

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EL FERTILIZANTE AGRICOLA COMO ALTERNATIVA EN CULTIVOS EXTERNOS

PARA LA PRODUCCION MASIVA DE Tetraselmis suecica

(KYLIN) BUTCH

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA:
JOSE ROBERTO HERRERA TREVIÑO

ENSENADA, B.C., MAYO DE 1988.

EL FERTILIZANTE AGRICOLA COMO ALTERNATIVA EN CULTIVOS EXTERNOS

PARA LA PRODUCCION MASIVA DE Tetraselmis suecica

(KYLIN) BUTCH

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA:
JOSE ROBERTO HERRERA TREVIÑO

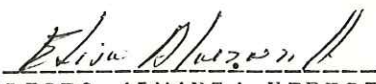
APROBADA POR:


PRESIDENTE DEL JURADO
OC. ALFREDO SALAS GARZA

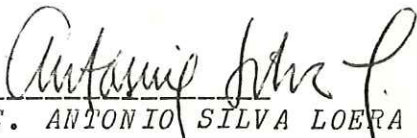
SINODAL PROPIETARIO


M.C. GUILLERMO TORRES MOYE

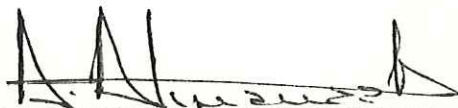
SINODAL PROPIETARIO


OC. ELISEO ALMANZA HEREDIA

SINODAL SUPLENTE


M.C. ANTONIO SILVA LOERA

SINODAL SUPLENTE


OC. ANTONIO ALMANZA HEREDIA

RESUMEN

Cuatro fertilizantes de uso agrícola, fueron seleccionados para compararlos en la producción masiva de Tetracelmis suecica, contra el medio f/2 de Guillard (1974). Se experimentó a nivel erlenmeyer una etapa de selección para definir cual es el mejor fertilizante y su concentración óptima, en el cultivo de esta especie bajo condiciones de luz y temperatura controladas. Una vez realizada la selección de un fertilizante se procedió al escalamiento hasta tanques externos con volumen de 100 l. El fertilizante seleccionado (sulfato de amonio), no presentó diferencias significativas en términos de densidad poblacional, al ser comparado con el control (f/2). Posteriormente, se obtuvo la cotización de ambos medios, como resultado, se encontró que el precio del medio f/2 es 32 veces mayor comparado con el del fertilizante seleccionado.

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE MI PADRE

AL ESFUERZO DE MI MADRE

A MIS HERMANOS:

*FRANCISCO
MARTHA
SERGIO
Y JUAN*

I N D I C E

1~ INTRODUCCION.....	1
1.1~ OBJETIVO.....	5
2~ MATERIALES Y METODOS.....	6
2.1~ GENERALES.....	6
2.2~ PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	7
2.2.1~ SOLUCIONES STOCK.....	7
2.2.2~ MEDIOS DE CULTIVO.....	9
2.3~ DISEÑO EXPERIMENTAL.....	10
2.3.1~ ETAPA DE SELECCION.....	10
2.3.2~ ESCALAMIENTO.....	11
2.3.3~ ESTERILIZACION.....	14
2.3.4~ INOCULACION.....	14
2.4~ MEDICIONES.....	15
2.5~ TRATAMIENTO ESTADISTICO.....	17
3~ RESULTADOS.....	18
3.1~ FACTORES FISICOQUIMICOS.....	18
3.2~ ESTADISTICA PREVIA.....	19
3.3~ SELECCION.....	19
3.4~ ESCALAMIENTO.....	24
3.5~ COSTOS.....	30
4~ DISCUSION.....	31
4.1~ FACTORES FISICOQUIMICOS.....	31
4.2~ SELECCION.....	33
4.3~ ESCALAMIENTO.....	35
4.4~ COSTOS.....	38
5~ CONCLUSIONES.....	40
6~ RECOMENDACIONES.....	41
7~ LITERATURA CITADA.....	42

L I S T A D E T A B L A S

TABLA I.	Proporciones de nutrientes de las soluciones stock usadas en la elaboraci3n de los medios de cultivo	8
TABLA II.	Proporciones del stock usadas para preparar un litro de medio de cultivo.....	9
TABLA III.	Ecuaciones para el c3lculo de los par3metros pobla- cionales.....	13
TABLA IV.	Resultado de la prueba LSD entre los tratamientos a prueba.....	21
TABLA V.	Ordenamiento de la prueba LSD que indica el grupo de menor respuesta donde se localiz3 cada tratamiento.....	23
TABLA VI	Valores de los par3metros poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel carboy durante siete d3as de cultivo.....	26
TABLA VII.	Valores de los par3metros poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel tanque durante siete d3as de cultivo.....	29

L I S T A D E F I G U R A S

FIG. 1. Diagrama del tanque de cultivo.....	12
FIG. 2. Intervalos de confianza al 95 % para los catorce tratamientos usados en el nivel de seleccibn.....	22
FIG. 3. Curvas de crecimiento de <u>T. suecica</u> a nivel carboy durante siete días de cultivo.....	25
Fig. 4. Curvas de crecimiento de <u>T. suecica</u> a nivel tanque durante siete días de cultivo.....	28

1 INTRODUCCION

Por varias décadas, se han realizado considerables esfuerzos para promover la producción masiva y el uso de microalgas como alimento directo para el hombre. Sin embargo, los altos costos de producción y cosecha, así como el rechazo potencial del alimento a base de algas por parte de los consumidores (esto por razones toxicológicas o de costumbre), han sido los grandes obstáculos para su desarrollo (Soeder, 1980).

Es un hecho, que las microalgas constituyen el punto energético de partida en la mayoría de los ecosistemas acuáticos, por lo que éstas, representan la base de la cadena alimenticia de muchos sistemas acuaculturales (Bardach et al., 1972). Estos sistemas, se fundamentan en la relación "productores-consumidores animales", y pueden ser considerados como uso indirecto de los cultivos de algas microscópicas en el consumo humano, con la ventaja de que son de mayor aceptación (De Pauw et al., 1984).

Con la integración de la acuicultura al ámbito económico internacional, surge la necesidad de producción de alimento a gran escala para cubrir los requerimientos de esta actividad.

Por muchos años, grupos de investigadores han tenido un especial interés en la posibilidad de cultivar microalgas masivamente (Goldman, 1979). Tal es el caso de la producción de moluscos bivalvos de importancia comercial (mediante acuicultura), donde uno de los mayores factores que determinan el éxito o fracaso de tales operaciones, es la disponibilidad diaria de volúmenes sustanciales de especies apropiadas de algas microscópicas como alimento (Persoone y Claus, 1980), un ejemplo de lo anterior, es el trabajo realizado en las instalaciones de Systemculture Seafood Plantations en Hawaii, E.U.A., donde se llevan a cabo cultivos a nivel comercial, del ostión japonés Crassostrea gigas en estanques completamente aislados del mar, obteniéndose una producción mensual entre cien mil y ciento cincuenta mil ostiones de talla comercial, los cuales, son generados a partir de 19 millones de litros de cultivos microalgales por día (con una densidad entre 300 y 400 $\times 10^6$ cel que equivalen a una producción de 200 toneladas métricas de peso seco en 10 acres de estanquería al año, utilizando mezclas fertilizantes (Goldstein, 1984) (se hace la aclaración de que el autor no menciona el tipo de mezclas utilizadas).

Tomando en cuenta los factores económicos, obviamente es impráctico y virtualmente imposible, cultivar grandes volúmenes de microorganismos utilizando métodos estandar de

laboratorio y medios de cultivo convencionales (Loosanof y Engle, 1942 ; De Pauw, 1981). Es por esto, que tales técnicas para producción de microalgas en cultivos monoespecíficos, no pueden ser escaladas hacia los grandes volúmenes necesarios para el cultivo de bivalvos en general (De Pauw et al., 1983).

La producción masiva de algas microscópicas, se ha logrado frecuentemente utilizando mezclas de aguas de desechos domésticos (Ryther et al., 1972) o bioindustriales parcialmente tratadas (De Pauw y De Leenheer, 1979). La biomasa algal sostenida de esta manera, resulta económica en lo que a nutrientes se refiere, desgraciadamente, es continuo el cuestionamiento de estos métodos debido a la contaminación bacteriana, la cual no debe ser menospreciada (González-Rodríguez y Maestrini, 1984).

Otros sustitutos de los medios convencionales han sido intentados. Granados y Buckle (1984), presentan un trabajo con estiércoles digeridos. Paniagua y Buckle (1985), sugieren extractos de macrofitas marinas como fuente de nutrientes. Alfonso y Núñez (1985), ensayan la utilización de harina de lombriz y gallinaza en el cultivo de Tetraselmis chui. Por su parte, De la Cruz (1985), utiliza agua de mar enriquecida con harina de pescado para el cultivo de la misma especie.

El uso de fertilizantes agrícolas inorgánicos en cultivos microalgales masivos, es una técnica que data de épocas de la segunda guerra mundial. Loosanoff y Engle (1942), reportan el uso de mezclas fertilizantes con diferentes fórmulas en cultivos masivos externos.

La utilización de fertilizantes inorgánicos comerciales en cultivos a gran escala, en estanques (De Pauw et al., 1983) o en grandes cuerpos de agua (Parsons et al., 1972), han comprobado su eficacia en el incremento de niveles de producción primaria ya que aportan ciertas cantidades de nutrientes limitantes en el crecimiento de los componentes del fitoplancton (Conte, 1985). Existen otros trabajos con fertilizantes agrícolas. De la Cruz y Alfonso (1975), cultivan cuatro especies de algas unicelulares usando nitrato de amonio y superfosfatos. Guerrero et al. (1981) realizan cultivos mixtos en estanques de 50 mil litros utilizando sulfato de amonio y ácido fosfórico como fuentes de nitrógeno y fósforo respectivamente. En 1984, González-Rodríguez y Maestrini, reportan el cultivo de 16 microalgas marinas utilizando doce fertilizantes agrícolas diferentes. En general, estos autores coinciden en que el uso de estos fertilizantes reduce los costos de producción en grandes volúmenes de cultivo.

Tetraselmis suecica, es un alga de la clase

Chlorophyceae que se caracteriza por ser unicelular y móvil, es de color verde y mide de 7 a 9 micrones de diámetro, con una membrana delgada y cuatro flagelos isodinámicos, esta especie es eurihalina y posee la capacidad de formar esporas, además, sus límites de tolerancia a variables físicas son muy amplios, su tamaño la encuadra en el nanoplancton, fracción fitoplanctónica que constituye el alimento adecuado para filtroalimentadores (Padilla, 1975).

T. suecica se seleccionó para los fines de este trabajo, porque ha sido considerada una especie de gran valor nutricional en la alimentación de semillas y adultos de bivalvos (Helm, 1973; Walne, 1974; Helm, 1977; Laing y Helm, 1981).

1.1 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es, poner a prueba el uso del fertilizante agrícola (marca Fertimex) de manufactura nacional, como alternativa en cultivos externos para la producción masiva de *Tetraselmis suecica*, y analizar sus implicaciones económicas.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 GENERALES

Los experimentos del presente trabajo, fueron llevados a cabo en la secci3n de microalgas del Laboratorio de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanol3gicas (I.I.O.) de la Universidad Aut3noma de Baja California (U.A.B.C.), en los patios adyacentes a dicho Laboratorio, fueron instalados los tanques para la producci3n masiva de *T. suecica*.

Cuatro fertilizantes de uso agr3cola marca Fertimex, se seleccionaron en base a su disponibilidad, costo y facilidad de manejo, para comapararlos en la producci3n masiva de esta especie, con el medio f/2 de Guillard (1974), que se utiliza para cultivo de microalgas en el laboratorio de moluscos del I.I.O., adem3s de que es uno de los m3s difundidos.

La composici3n de los fertilizantes utilizados es la siguiente:

-Urea: 46% nitrógeno total, 0% ortofosfatos, 0% potasio.

-Sulfato de amonio: 21% nitrógeno total, 0% ortofosfatos, 0% potasio.

-Superfosfato: 0% nitrógeno total, 20% ortofosfatos, 0% potasio.

-Triple 17: 17% nitrógeno total, 17% ortofosfatos, 17% potasio.

2.2 PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

2.2.1 SOLUCIONES STOCK

De acuerdo al contenido total de nitrógeno y fósforo del medio f/2, descrito por Guillard (1974), el cual fue usado como testigo para todos los experimentos de este trabajo, se calculó la cantidad necesaria de fertilizante para preparar 4 soluciones stock (Tabla I), dos de nitrógeno (urea, sulfato de amonio), una de fósforo (superfosfatos), y una mixta

(triple 17), esta última, evaluada solamente por su contenido de nitrógeno. Las soluciones fueron preparadas disolviendo el fertilizante en un litro de agua destilada, posteriormente, se decantaron, se filtraron mediante un sistema de vacío usando filtros Whatman #1, y fueron mantenidas en refrigeración. En el caso de tanques de 100 l, el medio fue disuelto en un litro de agua de mar y aplicado sin filtración.

TABLA I. Proporciones de nutrientes de las soluciones stock usadas en la elaboración de los medios de cultivo

Medio f/2	contenido total de nutriente	peso (gr)
Nitrogeno	6.75 mg N/ml	75 g/l
Fosforo	.715 mg P/ml	5 g/l
Fertilizantes.		
Urea	12.35 mg N/ml	26.85 g/l
Sulfato de amonio	12.35 mg N/ml	58.81 g/l
Super fosfatos	1.43 mg P/ml	16.43 g/l
Triple 17	12.35 mg N/ml	72.64 g/l

2.2.2 MEDIOS DE CULTIVO.

Se prepararon doce medios de cultivo a partir de las soluciones stock, usando las combinaciones descritas en la Tabla II.

TABLA II. Proporciones del stock usadas para preparar un litro de medio de cultivo.

Trata- miento	Fuente de nitrogeno	[]	Proporción	
			N	P
1	Agua de mar	?	0	0
2	UREA	2	1	1
3		4	2	1
4		6	3	1
5		4	4	1
6	TRIPLE 17	2	1	1
7		4	2	1
8		6	3	1
9		8	4	1
10	SULFATO DE AMONIO	2	1	1
11		4	2	1
12		6	3	1
13		8	4	1
14	F/2 (nitrato de Na)	1	1	1

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Todos los experimentos de este trabajo, tuvieron una duraci3n de siete d3as a partir de su inoculaci3n. Este tiempo, se seleccion3 debido a que los cultivos presentan el mejor nivel de desarrollo y no se alcanza la fase de decaimiento. El agua de mar usada en todos los niveles, fue filtrada a una micra usando filtros de cartucho (Kuno), la desinfecci3n de esta se realiz3 mediante una l3mpara ultravioleta s3lo para los cultivos dentro del laboratorio.

2.3.1 ETAPA DE SELECCION.

Para definir cual es el mejor fertilizante y su concentraci3n 3ptima en el crecimiento de T. suecica, se realiz3 un experimento a nivel erlenmeyer con un volumen de retenci3n de 50 ml. Cada medio y cada concentraci3n se hicieron por triplicado, as3 como el testigo y el blanco (agua de mar). Todos los matraces de este nivel fueron inoculados a la misma densidad, y se midi3 su densidad poblacional al termino del experimento. Una vez seleccionado el mejor

fertilizante, se procedió a su utilización en volúmenes mayores.

2.3.2 ESCALAMIENTO.

El escalamiento se realizó primeramente a nivel carboy con un volumen de retención de 18 litros, posteriormente, a nivel tanque (externo) con capacidad de 100 litros (Fig. 1). En ambos niveles se comparó entre dos tratamientos, el testigo y el sulfato de amonio a concentración séxtuple, los dos casos se hicieron por duplicado.

Para efectos de comparación, se obtuvieron mediciones diarias de densidad poblacional, pH y temperatura. Los parámetros poblacionales descritos por De laCruz y Afonso (1975) (Tabla III), fueron calculados a lo largo del tiempo de duración del cultivo.

- 1.- TUBO PVC CON PERFORACIONES DE MM
- 2.- MANGUERA PLASTICA (AIREACION)
- 3.- BASTIDOR DE MADERA CON DOBLE MALLA
- 4.- DETALLE (MALLA DE MOSQUITERO).

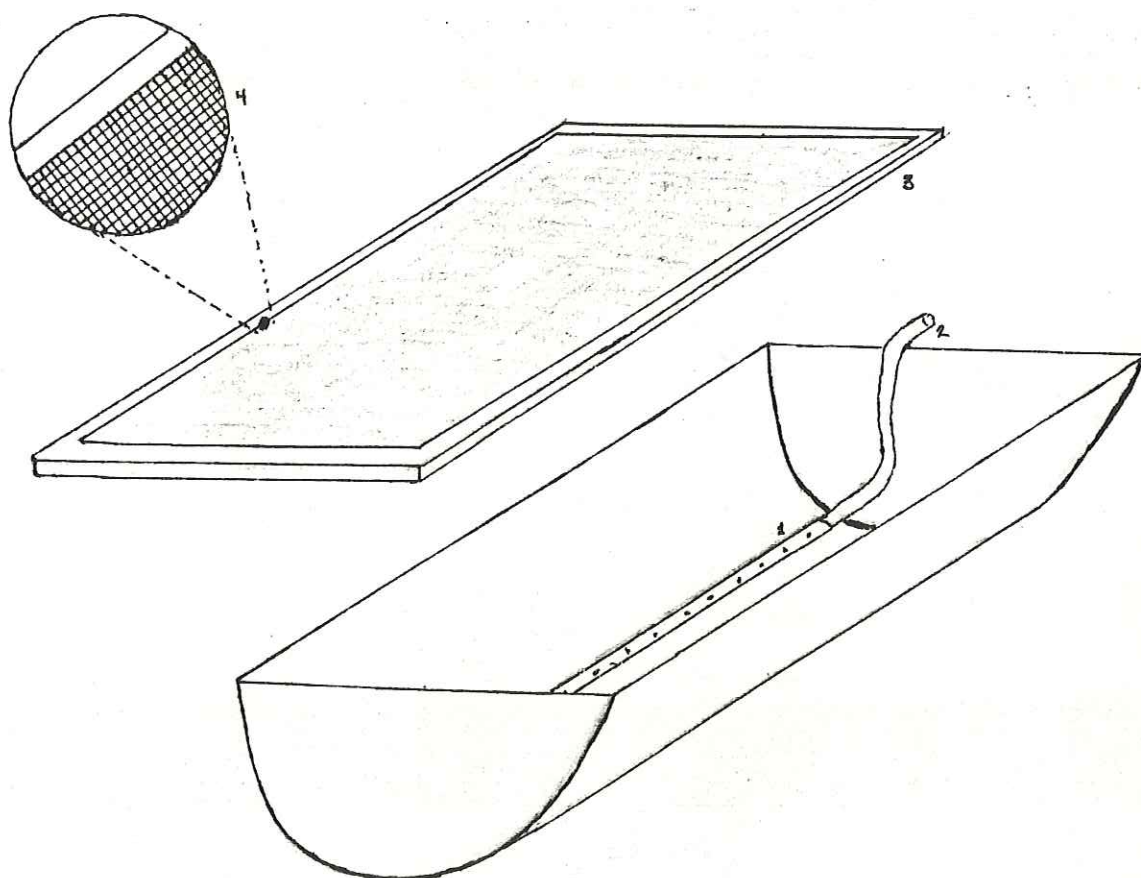


FIG. 1. Diagrama del tanque de cultivo.

TABLA III. Ecuaciones para el calculo de los parametros poblacionales.
(De la cruz y Alfonso 1975)

Constante de crecimiento (K) $K = \frac{\ln C_2 - C_1}{t_2 - t_1}$
Tiempo de duplicacion (TD) $TD = \frac{\ln 2(t_2 - t_1)}{\ln C_2 - \ln C_1}$
Numero promedio de divisiones (D) $D = \frac{\ln C_2 - \ln C_1}{\ln 2(t_2 - t_1)}$
Produccion diaria (PD) $PD = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1}$
Variacion porcentual (VP) $VP = \frac{100 (C_2 - C_1)}{C_1 (t_2 - t_1)}$
* Se considera C1 la concentracion inicial de celulas en el tiempo t1 C2 es la concentracion de celulas en un tiempo posterior t2.

2.3.3 ESTERILIZACION.

Los matraces erlenmeyer fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/pg² por 15 minutos.

Los carboys se esterilizaron por método químico mediante la aplicación de 0.35 ml/l de una solución de hipoclorito de sodio comercial (416 ml/l), neutralizado con 0.1 ml/l de una solución de tiosulfato de sodio (248.1 gr/l).

Los tanques no fueron esterilizados, sin embargo, se lavaron utilizando jabón y una solución de hipoclorito de sodio (100 ml/l).

2.3.4 INOCULACION.

Cada matraz erlenmeyer, fue inoculado con cuatro ml de cepa. A nivel carboy, cada uno fue inoculado con 500 ml. En estos dos niveles la inoculación se realizó bajo una atmósfera estéril generada por dos mecheros Bunsen. A cada tanque, se le inoculó con 4 litros. La concentración de la cepa en todos los

niveles fue de 1×10^6 cel/ml, aproximadamente.

2.4 MEDICIONES.

Tanto a nivel erlenmeyer como a nivel carboy, se mantuvieron condiciones de luz y temperatura constantes utilizando lamparas de luz fria blanca (Sylvania 40w) y un aparato de aire acondicionado, la temperatura promedio registrada fue de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A nivel tanque se registró la temperatura diariamente a lo largo de todo el experimento. En cuanto a la intensidad de luz, se logró obtener sólo una medición durante el tiempo de duración del experimento.

Intensidad de luz.

Fue medida con un irradiometro Kahl Inst Corp mod 268wa310

Temperatura.

Se midió dentro del laboratorio con un termometro Ertco, con rango de -1 a 51 grados centígrados, graduado

a 0.1 de grado. Para el experimento exterior, se utilizó un termómetro de máximos y mínimos graduado cada 2 grados.

Densidad poblacional.-

En todos los niveles se utilizó un espectrofotómetro Hatch DR-2 y una curva de calibración a 680 nanómetros, realizada por personal del laboratorio de moluscos

pH.

Se registró sólo para los experimentos de escalamiento y fue medido con un potenciómetro marca Fisher mod 156.

Salinidad (S%).

Se registró en todos los niveles con un refractómetro AO, con rango de 0 a 160 ppm, graduado a dos ppm.

2.5 TRATAMIENTO ESTADISTICO.

En todos los experimentos se realizo un ordenamiento aleatorio, se aplicaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza, como requisito previo para el manejo estadístico de tipo paramétrico.

En la primera etapa, se aplico un análisis de varianza de una vía y una prueba LSD (mínima diferencia significativa) "a posteriori" para agrupar tratamientos con la misma respuesta (Gabriel, 1964, tomado de Sokal y Rohlf, 1979).

En la segunda etapa, se aplicaron pruebas "T", entre replicas y entre tratamientos.

Todas las pruebas se realizaron a un nivel de confianza del 95%

El análisis estadístico se llevo a cabo con los programas, Minitab, Esimls y Pecs, contenidos en la librería de la computadora Prime 750 del Centro de Investigaciòn Científica y de Educaciòn Superior de Ensenada (CICESE).

3 RESULTADOS

3.1 FACTORES FISICOQUIMICOS.

Intensidad de luz.

Para el nivel tanque, se registró una intensidad de luz máxima de 2520 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ ambiente y 840 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ bajo la malla.

Temperatura.

En los tanques se registró una temperatura máxima promedio de 21.2 °C y una mínima promedio de 15.1 °C.

pH.

En los carboys se registró un pH promedio de 8.2, con un mínimo de 7.8 y un máximo de 8.5 para sulfato de amonio. Para f/2, un promedio de 8.5, un mínimo de 7.8 y un máximo de 9. En los tanques, el sulfato de amonio registró un promedio de 8.3, un mínimo de 7.8 y un máximo de 8.7. El medio f/2, obtuvo un promedio de 8.4, un

mínimo de 7.8 y un máximo de 8.8.

Salinidad (S%).

Los matraces erlenmeyer y carboys, mantuvieron una salinidad de 33ppm.

En los tanques. se iniciò con 33ppm y se tuvo una variaciòn de +3ppm para el final del experimento.

3.2 ESTADISTICA PREVIA.

Las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza, para todos los datos de los experimentos realizados, se aceptaron a un nivel de confianza del 95% en todos los casos.

3.3 SELECCION.

Al realizar el análisis de varianza de una vía, entre los catorce tratamientos utilizados, se encontró una alta diferencia significativa.

Posteriormente se aplicó el mismo análisis, eliminando el control y el blanco, aquí se encontró una diferencia significativa que apenas rebasa el límite de confianza.

Aplicando la prueba LSD (Tabla IV), se identificaron siete grupos de igual respuesta, donde el blanco se localizó en el grupo uno, mientras que el testigo (mayor densidad poblacional), apareció en el grupo siete, estas diferencias pueden ser claramente observadas en la gráfica de intervalos de confianza (Fig. 2).

Tanto en la gráfica de intervalos de confianza como en la prueba LSD, se encontró un traslape entre algunos de los tratamientos. El criterio para seleccionar sólo uno de los fertilizantes, fue el de colocar cada tratamiento en el grupo de menor respuesta donde pudiera ser localizado, como resultado tenemos el ordenamiento representado en la Tabla V. donde el tratamiento doce (concentración sextuple de sulfato de amonio) fue el único que se encontró en el grupo precedente al control, además se utilizaron otros criterios para la selección que serán descritos posteriormente.

TABLA IV. Resultado de la prueba L.S.D.
(minima diferencia significativa)
entre los tratamientos a prueba.

Grupo	Tratamiento								R
I	1								
II	6	7	3	10	2	5	4		
III	7	3	10	2	5	4	8	13	
IV	10	2	5	4	8	13	11		
V	5	4	8	13	11	9			
VI	4	8	13	11	9	12			
VII	14								+

R = Respuesta (cuantificada en base a la densidad poblacional observada.)

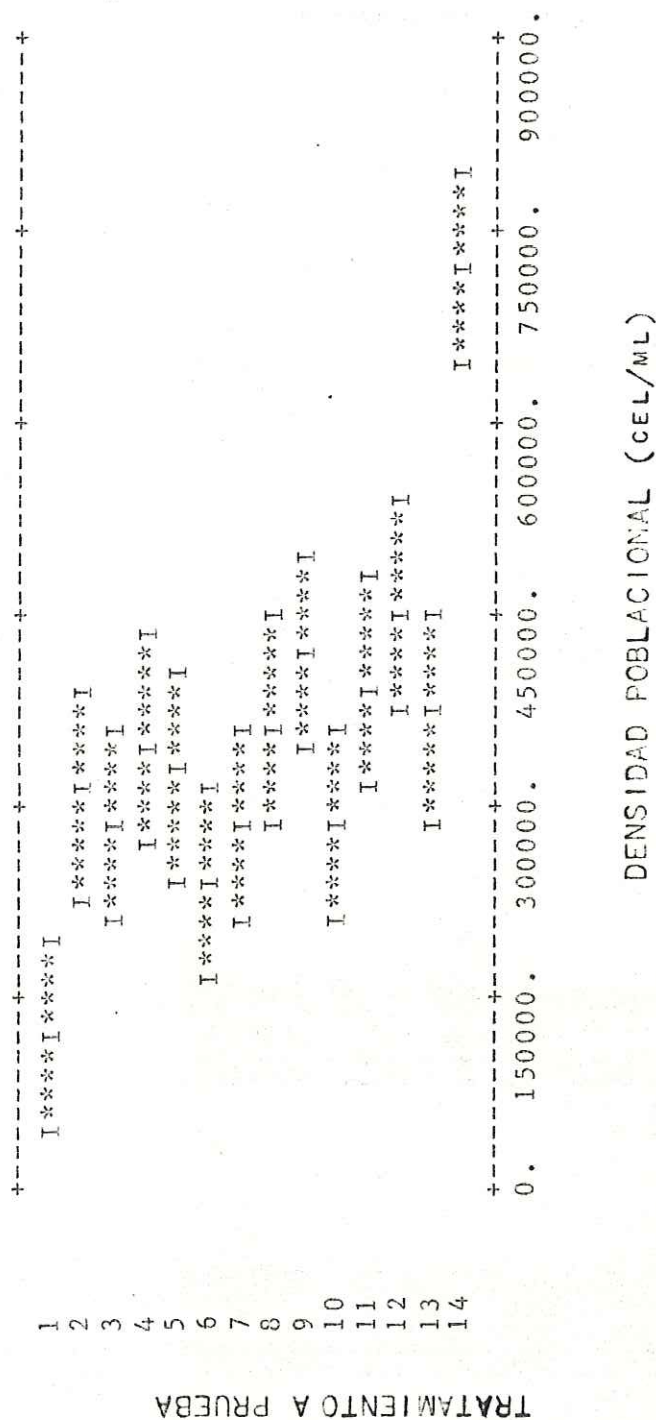


FIG. 2. Intervalos de confianza al 95% para los
catorce tratamientos usados en el nivel de seleccibn.

TABLA V. Ordenamiento de la prueba
L.S.D. que indica el
grupo de menor respuesta
donde se localizo cada
tratamiento.

Tratamiento	Grupo
1	I
2	II
3	II
4	II
5	II
6	II
7	II
8	III
9	V
10	II
11	IV
12	VI
13	III
14	VII

3.4 ESCALAMIENTO.

A nivel carboy (18 l) las pruebas "T" entre réplicas no mostraron diferencias significativas en ninguno de los dos tratamientos (sulfato de amonio y control).

Se aplicó una prueba "T" entre tratamientos, en la cual, tampoco se encontró diferencia significativa. Esto se observa gráficamente en las curvas de crecimiento (Fig. 3), en estas curvas se identifica también, que la fase de crecimiento exponencial se localiza entre el segundo y el cuarto día de cultivo, en ambos tratamientos.

Los parámetros poblacionales (Tabla VI), corroboran de cierta manera el resultado del tratamiento estadístico, ya que su comportamiento fue similar entre ambos tratamientos. Aquí, los máximos valores de la constante de crecimiento (K), fueron localizados al tercer día de cultivo, donde además se encontró el mínimo tiempo de duplicación (TD) y el máximo número de divisiones por día (D).

En este nivel, la diferencia en densidad poblacional al último día de cultivo, fue del 24% aproximadamente,

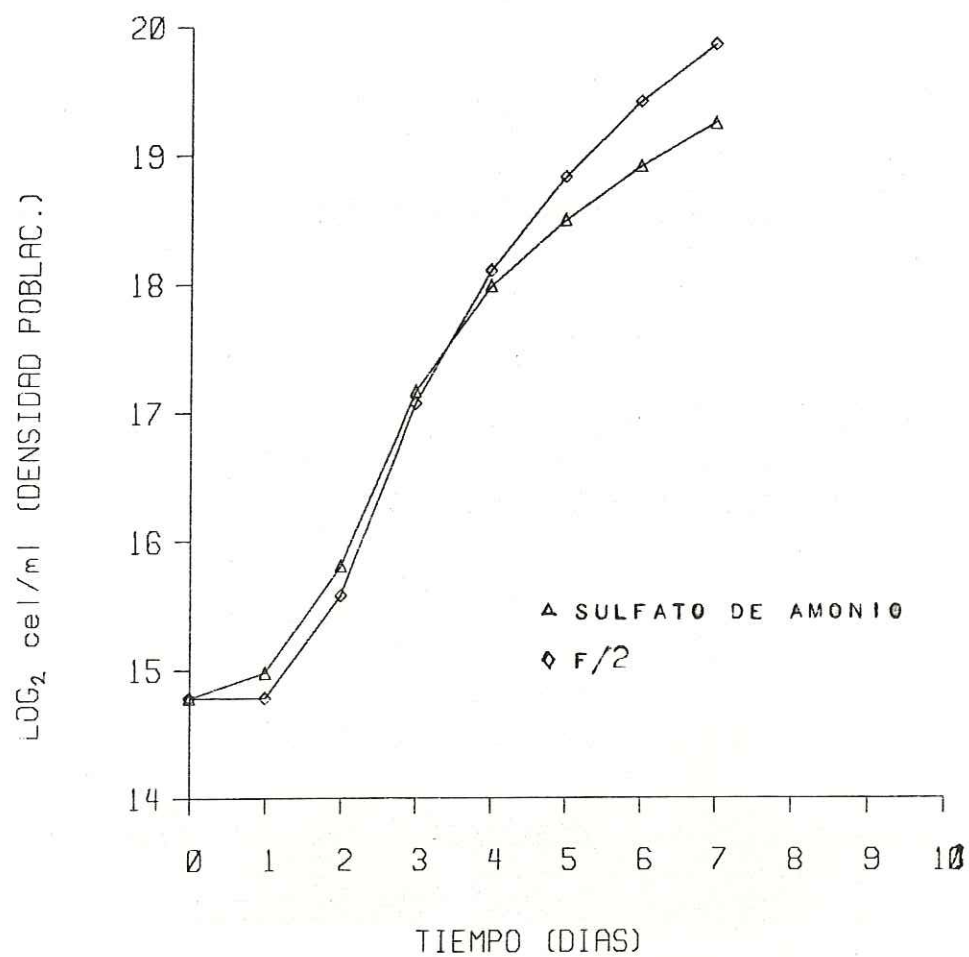


FIG. 3. Curvas de crecimiento de *T. suecica* a nivel carboy durante siete días de cultivo.

TABLA VI. Valores de los parametros poblacionales de *T. suecica* a nivel oarboy (10 l) durante siete dias de cultivo.

	T	[]	K	TD	D	PD	UP
(A)	0	28,714	-	-	-	-	-
	1	32,928	0.1369	5.10	0.195	4,214	14.67
	2	50,631	0.5769	1.204	0.030	25,703	78.05
	3	150,621	0.9434	0.734	1.350	91,990	156.89
	4	265,282	0.5660	1.228	0.813	114,660	76.12
	5	378,672	0.3558	1.954	0.511	113,390	42.71
	6	505,605	0.2890	2.408	0.415	126,933	33.52
	7	638,042	0.2326	2.980	0.335	132,437	26.19
(B)	0	28,714	-	-	-	-	-
	1	28,714	-	-	-	-	-
	2	49,963	0.5539	1.254	0.797	21,249	74.00
	3	140,938	1.0370	0.668	1.490	90,975	182.08
	4	288,538	0.7165	0.967	1.030	147,599	104.72
	5	477,757	0.5420	1.374	0.727	189,219	65.57
	6	716,623	0.4054	1.210	0.531	238,866	49.99
	7	976,245	0.3091	2.246	0.445	259,622	36.22

(A) Sulfato de amonio (B) f/2

donde el control registró mayor número de células.

Para el nivel tanque (100 l), las pruebas "T" entre réplicas no identifican diferencia significativa, tanto para el sulfato de amonio como para el f/2. La prueba "T" entre tratamientos tampoco mostró diferencia.

En las gráficas de crecimiento (Fig. 4), se encontró un comportamiento similar entre tratamientos como sucede en el nivel anterior, con la diferencia de que la fase de crecimiento exponencial se localiza entre el segundo y el quinto día de cultivo, además que el cambio de pendiente está mayormente marcado.

Al obtener los parámetros poblacionales (Tabla VII) se observa, a diferencia del nivel carboy, que tanto la constante de crecimiento como el número de divisiones por día alcanzan su máximo al cuarto día de cultivo, donde el tiempo de duplicación es el más corto.

La diferencia en densidad poblacional en este nivel al último día de cultivo, es aproximadamente del 15.5%

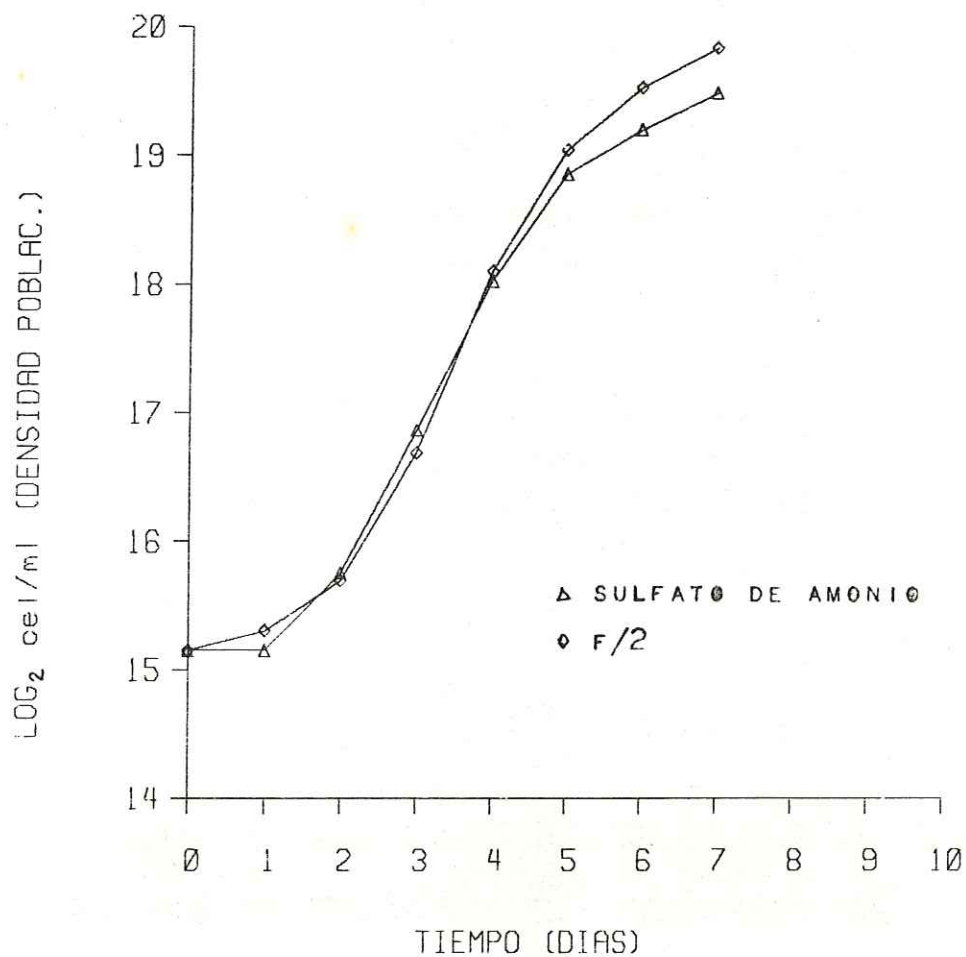


Fig. 4. Curvas de crecimiento de *T. suecica* a nivel tanque durante siete días de cultivo.

TABLA VII. valores de los parametros poblacionales de *T. suecica* a nivel tanque (100 l) durante siete dias de cultivo.

	T	[]	K	TD	D	PD	VP
(A)	0	37,143	-	-	-	-	-
	1	37,143	-	-	-	-	-
	2	56,436	0.4183	1.650	0.603	19,293	51.94
	3	122,020	0.7710	0.898	1.112	65,584	116.20
	4	272,819	0.8046	0.862	1.159	150,799	123.58
	5	486,887	0.5792	1.199	0.833	214,067	78.46
	6	617,243	0.2372	2.926	0.342	130,356	26.77
	7	752,383	0.1979	3.504	0.195	135,140	21.89
(B)	0	37,143	-	-	-	-	-
	1	41,405	0.1085	6.404	0.156	4,298	11.46
	2	54,267	0.2705	2.561	0.390	12,865	30.07
	3	100,124	0.6093	1.005	0.994	53,057	99.24
	4	200,204	0.9803	0.707	1.414	180,079	166.54
	5	554,611	0.6545	1.059	0.944	266,407	92.43
	6	775,783	0.3356	2.066	0.484	221,172	39.07
	7	960,902	0.2139	3.261	0.306	185,119	23.06

(A) Sulfato de amonio (B) f/2

3.5 COSTOS.

Al realizar la cotizaci3n de los medios comparados, se obtuvo lo siguiente:

la preparaci3n de 1000 l de medio de cultivo con f/2, tiene un costo de \$12650.00 pesos (hay que considerar que la cotizaci3n se realiza en d3lares al tipo de cambio en moneda nacional), mientras que usando sulfato de amonio, el costo es de \$309.00 pesos (0.13 dolares).

En 3ste punto cabe hacer la consideraci3n de que la producci3n alcanzada por el medio f/2 fluct3a entre el 12 y el 20% por encima del rendimiento del sulfato de amonio.

Tomando en cuenta el l3mite m3ximo entre diferencias de producci3n (20%) el costo del sulfato de amonio para obtener la misma producci3n se incrementa en 3ste porcentaje con un resultado de \$370.00 pesos.

Al utilizar sulfato de amonio, se encontr3 un costo 34 veces menor al del f/2.

4 DISCUSION.

4.1 FACTORES FISICOQUIMICOS.

Haciendo referencia a los factores físicos que afectan un cultivo externo, se ha definido a la intensidad de luz como limitante en el crecimiento (De la Cruz y Alfonso, 1975; De Pauw et al., 1980; Guerrero et al., 1981).

Los experimentos realizados por Guerrero et al. (op cit), en tanque externos de 50000 l utilizando sulfato de amonio (fertilizante agrícola), a lo largo de un año, encuentran sus máximas densidades para los meses de Junio y Julio, y las menores en Diciembre, Enero y Febrero, esto se atribuye a la disminución de la intensidad de luz en el invierno.

El presente trabajo se realizó durante el periodo de invierno, las concentraciones registradas por el control, fueron muy semejantes a las que se obtienen en condiciones óptimas (laboratorio), esto indica que no

hubo limitaciones en cuanto a intensidad de luz se refiere.

Por su parte, De la Cruz y Alfonso (1975), realizan sus experimentos bajo condiciones tropicales, utilizando luz natural difusa (bajo un cobertizo), en verano, los autores opinan que los rayos directos del Sol, podrían ser ventajosos para el cultivo si no provocaran un aumento de temperatura excesivo para las algas.

En este punto, debe preverse un aumento en la temperatura para un cultivo en nuestras condiciones de verano, si se toma en cuenta la posibilidad de cultivo en grandes volúmenes, el efecto del aumento de temperatura se vería más disminuido, tal es el caso del sistema de producción en Hawaii (Goldstein, 1984), donde la máxima temperatura de los cultivos externos, es de 25 °C, mientras que para los cultivos en Cuba (De la Cruz y Alfonso (1975), alcanzan temperaturas hasta de 36 °C en tanques de 100 l, a pesar de que ambos trabajan en condiciones climáticas semejantes (misma latitud).

En cuanto al pH, no se registraron diferencias entre tratamientos a lo largo del tiempo de experimentación, a pesar de la similitud del comportamiento del pH en ambos medios, se encontró que el sulfato de amonio bajó su

rendimiento al alcanzar valores superiores al 8.5 de pH. Dropp (1964), menciona que el ion amonio puede presentar cierto grado de toxicidad para las microalgas, cuando este se encuentra en condiciones medianamente alcalinas, es probable, que la diferencia en rendimientos pueda deberse a este factor.

4.2 SELECCION.

Durante la etapa de selecci3n, se observ3 que la diferencia entre los fertilizantes utilizados, apenas rebas3 el valor cr3tico. es por 3sto, que al analizar la gr3fica de intervalos de confianza (Fig. 2), as3 como el resultado del an3lisis LSD (Tabla IV), se encontr3 un traslape entre los tratamientos, debido a lo anterior, se decidi3 ajustar el resultado del an3lisis LSD (Tabla V), tomando en cuenta el l3mite inferior de cada tratamiento, bajo la suposici3n de que es la densidad m3nima posible en un tratamiento, indicando que la base estadística no es suficiente para emitir un criterio v3lido.

Aunados al an3lisis estadístico, existen otros factores que deben tomarse en cuenta para establecer un criterio en 3sta etapa. Al hacer la revisi3n diaria del

estado del cultivo, se observó que, aquellos preparados con sulfato de amonio, presentaron una mayor concentración de células nuevas, en relación a los demás fertilizantes, Trick (1979), reporta que la división celular da como resultado dos células hijas móviles (flageladas), que presentan fototactismo positivo muy marcado, es por esto, que se les puede observar en conjunto en la superficie del medio de cultivo.

A pesar de que las nuevas células no fueron cuantificadas, a simple vista (coloración) se observó mayor concentración.

Otro factor importante, es la consideración de que las sales de amonio (sulfato), tienen la ventaja sobre los nitratos ($f/2$) que no requieren energía reductora para su asimilación, y que cuando ambos están presentes, los iones de amonio son asimilados preferencialmente (Dropp, 1964). Además, el sulfato de amonio es una sal bastante soluble, lo cual facilita su uso en la preparación de los medios de cultivo.

Tomando en cuenta el costo del fertilizante, el sulfato de amonio resultó ser más económico que la urea y el triple 17.

En cuanto a la acumulaci3n previa de nutrientes en las c3lulas (fen3meno conocido como pool), se considera, en lo que a nitr3geno se refiere, que no hay evidencia para suponer que 3ste interfiera con los medios donde se utiliz3 fertilizante, ya que si se comparan 3stos con el blanco, se observa que cuando hay ausencia de nitr3geno, el crecimiento se reduce, esto en base a la consideraci3n de que 3ste es un elemento muy limitante en desarrollo del alga, y a3n cuando hubiese existido una acumulaci3n previa, no es suficiente para mantener el cultivo en condiciones de crecimiento 3ptimo, adem3s, debe tomarse en cuenta que toda la cepa utilizada tiene la misma historia nutricional, y por lo tanto, el almacenamiento de nutrientes es homog3neo.

4.3 ESCALAMIENTO.

Al analizar las condiciones generales del comportamiento del sulfato de amonio y el medio f/2, mediante la comparaci3n de las curvas de crecimiento (Figs. 3 y 4), se observa la similitud de ambas a lo largo del tiempo de cultivo, en ellas aparecen las fases de crecimiento descritas habitualmente: una fase de

retardo (1-2 días), una fase de crecimiento exponencial (3-4 días), y una fase estacionaria, con diferencias únicamente al último día.

Esto sugiere, que reduciendo el tiempo de cultivo a tres o cuatro días, se pueden eliminar las diferencias en rendimiento entre ambos medios de cultivo, ya que lo que se pretende, es obtener inóculo para un nivel de producción mayor.

Considerando las rutinas de cultivo utilizadas por Systemculture Seafood Plantations en Hawaii (Goldstein, 1984), donde los tanques externos tienen un tiempo de cultivo de sólo tres días, para después inocular el siguiente nivel de producción, y así sucesivamente hasta estanques de 750000 l se observa que a pesar de la baja densidad alcanzada en tres días de cultivo, éste se encuentra en su mejor condición (fase exponencial) para ser utilizado como inóculo del nivel siguiente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, para los días 3 y 4 de cultivo, no reportan diferencias entre el control y el sulfato de amonio, esto se puede observar en las Tablas VI y VII, donde los parámetros poblacionales tienen un comportamiento muy similar para ambos, independientemente de la fuente de nitrógeno.

De la Cruz y Alfonso (1975), en base al análisis de estos parámetros encuentran que Tetraselmis tetrahele, presenta su fase exponencial entre los 3 y 6 días, cultivada en tanques externos con volumen de 100 l usando nitrato de amonio, sin embargo, sus rendimientos no fueron muy altos.

Considerando el rendimiento final del cultivo, es necesario hacer la observación, que en experimentos preliminares, que se llevaron a cabo durante el período de invierno, la fluctuación en densidad poblacional final estuvo entre el 20 y 12% como límites en relación al control, fue por esto que se decidió utilizar el mayor valor para evaluar los costos de producción.

Aquí se utilizó el criterio anterior, porque no se tiene la evidencia estadística suficiente para evaluar el rendimiento final del cultivo.

4.4 COSTOS.

Al hacer una evaluaci3n del experimento realizado por Guerrero et al. (1981), se encontr3 que para cultivar 50000 l semanalmente con f/2 durante un a3o, el costo de 3ste ser3a de \$32890000.00 pesos, mientras que con sulfato de amonio costar3a 34 veces menos, es decir, \$967353.00 pesos.

Esto indica que aunque el medio f/2 tiene un rendimiento mayor, ser3a imposible disenar un sistema usando este tipo de medio, ya que el costo de producci3n jam3s ser3a pagado con las utilidades que se obtuvieran de la venta de cualquier bivalvo alimentado de 3sta manera.

En base a los resultados obtenidos en 3ste trabajo, es conveniente hacer una delimitaci3n de los alcances del mismo.

La evaluaci3n del rendimiento del cultivo se realiz3 s3lo mediante la densidad poblacional, y se considera que la calidad alimenticia de 3ste debe ser semejante, lo anterior en base al trabajo de Ojeda y Afonso (1986), en

donde mediante un estudio comparativo de crecimiento y composici3n qu3mica en *T. suecica*, utilizando cuatro fuentes de nitr3geno diferentes, concluyen que se puede observar un incremento en la producci3n de l3pidos y carbohidratos en la composici3n de la microalga cultivada con amonio, en relaci3n con la cultivada con nitratos. Sin embargo, no es la fuente de nitr3geno la que causa diferencias entre la composici3n qu3mica del alga, 3sta m3s bien se encuentra en relaci3n con la constante de crecimiento, donde cultivos con constantes semejantes presentan la misma composici3n qu3mica (Vel3squez comunicaci3n personal).

Gonz3lez-Rodr3guez y Maestrini (1984), hacen una consideraci3n importante en su trabajo, los an3lisis de las bolsas de fertilizante, presentan diferencias entre marcas, y aun, entre lotes del mismo fertilizante, esto indica se puede presentar una variaci3n en el contenido de nitr3geno, la cual no fu3 determinada en nuestro trabajo.

*P.O. SALVADOR VEL3SQUEZ M. TESISTA DEL I.I.O.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOL3GICAS
U.A.B.C. APARTADO POSTAL 453. ENSENADA, B.C.

5 CONCLUSIONES

1.- Durante la etapa de seleccibn, se encontrb desarrollo de T. suecica en todos los tratamientos con fertilizante utilizados.

2.- La intensidad de luz y la temperatura en los cultivos externos, no fueron factores limitantes en el desarrollo de los cultivos, durante el período de experimentacibn (condiciones de inviernos).

3.- A lo largo de los siete días de cultivo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a densidad poblacional se refiere, entre la utilizacibn del sulfato de amonio y el testigo.

4.- Entre los días 2 y 5 de cultivo, se definió una fase de crecimiento exponencial donde se considera que el cultivo se encuentra en su mejor condicibn, esto para los dos tratamientos utilizados.

5.- En la cotizacibn de los medios de cultivo, el sulfato de amonio resultb ser 32 veces menor en relacibn al costo del f/2.

6 RECOMENDACIONES

1.- Para determinar la calidad de la microalga como alimento para filtroalimentadores, se recomienda realizar el análisis químico de la composición de la misma.

2.- Además es importante la realización de un bioensayo para corroborar la asimilación de la microalga cultivada con sulfato de amonio con relación a la del medio f/2.

3.- Para acelerar la obtención de grandes volúmenes de inóculo, sería útil reemplazar las rutinas de 7 días de cultivo por la de 3 o 4 días, para la obtención de cultivos a mayor escala.

7 LITERATURA CITADA

ALFONSO, E. y C. Nunez 1985. Uso de nuevos fertilizantes para cultivar fitoplancton. Revista de Investigaciones Marinas, Vol. VI, No.1. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana

BARDACH, J.E., J.H. Ryther y W.O. Mc Larney 1972. Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms. Wiley-Interscience, New York, 686 p.

CONTE, F.S. 1985. Phytoplankton in ponds. California Aquaculture. University of California, Cooperative Extension, CA-85-3.

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.

_____ y E. Alfonso 1975. Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilizaciòn. Ciencias, Universidad de la Habana, serie 8, (17), : 1-25.

DE PAUW, N. 1981. *Use and production of microalgae as food for nursery bivalves*. En: C. Claus, N. De Pauw y E. Jaspers (Editores). *Nursery Culturing of Bivalve Molluscs*. EMS special publ. No. 7, European Mariculture Society, Bredene, Bélgica, : 35-69.

_____, y L. De Leenheer 1979. *Mass culturing of marine and fresh water algae on aerated swine manure*. En: E. Styczynska-Jurewicz, T. Backiel, E. Jaspers and G. Persoone (Editores). *Cultivation of Fish Fry and its Live Food*. Proc. Conf. Szymbark, Polonia, 23-28, Septiembre 1977. European Mariculture Society, Spec. Publ. No. 4. : 441-473.

_____, H. Verlet y L. De Leenheer Jr. 1980. *Heated and unheated outdoor cultures of marine algae with animal manure*. p 315-341. En: *Algae Biomass*. Shelef G. y C.J. Soeder (Eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam, 852p.

_____, J. Verboven y C. Claus 1983. *Large scale microalgae production for nursery rearing of marine bivalves*. *Aquacultural Eng.*, No. 2 : 27-47.

_____, J. Morales y G. Persoone 1984. *Mass culture of microalgae in aquaculture systems*. *Progress and*

constraints. *Hydrobiologia*. No. 89 : 27-39.

DROPP, M.R. 1969. *Algae. En: Methods in Microbiology* : 269-313. D.W. (Eds.). Academic Press, Scotland.

GOLDMAN, J.C. 1979. *Outdoor algal mass cultures. I: Applications. Water Res.* No. 13 : 1-19.

GOLDSTEIN, B.B. 1984. *The comercial cultivation of Crassostrea gigas in a land-based, tropical, managed food chain. Aquaculture*, No. 39 : 393-402.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, E. y S.Y. Maestrini 1984. *The use of some agricultural ferlizers for the mass production of marine algae. Aquaculture*, No. 36, : 245-256.

GRANADOS, C. y L.F. Buckle 1984. *Cultivo de las microalgas Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con nutrientes producidos por estiërcoles digeridos. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autòn. Mèxico*, No. 11. Vol 1, : 241-256.

GUERRERO, S., T. Farina y A. Silva 1981. *Large scale outdoor algal production for rearing seeds oysters and clams to juvenile stage. En: Nursery Culturing of Bivalve*

Molluscs. Claus C., N. De Pauw y E. Jaspers (Eds.)
Belgium.

GUILLARD, R.R.L. 1974. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith, W.L. y M. H. Chanley (Editores). Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Publ. Corp., New York. : 29-60.

HELM, M.N. 1977. Mixed algal feeding of Ostrea edulis larvae with Isochrysis galbana and Tetraselmis suecica. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 57 : 1019-1029.

_____, D.L. Holland y R.R. Stephenson 1973. The effects of supplementary algal feeding on a hatchery breeding stock of Ostrea edulis, on larval vigour. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 53 : 673-684.

LAING I. y M.N. Helm 1981. Factors affecting the semicontinuous production of Tetraselmis suecica (Kylin) Butch in 200-L vessels. Aquaculture No. 22 : 137-148.

LOOSANOFF, V.L. y J.B. Engle 1942. Use of complete fertilizers in cultivation of microorganisms. Science, No. 95, : 487-488.

OJEDA, A. y A. Afonso 1986. Estudio comparativo del

crecimiento y composici6n quimica de tres especies fitoplanct6nicas utilizando cuatro fuentes de nitr6geno. Inf. Tec. Inst. Esp. Oceanogr. No. 45.

PADILLA, M. 1975. Crecimiento poblacional de Tetraselmis suecica (chlorophyceae) en ambiente controlado. Rev. Biol. Mar. Valparaiso. Vol. 15 No. 3 : 287-296.

PANIAGUA, J. y L.F. Buckle 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. Aut6n. M6xico. No. 12, Vol. 1 : 59-70.

PARSONS, T.R., K. Stephens y M. Takahashi 1972. The fertilization of Great Central Lake. I: Effect of primary production. Fishery Bull. No. 70. Vol. 1, pp. 13-24.

PERSOONE, G. y C. Claus 1980. Mass culture of algae: A bottle-neck in the nursery culturing of molluscs. En: Shelef G. y C. J. Soeder (Editores). Algae Biomass. Elsevier/North Holland Biomedical Press., Amsterdam, pp. 265-285.

RYTHER, J.H., W.M. Dunstan, K.R. Tenore y J.E. Huguenin 1972. Controlled eutrophication increasing food

production from the sea by recycling human waste.
BioScience, no. 22, Vol. 3 : 144-152.

SOEDER, C.J. 1980. Massive cultivation of microalgae:
results and prospects. *Hydrobiologia*, No. 72 : 197-209.

SOKAL, R. R. y F. J. Rohlf. 1979. *Biometria*.
Ediciones H. Blume, Madrid España, 832 p.

TRICK, C.G. 1979. The life cycle of Platymonas
impellucida McLachlan et Parke (Prasinophyceae) in culture.
Proc. R. Soc. Sci. Vol. 29 : 215-222.

WALNE, P.R. 1974. Culture of bivalve molluscs, 50
years experience at Conway. *Fishing News (Books) Ltd.*
England. 173p.