir de manera significativa en la producción microalgal justo a inicios de la fase exponencial (tercer día).

En general , la curva de crecimiento para las dos especies en el medio experimental, solo presentó tres fases del crecimiento microalgal en cultivos de volumen limitado que fueron: La fase de inducción, observada a partir del día de inoculación (cero) hasta el primer día de cultivo, la fase exponencial del día dos al séptimo y finalmente la muerte microalgal del día nueve al onceavo de cultivo.

Por lo anterior se deduce que en este tipo de cultivos el tiempo de cosecha debe ser a partir del día siete y ocho

por lo que se denota una ventaja al hacer posible un cultivo masivo que alcance una concentración óptima para ser cosechado en un tiempo relativamente corto comparado con los cultivos convencionales. Aunque la desventaja también presente es que si no se cosecha en este tiempo, el cultivo decae, provocando un desperdicio en la mano de obra y material invertido.

Como se observa en las figuras 5-C y 6-C se aprecia un mejor crecimiento en el medio experimental para cualquiera de las dos especies cuando se le adicionaron los nutrientes a la mitad de la proporción inicial en el segundo día de crecimiento. Esta práctica se realizó debido a que se observó como lo muestra la figura 5-A,B y 6-A,B que el crecimiento microalgal decaía al llegar al día cinco, sin alcanzar siquiera a su máximo la fase exponencial. Esto obligó a suponer; ó que las microalgas asimilaban de manera activa y rápida los nutrientes presentes en la combinación de extractos, ó que tales extractos no contenían los suficientes requerimientos nutricionales requeridos por el fitoplancton, ya que como se observa en las curvas de crecimiento, durante los primeros cuatro días el cultivo experimental sobrepasa de manera poco significativa al cultivo control, pero transcurridos estos cuatro días las algas ya no tenían la suficiente fuerza y vigor de crecimiento para entrar y

continuar con la fase exponencial. Al respecto Fogg (1975), señala que tarde o temprano la fase exponencial en un cultivo de volumen limitado tiende a decaer y las razones que menciona y que pueden coincidir con las de este trabajo son: el agotamiento de nutrientes, indicando que en los medios de cultivo tradicionales a menudo hay agotamiento de nitratos y fierro, y de no agregarse éstos al cultivo se limitará la fase exponencial; Oxígeno y CO_2 , en cultivos sin movimientos con nutrientes minerales el grado de difusión del Dióxido de Carbono a partir de la atmósfera a menudo no es suficiente, por lo que se debe proporcionar aireación y CO_2 para prolongar la fase exponencial (lo que sucedió en los niveles Erlenmeyer y Fernbach); Alteración del pH, como resultado de la absorción preferencial de algún constituyente del medio, pueden presentarse cambios en el pH del cultivo. Es un hecho común que cuando la fuente de Nitrógeno es una sal de Amonio, la absorción preferencial del ión Amonio trae como consecuencia la acidificación del medio. La absorción preferencial del ión Nitrato produce una alcalinización del medio cuando se tiene una fuente pobre en Dióxido de Carbono; Efecto de sombreado, conforme la densidad algal se incrementa, la penetración de luz disminuye ocasionando que el crecimiento exponencial se vuelva lineal; Autoinhibición, hay claras evidencias de que ciertas algas producen metabolitos tóxicos para si mismas en una concentración dada

más no han determinado cuales sustancias son, aunque se sabe que producen una estabilización en la población, la cual no aumenta ni disminuye a no ser por la existencia de otro factor limitante.

Vistas las experiencias anteriores, se sugirió entonces la adición de nutrientes al segundo día y la aplicación de CO₂ al tercer día justo para que en estos tuvieran la suficiente energía de crecimiento para entrar a la fase exponencial y alcanzar un crecimiento eficiente comparado con el control.

Práctica y estadísticamente se estableció que Tetraselmis suecica presento un crecimiento más eficiente que Isochrysis galbana. Esto era de suponerse ya que como menciona Laing (op. cit.) Tetraselmis suecica presenta condiciones morfológicas y características de cultivo más favorables que Isochrysis galbana. Parés y Alonso (1982) trabajando en cultivos semicontinuos con nutrientes inorgánicos para encontrar un factor de dilución en los mismos, indican que Isochrysis galbana mostro ser siempre más difícil de cultivar que Tetraselmis suecica siendo esta ultima propensa a contaminarse y muy sensible a cambios en condiciones fisico-químicas, como medio de cultivo y temperatura. Señalando también que Tetraselmis suecica se

cultivo en invierno. bajo condiciones rudimentarias y sin control de temperatura y luz, mostrando ser una especie más resistente y fácil de cultivarse.

Se discute al respecto que se registró una producción aceptable de las microalgas utilizadas en esta investigación (solo en menor grado para Isotrichysis galbana) al utilizar los nutrientes orgánicos como alternativa de los convencionales, aunque cabe mencionar que es problemático valorar energéticamente una fórmula de este tipo, de manera que la técnica es un tanto empírica y solo parcialmente controlable debido a la heterogeneidad en la calidad y procesamiento de los materiales utilizados.

7. CONCLUSIONES

1. La producción masiva de las microalgas sólo fue posible combinando los dos métodos de enriquecimiento; el inorgánico y el orgánico.

2. Las densidad y cinética de crecimiento de Tetraselmis suecica en el cultivo experimental, no fue significativamente diferente a la registrada en el cultivo control.

3. Isochrysis galbana si presentó una diferencia significativa al cultivarla en el medio control y en el medio experimental.

4. El tiempo de cosecha de las microalgas cultivadas en el medio orgánico es menor, comparado con el del medio control.

5. Se registró una producción aceptable en Tetraselmis suecica y en menor grado para Isochrysis galbana al utilizar los nutrientes orgánicos.

RECOMENDACIONES

1. Comprobar el valor alimenticio de las microalgas cultivadas en el medio experimental mediante un análisis de la composición bioquímica gruesa de estas.
2. Continuar añadiendo a la cantidad necesaria de proporción de extractos al cultivo cada determinado tiempo, con el fin de determinar si se prolonga la fase exponencial y estacionaria de acuerdo al tiempo reportado en este trabajo.
3. Considerando la riqueza en nutrientes orgánicos de los extractos biodigeridos, realizar experimentos con estos en el campo de la Botánica Terrestre enfocándolos directamente en aspectos de Hidroponía.

LITERATURA CITADA

- Adams, C. E., W. E., W. Eckenfelder, y R. Stein. 1974. Modification to aerobic digestors design. Wat. Res. 8:213-218.
- Antia, N. J. y J. Y. Cheng. 1970. The survival of axenic cultures of marine planktonic algae from prolonged exposure to darkness at 20 C Phycologia 9:179-183.
- Allen, E.J. 1914. On the culture of plankton diatom Talassiosira gravida CLEVE in the artificial seawater. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 10: 417-439.
- Brody, O. 1979. Effect of design on economy of aerobic digestion. J. Environ. Eng. div. EE 2 : 283-400.
- Caperon, J. y J. Meyer. 1972. Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton. II. Uptake Kinetics and their role in nutrient limited growth. Deep-Sea Res. 19: 619-632.
- Caperon, J. 1981. Population growth response of Isochrysis galbana to nitrate variation at limiting concentrations. Ecology 49: 866-872.
- Collos, Y. 1982. Transient situations in nitrate assimilation by marine diatom. II. Short term uncoupling of nitrate uptake and reduction. J. Exp Mar. Biol Ecol. 62(1):285-295.
- Collos, Y. 1983. Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. 4. Nono-linear phenomena and the estimation of the maxmun uptake rate. J. of. pl. Res. 5: 677-691 p.
- Chu, S.P. 1943. The influence of the mineral composition of the medium on the growyh of plankton algae. J. Ecol. Vol. 30: 284-355.

- De la Cruz, S. A. y E. Alfonso. 1975. Cultivo masivo de algas planctonicas marinas mediante fertilizacion. Ciencias, 9: 1-25.
- De Pauw, N. y L. De Leenheer. 1979. Mass culturing of marine and freshwater algae on aerated swine manure. European Mariculture Society. 4: 441-473.
- Droop, M.R. 1969. Some chemical considerations in the design of synthetic culture media of marine algae. Bot. Marine 2, 231-46.
- Epifanio, C.E. 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the american oyster Crassostrea virginica (GMELIN) and the hard clam Mercentaria mercenaria (L.). Aquaculture, 18: 1-12.
- Eppley, R.W. y W.H. Thomas. 1969. Comparision of half saturation constant for growth and nitrate uptake by Marine Phytoplankton. J. Phycol 5: 375-379.
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Veiga M., 1984. Growth of the marine microalga Tetraselmis suecica in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture, 42: 207-215.
- Farmintzin, A. 1871. Die anorganischen salze als ausgezeichnetes hilismittel zum studium der entwicklung niederer chlorophylhaltiger organismen. Bull Acad. Sci. 17-31.
- Fogg, G. E. 1975. Algal cultures and phytoplankton ecology 2nd. Ed. The University of Wisconsin Press., 175 pp.
- Granados C. Machuca y Paniagua-Michel, J. 1981. Obtencion de dos medios economicos para el cultivo de fitoplancton bajo condiciones controladas. Tesis Profesional. Escuela Superior de Ciencias Marinas (UABC).

- Granados C. Machuca y L. F. Buckle-Ramirez. 1984. Cultivo de las microalgas Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. An. Inst. Cienc. Del Mar y Limnol. Univ. Auton. Mexico, 11 (1) 241-256.
- Guillard, R. R. and J. H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea (CLEVE). Gran Can. J. Microbiol. 8:229-238.
- Guillard, R. R. L. 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of marine invertebrates animals. New York: Plenum, 409 pp.
- Guillard, R. R. 1973. Division rates, p. 289-311. En: Hand book of phycological methods (J. R. Stein, ed.) Cambridge University Press., New York. 448 pp.
- Helm, M. M. 1977. Mixed algal feeding of Ostrea edulis larvae with Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 57: 1019-1029.
- Helm, M. M., Laing, I. and Jones, E. 1979. The development of a 200 l algal culture vessel at Conwy. Fish. Res. Tech. Rep., Maff. Direct. Fish. Res., Lowestoff, 53 (1): 1-7.
- Irvine, R. y R. O. Richter, 1978. Comparative evaluation of sequencing batch reactors. J Environ. Eng. Div. EE3: 503-515.
- Jognston, R. 1964. Effect of gibberelinas on marine algae in in mixed cultures. Am. Assoc. Adv. Sci. 270-275.
- Koers, D.A. y D. S. Mavinic. 1977. Aerobic digestion of waste activated sludge a low temperature. J. Wat. Pollut. Cont. Fed. 460-468.
- Kubitschek, H. E. 1970. Introduction to research with continuous culture. New Jersey: Prentice-Hall, 103 p.

- Laing, I. and Utting, S. 1980. The influence of salinity on the production of two commercially important, unicellular marine algae. Aquaculture, 21: 79-86.
- Laing, I., 1985. Factors affecting the large-scale production of four species of commercially important marine algae. Aquaculture, 44:161-166.
- Loosanof, V. L. and Davis, H. C. 1963. Rearing of bivalve Molluscs. Advances in Marine Biology, 1: 136.
- Matthiessen, G. C. and Toner. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's Country, Massachusetts. Mar. Res. Fund, 138 pp.
- Milton, R. F. 1964. Liquid seaweeds as fertilizers. Intl. Seaweed Symposium. Spain. 4: 428-431 pp.
- Miquel, P. 1892. De la culture artificielle des diatomees. Le diatomiste. 1-18 pp.
- Padilla, M. G. 1975. Crecimiento poblacional de Tetraselmis suecica (chlorophyceae) en ambiente controlado. Rev. Biol. Mar. Valparaiso, 15 (3): 287-296 p.
- Paniagua-Michel, J. J. 1984. Cultivo de fitoplancton marino bajo condiciones controladas en un medio elaborado con productos naturales biodigeridos (CICESE). Tesis de Maestría.
- Paniagua-Michel, J. y L. F. Buckle-Ramírez. 1984. Cultivo en condiciones controladas de Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con extractos de macrofitas marinas. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. (UNAM) 12 (5) 345-355 p.
- Parker, R. E. 1976. Estadística para Biólogos. 1ra Ed. Omega 136 pp.

- Pares, S. G. y Alonso, L. G. 1981. Cultivo semicontinuo de las microalgas Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica para su uso como alimento de larvas y adultos de Mytilus californianus. Tesis Profesional para obtener el Titulo de Oceanologo.
- Pillay, T. V. R. 1967. Actas del simposio mundial de la FAO sobre piscicultura en estanques de agua templada FAO Fish Rep. (44), vol. 3:1-423.
- Pringsheim, E. G. 1967. Pure cultures of algae. Hafner, New York, 119 pp.
- Provasoli, L. J., J. J. Molaughlin y M. R. Droop. 1957. The development of artificial media for marine algae. Arch. Microbiol. 25: 392-428.
- Romberger, H.P. and Epifanio, C.E. 1981. Comparative effects of diets consisting of one or two algae species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oyster Crassostrea virginica (GMELIN). Aquaculture, 25: 77-87.
- Stephenson, W. A. 1974. Seaweed agriculture and horticulture Conservation gardening and industrial sewage. Wat. Pollut. control. 659-662 p.
- Strickland J. D. H. and Parson, 1972. A practical Handbook of seawater analysis. Ottawa, Canada. pp. 310.
- Seur, S., C. M. Van den Berg, y J. P. Riley. 1982. Measurement of the metal complexing ability of exudates of marine macroalge. Limnol. Oceanogr. 27 (3): 536-543.
- Tenore, K. R. y W. M. Dunstan. 1973. Growth comparisons of cysters, mussels and scallops cultivated on algae grown with artificial medium and treated sewage affluent. Chesapeake. Sci. 14 (1): 64-66.
- Teusher, H. y R. Adler. 1982. El suelo y su fertilidad. CECSA, Mexico, 510 pp.

- Trotta, P. 1981. A simple e inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae. Aquaculture. 22: 383-387.
- Ukeles, R. 1976. Cultivation of unicellular plants, p. 375-465. en: Marine Ecology, Vol III (O. Kinne, ed.) Wiley Interscience, London. 577 pp.
- Voropayev, V. M. y A. P. Chechin. 1983. The growth of marine microalgae in cultures in the presence of gibberelina. Hidrobiol. Journal. 17 (3): 57-59.
- Walne, P. R. 1966. Experiments in large-scale culture of larvae of Ostrea edulis. L. Fishery Invest., Lond., Ser 2, 25 (4), 53 pp.
- Walne, P. R. 1974. Culture of Bivalve Mollusc, 50 years experience at Conwy. Fishing News Books, West Byfleet, 173 pp.
- Yang, P. Y. y C. J. Huang. 1981. Anaerobic and microalgal process kinetics for swine waste. J. Environ. Eng. Div. EE6: 1113-1127.

APENDICE A

Medio f/2 de Robert R. L. Guillard, para un litro de agua de mar filtrada.

Constituyentes	Fórmula	Gras/100 ml de agua destilada
<u>NUTRIENTES MAYORES</u>		
Nitrato de Sodio, granular, refinado	NaNO_3	7.5
Fosfato de Sodio monobásico	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
Silicato de Sodio metasoluble	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	3.0
<u>METALES TRAZA</u>		
Cloruro Férrico	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Soluciones primarias 2.65
Secuestrante	$\text{Na}_2\text{Fe} \cdot \text{EDTA}$	4.36
Sulfato Cúprico cristales finos	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2
Cloruro de Cobalto cristales finos	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0
Cloruro Manganoso cristales finos	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18.0
Molibdato de Sodio cristales finos	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.63

VITAMINAS

Biotina cristalina	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	1.0 mg
Cianocobalamina cristalina (B ₁₂)	$C_{63}H_{88}CoN_{14}P$	1.0 mg
Triamina Clorhídrica (B ₁)	$C_{12}H_{17}ClN_4Os$	200.0 mg

SOLUCION AMORTIGUADORA

TRIS	Hidroximetil amino-metano	200 gr en 1000 ml de H ₂ O destilada ²
------	---------------------------	--

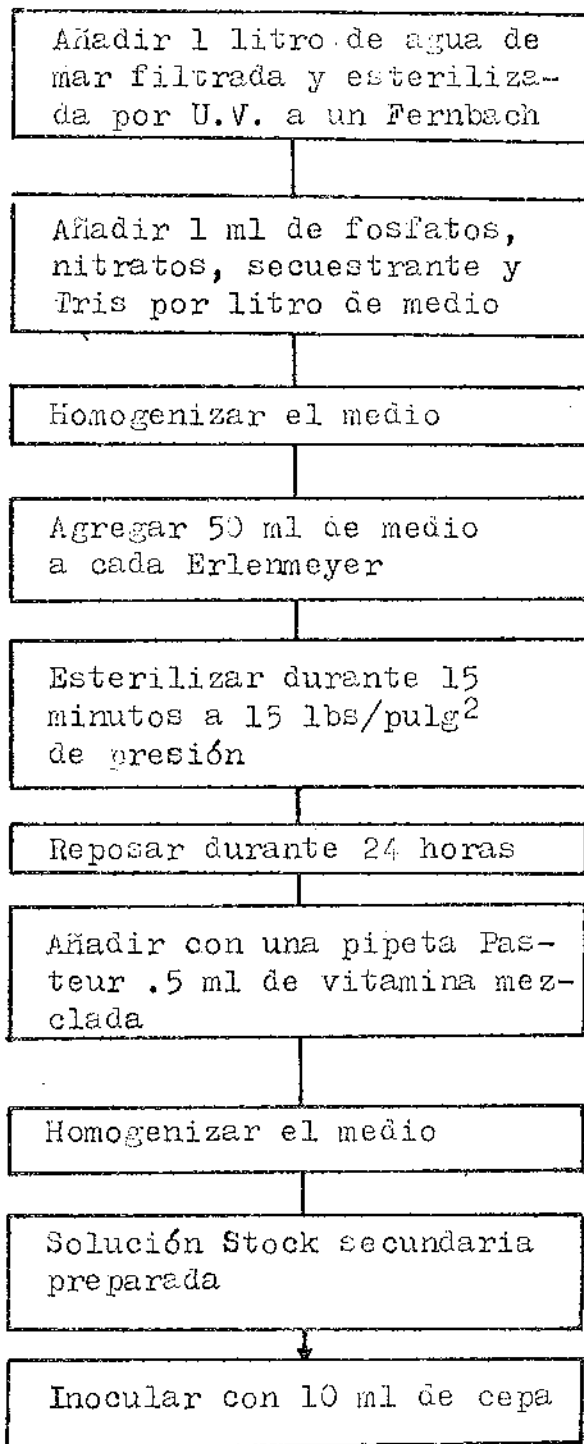
APENDICE B

Medio de Mattihessen & Toner, para un litro de agua de mar filtrada.

Constituyentes	Fórmula	Grs/1000 ml de agua destilada
<u>NUTRIENTES MAYORES</u>		
Nitrato de Sodio, granular, refinado	NaNO_3	150
Fosfato de Sodio, monobásico	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10
Silicato de Sodio metasoluble	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	30
<u>METALES TRAZA</u>		
Secuestrante	$\text{Na}_2\text{Fe} \cdot \text{EDTA}$	10
Sulfato Cúprico, cristales finos	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96
Sulfato de Zinc cristales finos	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4
Cloruro de Cobalto cristales finos	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0
Cloruro Manganoso cristales finos	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.9
Molibtato de Sodio cristales finos	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.26

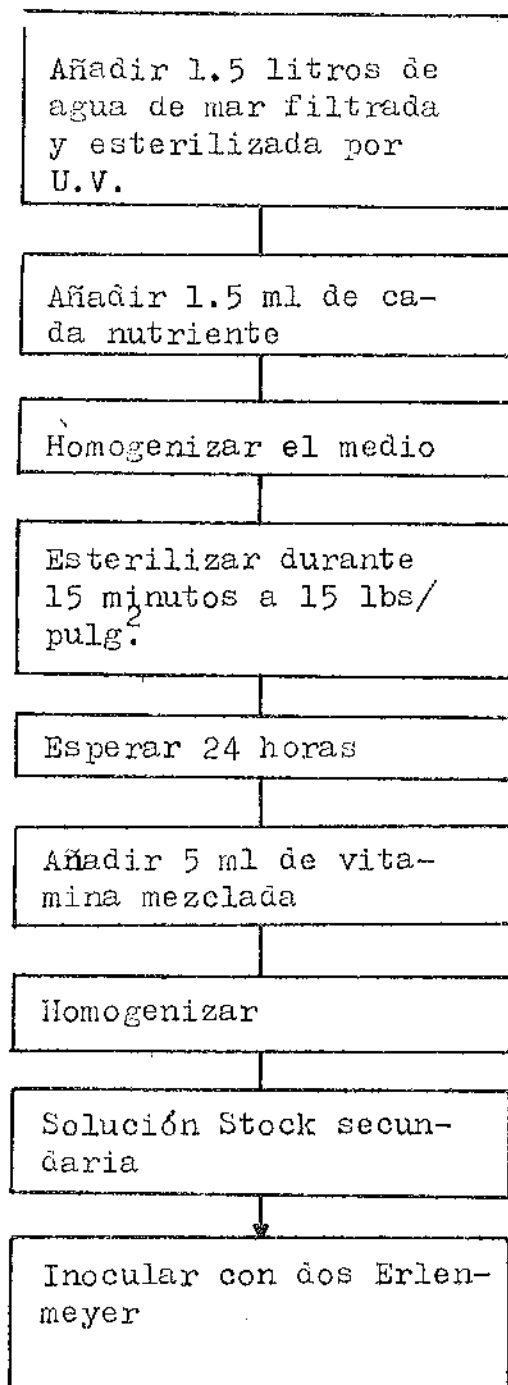
APENDICE C

Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo control en el Nivel Erlenmeyer.



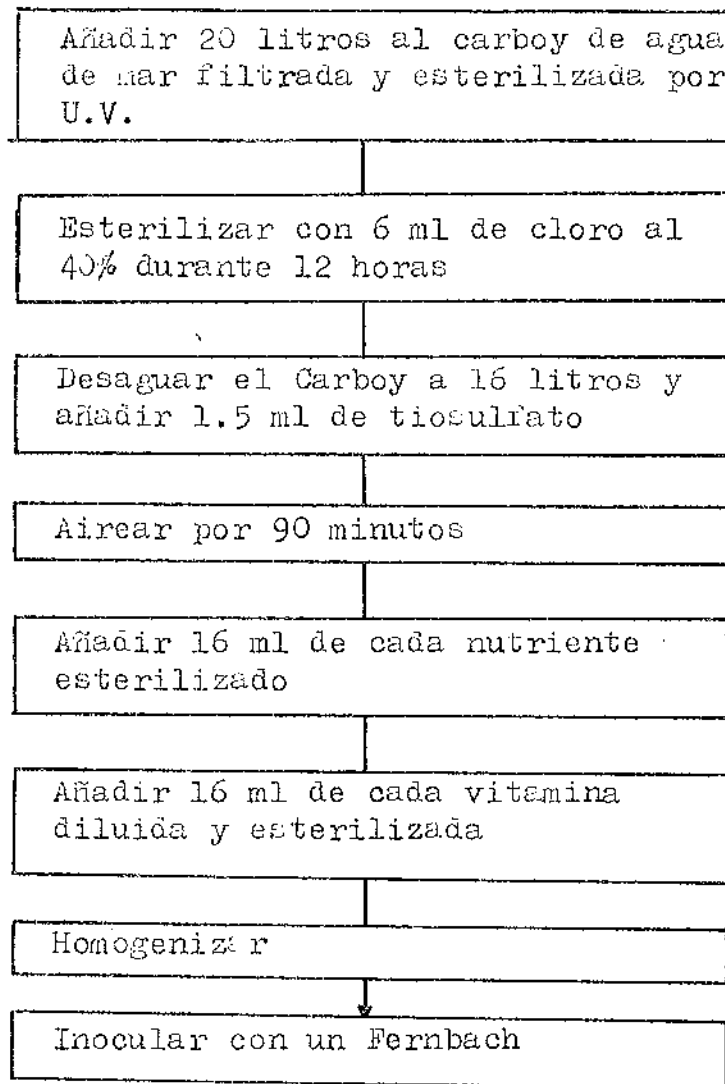
APENDICE D

Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo control en el Nivel Fernbach



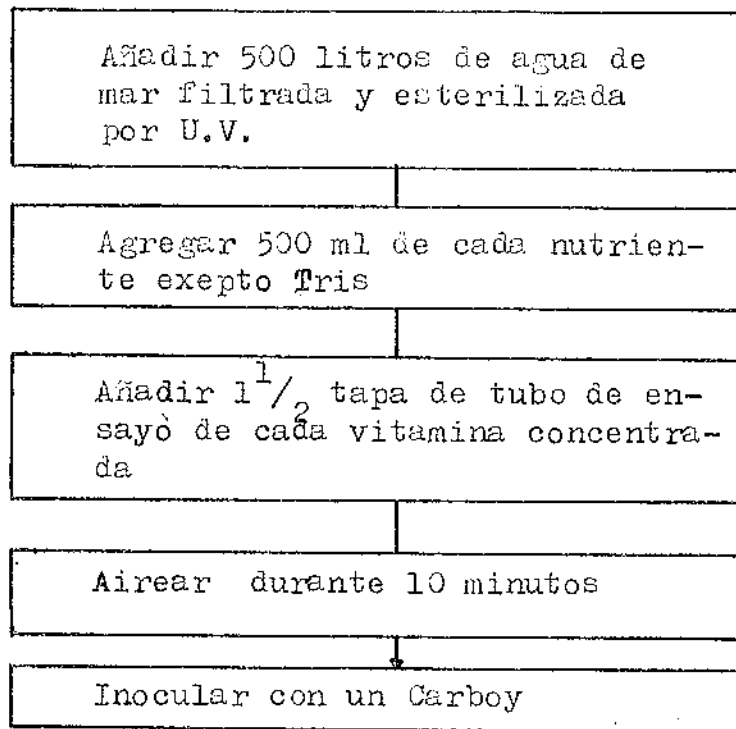
APENDICE E

Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo control en el Nivel Carboy

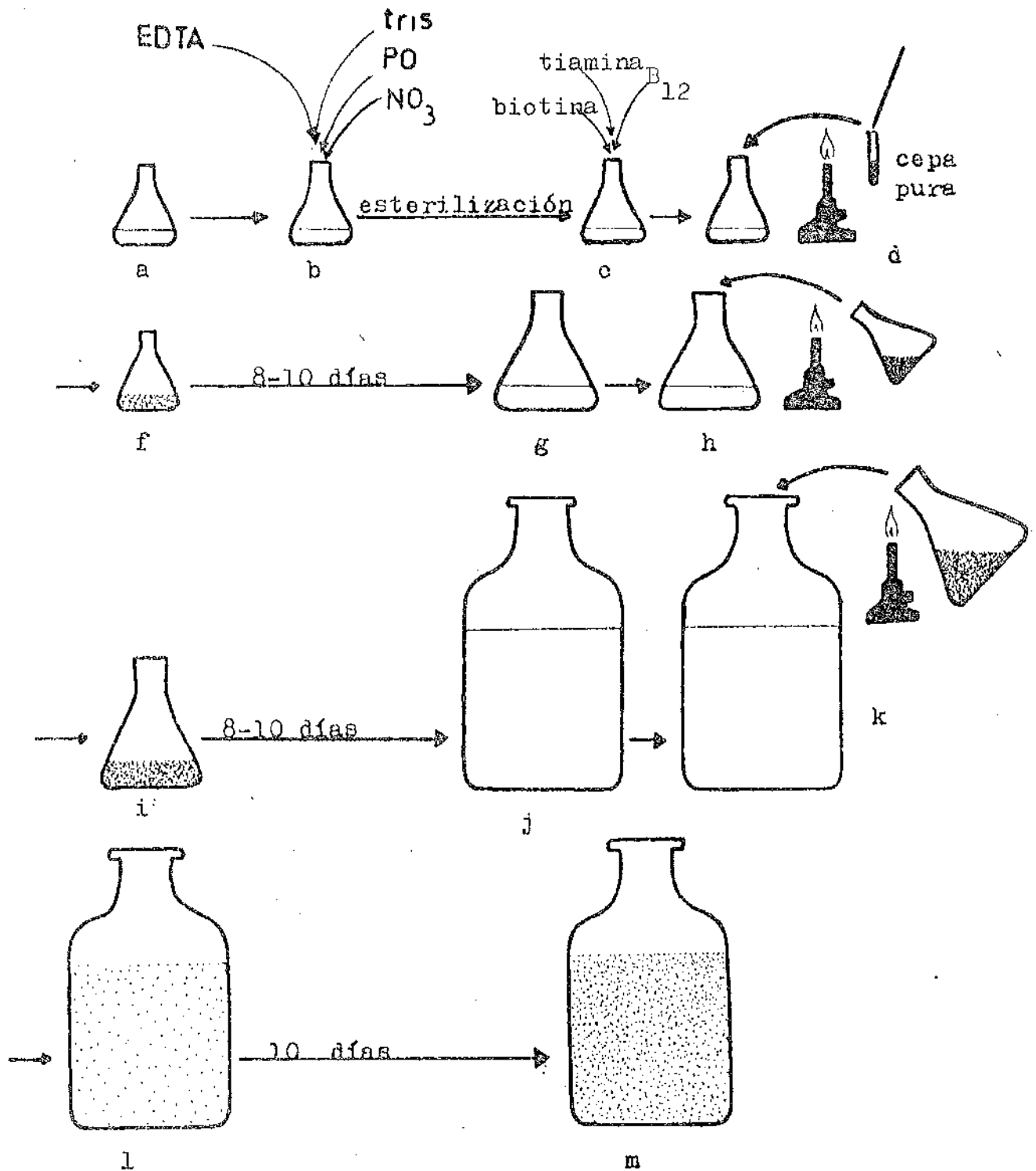


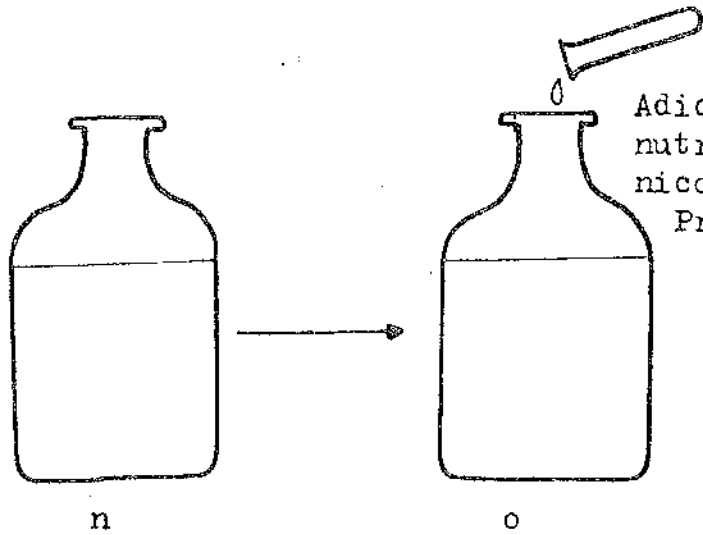
APENDICE F

Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo control en el Nivel Tanque.

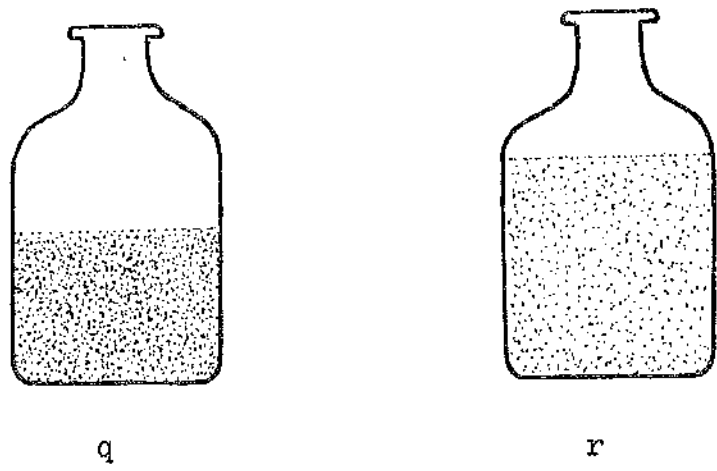
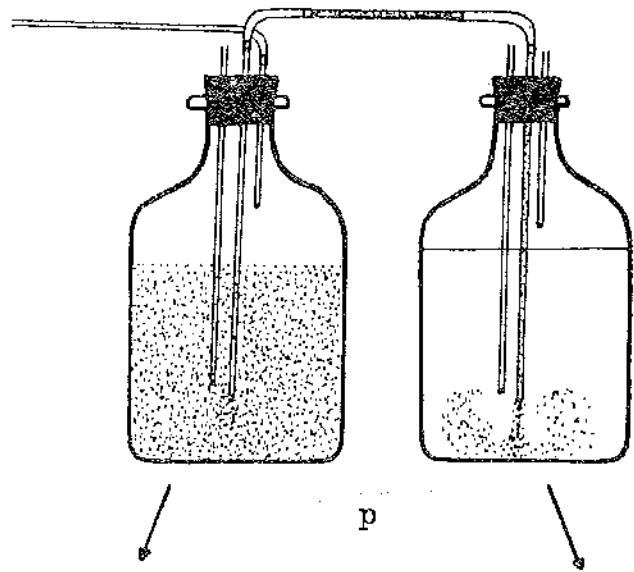


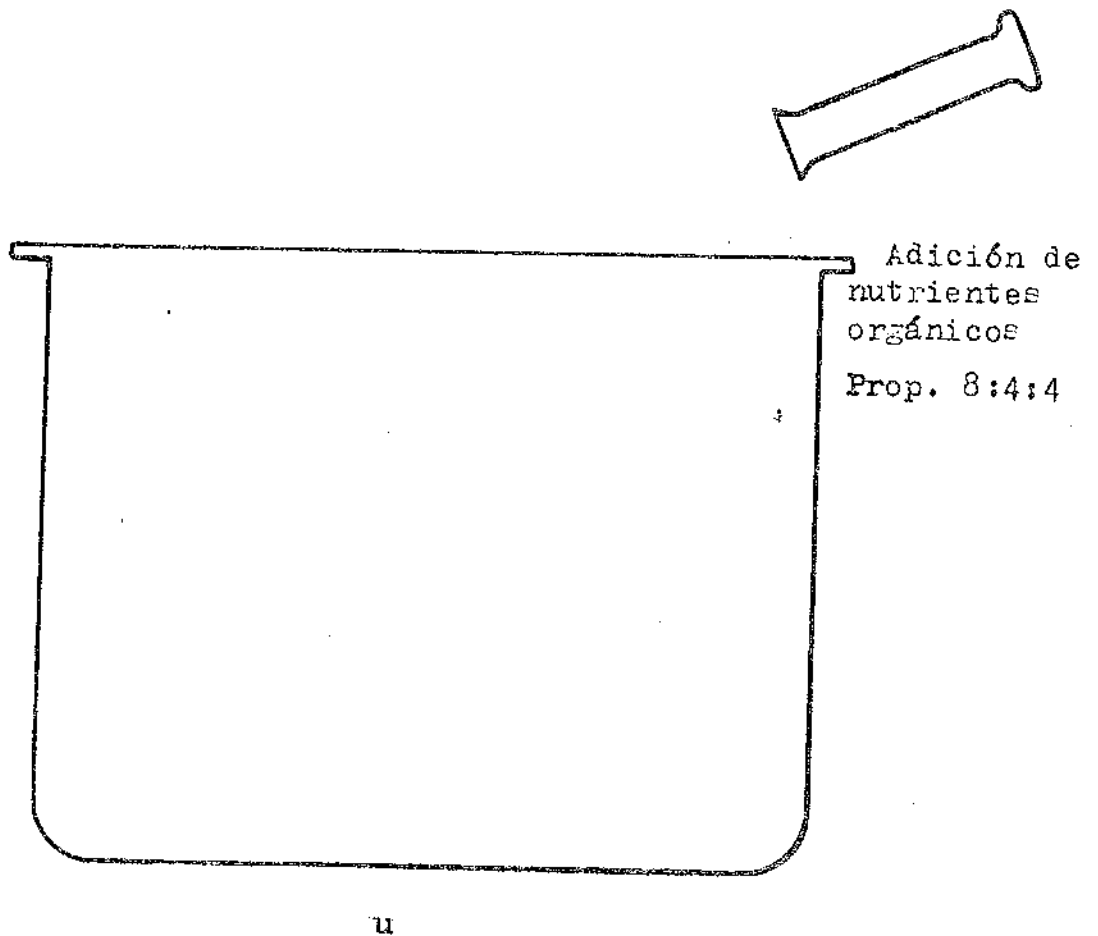
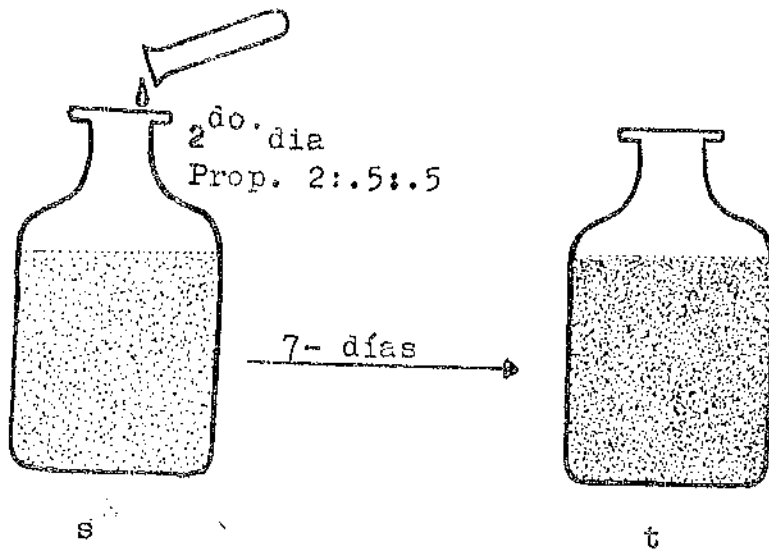
APENDICE G.- ESQUEMA SECUENCIAL DE LA METODOLOGIA PARA LLEVAR A CABO LA PRODUCCION MASIVA DE LAS MICROALGAS.

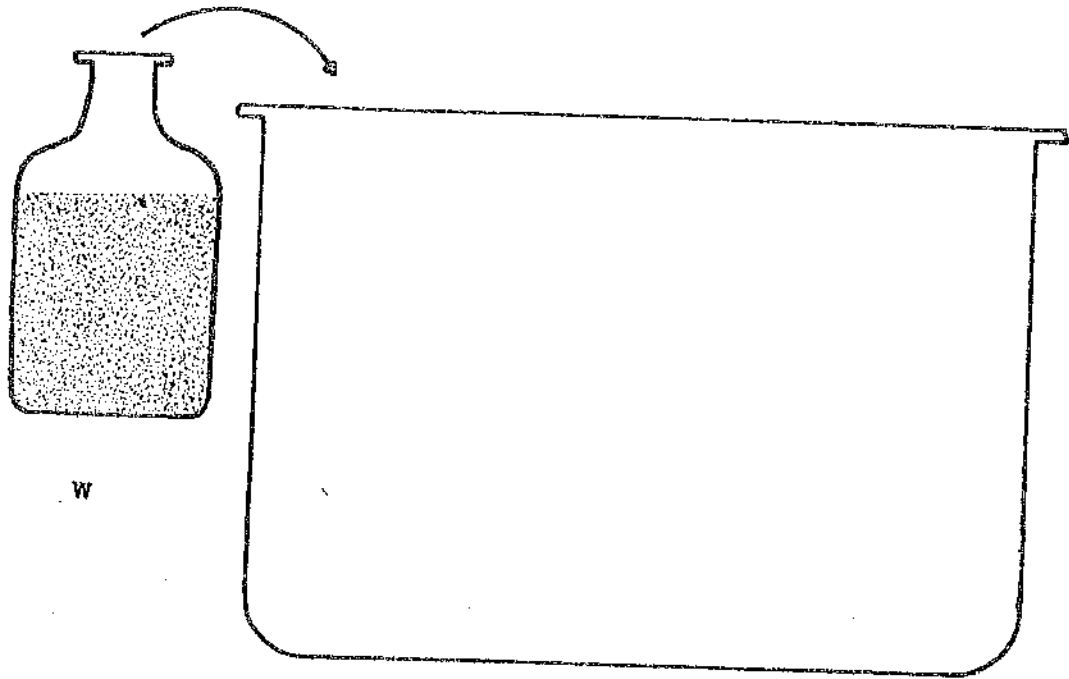




Adición de los
nutrientes orgá-
nicos.
Prop. 4:1:1





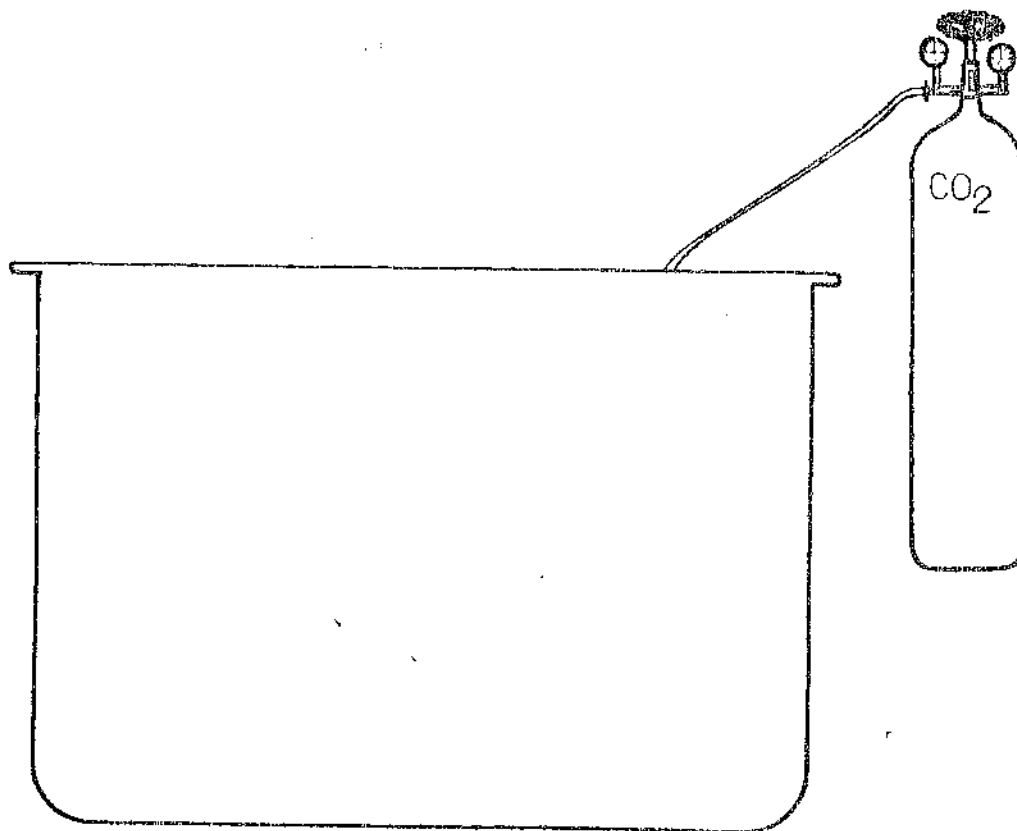


W

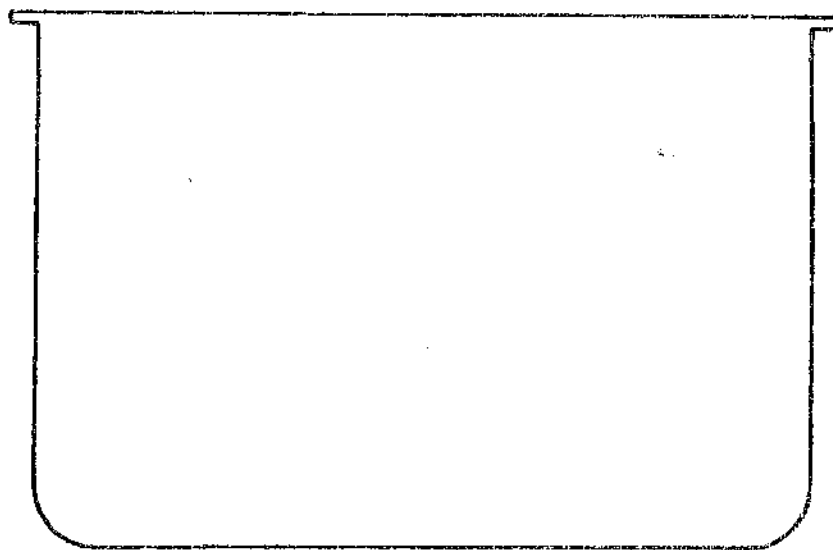


2^{do.} día
adición de
nutrientes
orgánicos
Prop. 4:2:2

X



y



z

Interpretación de las figuras del Apéndice G

- a).- 50 ml de agua de mar filtrada
- b).- Preparación de la solución Stock
- c).- Solución Stock secundaria
- d).- Inoculación de la cepa hacia el medio de cultivo Matthies-
ssen Toner
- f).- 50 ml de cultivo con microalgas
- g).- 1.5 lts. de medio de cultivo M. & Toner
- h).- Transferencia de microalgas del nivel E. Meyer al Fernbach
- i).- Fernbach con 1.5 lts. de cultivo de microalgas
- j).- Carboy con 16 lts. de medio de cultivo M. & Toner
- k).- Transferencia del nivel fernbach hacia el Carboy
- l).- Carboy con 16 lts. de cultivo con microalgas
- m).- Carboy concentrado listo para ser transferido
- n).- Carboy con agua de mar esterilizada para preparar el
medio de cultivo orgánico.
- o).- Preparación del medio de cultivo orgánico experimental
Donde: 400 ml de biodigerido de estiércol de gallina
100 ml de biodigerido de estiércol de vaca y 100 ml de
biodigerido de Macrocystis pyrifera.
- p).- Transferencia de las microalgas del medio de cultivo
inorgánico al medio orgánico, mediante la técnica de
cultivos semicontinuos.
- q).- Carboy cosechado reserva de microalgas destinadas a
ser transferidas a otros cuatro Carboys con medio or-
gánico.
- r).- Carboy experimental inoculado, se esperan diez días
para su crecimiento.
- s).- Adición de nutrientes orgánicos al segundo día del
inoculo. Proporción 2: .5 : .5
- t).- Carboy concentrado con 7 días de crecimiento, listo
para ser transferido al nivel tanque.
- u).- Tanque con 500 litros de agua de mar filtrada y este-
rilitada. Adición de los nutrientes orgánicos en la
proporción 8:4:4, donde; 800 ml de biodigerido de Macro-
cystis pyrifera, 400 ml de biodigerido de estiércol
de gallina y 400 ml de biodigerido de estiércol de vaca.

- w).- Transferencia del carboy experimental al nivel tanque experimental.
- x).- Al segundo día de crecimiento adición de los nutrientes orgánicos a la mitad de la proporción inicial.
- y).- Adición de CO_2 al tercer día de crecimiento
- z).- Cultivo experimental con 8 días de crecimiento, listo para ser cosechado

APENDICE H

Constitución potencial del medio experimental y del medio control.

COMPONENTES GENERALES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES (Guillard, 1973; Provasoli, et al, 1966).	CONSTITUCION POTENCIAL DE LOS DIGERIDOS DEL MEDIO EXPERIMENTAL (Stephenson, 1974; Teusher y Adler, 1982).
NUTRIENTES	
(+)	Nitratos (+)
(+)	Fosfatos (+)
(+)	Silicatos (+)
M. TRAZA	
(+)	Mo, Cu, Zn, Co, Mn (+)
(-)	Ca, Mg, K, Na, Li (+)
E.D.T.A. (+)	QUELANTE (+) Otras formas
TRIS (+)	AMORTIGUADOR (+) Otras formas
VITAMINAS	
(+)	Biotina (-)
(+)	Tiamina (+)
(+)	Cyanocobalamina (+)
S.P. DEL CRECIMIENTO	
(-)	Auxinas (+)
(-)	Giberelinas (+)
(-)	Creatina (+)
(-)	Ac. β indol acetico (+)

APENDICE I .- Densidades microalgales estimadas en las replicas del medio de cultivo control para Tetraselmis suecica

TIEMPO (Días)	REPLICAS DEL MEDIO DE CULTIVO CONTROL				DENSIDAD PROMEDIO Cel/ml.
	1	2	3	4	
0	30,000	30,000	19,000	30,000	27,250
1	30,000	30,000	30,000	41,000	32,750
2	41,000	52,000	41,000	52,000	46,500
3	63,000	74,000	74,000	74,000	71,250
4	96,000	96,000	96,000	107,000	98,750
5	129,000	118,000	118,000	118,000	120,000
6	151,000	140,000	140,000	140,000	142,750
7	173,000	151,000	173,000	173,000	167,500
8	250,000	195,000	195,000	206,000	211,500
9	272,000	250,000	250,000	250,000	255,500
10	305,000	261,000	272,000	283,000	280,250

APENDICE J .- Densidades microalgales estimadas en las replicas del medio de cultivo experimental para Tetraselmis suecica.

TIEMPO (Días)	REPLICAS DEL MEDIO DE CULTIVO EXPERIMENTAL				DENSIDAD PROMEDIO Cel/ml.
	1	2	3	4	
0	13,000	13,000	8,000	13,000	11,750
1	19,000	19,000	30,000	30,000	21,750
2	52,000	41,000	41,000	52,000	59,500
3	85,000	85,000	74,000	74,000	79,500
4	107,700	107,000	118,000	107,000	109,750
5	140,000	140,000	140,000	140,000	140,000
6	162,000	151,000	162,000	162,000	159,250
7	184,000	184,000	195,000	195,000	189,500
8	206,000	206,000	206,000	217,000	208,750
9	195,000	206,000	217,000	228,000	211,500
10	195,000	195,000	217,000	217,000	206,000

APENDICE PK- Densidades microalgales estimadas en las replicas del medio de cultivo control para Isochrysis galbana.

TIEMPO (Días)	REPLICAS DEL MEDIO DE CULTIVO CONTROL				DENSIDAD PROMEDIO Cel/ml.
	1	2	3	4	
0	475,100	475,100	475,100	431,400	464,175
1	518,700	562,400	562,400	518,700	540,550
2	649,800	693,500	737,200	693,500	693,500
3	824,600	824,600	868,300	824,600	835,525
4	999,300	955,600	955,600	999,300	977,450
5	1,043,000	999,300	999,300	1,043,000	1,021,150
6	1,086,700	1,086,700	1,130,400	1,130,400	1,108,550
7	1,174,100	1,174,100	1,174,100	1,174,100	1,174,100
8	1,291,500	1,291,500	1,305,200	1,305,200	1,298,350
9	1,392,500	1,392,500	1,392,500	1,392,500	1,392,500
10	1,479,900	1,436,200	1,479,900	1,436,200	1,458,050

APENDICE L - Densidades microalgales estimadas en las replicas del medio de cultivo experimental para Isochrysis galbana.

TIEMPO (Días)	REPLICAS DEL MEDIO DE CULTIVO EXPERIMENTAL				DENSIDAD PROMEDIO Cel/ml.
	1	2	3	4	
0	475,100	431,400	475,100	431,400	453,250
1	518,700	518,700	562,400	518,700	529,625
2	693,500	649,800	649,800	606,100	649,800
3	780,900	780,900	737,200	737,200	759,050
4	912,000	912,000	912,000	912,000	912,000
5	999,300	955,600	955,600	999,300	977,450
6	1,130,400	1,086,700	1,086,700	1,086,700	1,097,625
7	1,174,100	1,174,100	1,130,400	1,130,400	1,152,250
8	1,217,800	1,217,800	1,217,800	1,217,800	1,217,800
9	1,291,500	1,291,500	1,291,500	1,217,800	1,273,075
10	1,217,800	1,251,500	1,291,500	1,291,500	1,263,075

APENDICE M. Densidades microalgales de Tetraselmis suecica estimadas en el cultivo testigo con agua de mar exenta de nutrientes.

TIEMPO (Días)	DENSIDAD Cel/ml
0	19,000
1	30,000
2	74,000
3	129,000
4	140,000
5	140,000
6	118,000
7	85,000
8	52,000
9	41,000
10	30,000

APENDICE N. Densidades microalgales de Isochrysis galbana estimadas en el cultivo testigo con agua de mar exenta de nutrientes.

TIEMPO (Días)	DENSIDAD Cel/ml
0	449,800
1	580,900
2	724,600
3	768,300
4	812,000
5	780,900
6	693,500
7	475,100
8	431,400
9	387,700
10	300,300

APENDICE O

Contrastación estadística mediante la Prueba T-Student
entre el medio control y el medio experimental Para Tetra-
selmis suecica.

D.	CONTROL	EXPERIMENTAL
I	MUESTRA I	MUESTRA 2
A	Densidad	Densidad
S	promedio x10	promedio x10
0	27,25	1,175
1	32,75	2,175
2	46,50	5,950
3	71,25	7,950
4	98,75	10,975
5	12,075	14,000
6	14,275	15,925
7	16,750	18,950
8	25,550	20,875
9	28,025	21,150
10	28,025	20,600
N	11	11
MEDIANA	13850.0	12702.3
MEDIA	12075.0	14000.0
DESV. STANDAR	9652.746	7526.606

Continuación Apendice 0

	MUESTRA 1	MUESTRA 2
	Control	Experimental
MEDIANAS	12702.27	13950
VARIANZAS	5.66498 E+07	9.317551 E+07

T= 1.063046

df= 10

P= 3127579

LAS MEDIANAS DE ESTAS 2 MUESTRAS NO SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES.

Los limites de confiabilidad en la diferencia entre las medianas de estas muestras pueden ser calculadas como:

$$1147 . 727 +/- T (10)*1079.659$$

APENDICE P

Contrastación estadística mediante la Prueba T-Student entre el medio control y el medio experimental para Isochrysis galbana.

D	CONTROL	EXPERIMENTAL
I	MUESTRA I	MUESTRA 2
A	Densidad	Densidad
S	promedio	promedio
0	464,175	453,250
1	540,550	529,625
2	693,500	649,800
3	835,525	759,050
4	977,450	912,000
5	1,021,150	977,450
6	1,108,550	1,097,625
7	1,174,100	1,152,250
8	1,298,350	1,217,800
9	1,392,500	1,273,075
10	1,458,050	1,263,075
N	11	11
MEDIANA	996718.2	935000.0
MEDIA	1021150.0	977450.0
DESV. STANDAR	333917.5	297756.4

Continuación Apendice P

	MUESTRA 1 Control	MUESTRA 2 Experimental
MEDIANAS	996718.2	935000
VARIANZAS	1.115009 E+ 11	8.865888 E+10

T= 3.638364

df= 10

P= 4.549027 E-03

LAS MEDIANAS DE ESTAS 2 MUESTRAS SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES.

Los limites de confiabilidad en la diferencia entre las medianas de estas dos muestras pueden ser calculadas como:

$$61718.19 +/- T (10) * 16963.17$$

APENDICE Q

<u>Tetraselmis suecica</u>	<u>Isochrysis galbana</u>
F c = 1.508	F c = 7.079
F t al 5% = 3.32	F t al 5% = 3.32 F t al 1% = 5.39

Resultados del Anova practicado a los valores de crecimiento de Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana comparados contra sus respectivos medios control, experimental y testigo a un nivel de significancia del 5% y 1% para cada caso.