

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

UNIDAD DE CIENCIAS MARINAS

CULTIVO CONTINUO DE LA MICRO ALGA Monochrysis lutheri
BAJO CONDICIONES RUDIMENTARIAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL ESTUDIO DE

O C E A N O L O G O

P R E S E N T A

CARLOS J. CACERES MARTINES

ENSENADA, BAJA CFA., 1979

A mis Padres.

CARLOS Y OLIVIA.

A mi esposa.

MA. ZULEMA GRICELDA.

T A B L A D E C O N T E N I D O

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES TEORICOS SOBRE LOS CULTIVOS CONTINUOS. 3	3
MATERIALES Y METODOS.....	10
1. El Quemostato.....	11
a). Cámara de Cultivo.....	12
b). Recipiente del Medio de Cultivo.....	13
c). Recipiente Distribuidor.....	13
2. Preparación del medio de Cultivo y su Esterilización.....	14
3. El Organismo.....	15
4. Mediciones de Densidad de los Cultivos (X).....	16
5. Método de Obtención para los Valores de Dilución Velocidad de Crecimiento y la Producción Máxima.....	16
a). Dilución.....	16
b). Velocidad de Crecimiento.....	17
c). Producción Máxima.....	17
RESULTADOS.....	22
1. El Aparato de Cultivo.....	22
2. Constante de Velocidad de Crecimiento Máxima.....	24
3. Velocidad de Dilución para la Máxima Producción.....	25
a). Metodología de Droop (1966).....	25
b). Aproximación a la Ecuación de Monod.....	27
4. Comparación de las Aproximaciones al Modelo Predictivo de Monod.....	27
5. Constante de Cosecha Y y Constante de Saturación K_s	28
DISCUSION.....	28
1. El Quemostato Diseñado.....	28
2. Producción del Sistema.....	30

3. La Precisión de los Datos para el Estado de Equilibrio.....	31
4. Aproximación a la Ecuación de Monod.....	34
CONCLUSIONES.....	36
AGRADECIMIENTO.....	38
FIGURAS.....	39
REFERENCIAS.....	43
APENDICES.....	47

INTRODUCCION.

En la mayoría de las áreas de la acuicultura el factor limitante y el problema más urgente a resolver, es la fuente constante de alimento vivo, esencial para la mayoría de los estadios larvales de moluscos, crustáceos y peces cultivables (Droop, 1975) Este alimento se obtiene de cultivos de microalgas y zoopláncton en general.

Para el caso del fitopláncton las técnicas más usadas se encuentran descritas en los trabajos de Guillard (1972) y Stein (1973) y son métodos de cultivo discontinuos conocidos como cultivos de tina. El mantenimiento de éstos, trae consigo toda una serie de problemas técnicos, los cuales se han tratado de evitar sustituyendo el alimento vivo por dietas líquidas microencapsuladas (Meyers et al. 1971; Jones et al. 1974; Gabbott et al. 1975; y Gatesoupe y Luquet, 1977) o por algas que, después de ser cultivadas en sistemas discontinuos, sean sometidas a algún tratamiento que permita almacenarlas por tiempo indefinido (Holm-Hansen, 1973; Sorgeloos, 1974; y Flassch et al. 1975) El problema real que es la demanda de una fuente constante de organismos vivos disponibles para ser usados como alimento no se resuelve con las técnicas antes citadas.

Una solución a éste problema, está en el sentido de la automatización y optimización de los sistemas para convertirlos:

de cultivos discontinuos a cultivos continuos (Dunstand y Menzel, 1971; Retovsky, 1966; y Droop, 1975).

Se han publicado numerosos trabajos sobre la automatización de los cultivos en forma continua a partir de la tercera década de éste siglo, sin embargo, la teoría básica fue desarrollada por Monod en 1950, para su uso en microbiología, en el cultivo de bacterias. Su aplicación a los cultivos continuos para algas unicelulares está aún perfeccionándose (Droop, 1975).

Se puede resumir la definición de cultivo continuo como, un sistema de flujo, donde células individuales están suspendidas en un volumen constante, manteniendo a la población en el estadio de equilibrio. Esto permite recuperar un volumen equivalente del cultivo por cada adición de medio nutritivo, de tal forma que la velocidad con la cual el cultivo crece debe de ser igual a la velocidad con que es lavado (Herbert, 1964) .

Las ventajas de los cultivos continuos son discutidas ampliamente por Herbert (1956), Kubitschek (1970) y Droop (1975), de donde quizás el punto que merece más atención es, que la concentración de células en un cultivo continuo se mantiene independiente de la velocidad de crecimiento, con el consiguiente ahorro de espacio y tiempo requeridos en su mantenimiento.

Entre las microalgas cultivadas para su uso en acuicultura

una de las más importantes es Monochrysis lutheri. Esta crisofita se cultiva actualmente en la Unidad de Ciencias Marinas en sistemas discontinuos, para alimentar larvas y adultos de moluscos. En adición su biología ampliamente descrita por Droop (1958, 1966, 1968, y 1970) la convierten en un organismo adecuado para realizar pruebas sobre cultivos continuos.

El objetivo del presente trabajo, es presentar una nueva tecnica de cultivo continuo que permita trabajar bajo condiciones rudimentarias. Para hacer ésto posible se diseñó un aparato de cultivo continuo que puede ser construido en cualquier parte de nuestro país. Las características de este obligaron a desarrollar un nuevo modelo teórico de predicción para la produccion de M. lutheri que puede aplicarse bajo estas condiciones.

ANTECEDENTES TEORICOS SOBRE LOS CULTIVOS CONTINUOS.

Para los cultivos continuos se requiere de un recipiente de flujo, que es esencialmente un vaso de volumen constante con una entrada y salida a través de las cuales circula un flujo medio, que puede tener una velocidad controlada (Droop, 1975).

Consideremos un recipiente de volúmen V , con una velocidad de flujo constante f , cuyo contenido se encuentra perfectamente mezclado mediante algun mecanismo interno del propio recipiente, y $x(t)$ el número de partículas en suspensión dentro del recipiente existentes al tiempo t . En un intervalo de tiempo $(t, t+h)$ un cierto número de éstas habrán abandonado el recipiente con una velocidad f/V , llamada velocidad de lavado o dilución. Por otro lado si suponemos que el patrón de crecimiento que siguen las partículas en suspensión es de tipo exponencial con una velocidad de crecimiento μ , la velocidad instantánea de crecimiento del número de partículas dentro del recipiente, por partícula (per capita), toma la forma:

$1/X \cdot dX/dt = (\text{velocidad de crecimiento}) - (\text{velocidad de lavado})$
es decir,

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu - \frac{f}{V}$$

o bien

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{f}{V} X \quad (1)$$

dónde $D = f/V$

Si $\mu = D$ entonces el cambio de partículas por unidad de tiempo es cero. Cuando $\mu = D$ el sistema se encuentra en equilibrio (Monod, 1950). Para determinar como se logra este estado es necesario tener en cuenta la cantidad de nutrientes que entran al sistema y su efecto sobre la velocidad de crecimiento.

Monod (1950) mostró que la relación entre la velocidad de crecimiento por partícula y la concentración del sustrato esencial (S), sigue la misma relación que la descrita por Michaelis-Menten para la actividad enzimática. De esta forma la velocidad de crecimiento dependerá de la concentración del sustrato (S) cuando éste se encuentra por debajo del valor de saturación, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\mu = \mu_m \left[\frac{S}{K_s + S} \right] \quad (2)$$

en dónde:

μ_m = constante correspondiente al valor máximo de μ a niveles de la concentración del sustrato más altos que K_s .

K_s = constante de saturación numéricamente igual a la concentración

del sustrato que corresponde a $\mu = 1/2 \mu_m$.

De la ecuación (2) puede verse que hay varios valores posibles para μ ($0 < \mu < \mu_m$), dependiendo del valor de la concentración del sustrato (S) el cual puede escogerse de la manera apropiada para que se ajuste a los requerimientos experimentales. El hecho es que para cada valor posible de S (consecuentemente de μ) se tendrá un crecimiento exponencial. Desde el punto de vista de Monod (1950) éste es el efecto de mayor importancia en los cultivos continuos.

La variación instantánea del material celular dependerá de la variación instantánea de la concentración S del sustrato. La forma de dependencia es una proporcionalidad, o sea:

$$\left(\begin{array}{l} \text{variación instantánea} \\ \text{del material celular} \end{array} \right) \propto \left(\begin{array}{l} \text{variación instantánea} \\ \text{de la concentración} \\ \text{del sustrato} \end{array} \right)$$

es decir,

$$\frac{dX}{dt} = -Y \frac{dS}{dt} \quad (3)$$

donde a la constante de proporcionalidad se le conoce como constante de producción que significa el número de células formadas por unidad de sustrato.

Para los sistemas de cultivo continuo se asume que todos los sustratos en la entrada se encuentran en exceso y solamente hay que considerar uno solo que se encuentre en una concentración S_r conocida que será nuestro sustrato limitante. También se debe asumir que todos los factores físicos son adecuados y no podrán convertirse en limitantes (Herbert et al. 1956).

La velocidad de dilución tiene un efecto sobre la concentración de S , de tal forma que si S_r es la concentración del sustrato en la entrada y S la concentración del sustrato no usada que queda en el aparato, la velocidad de cambio del sustrato se obtiene como:

Cambio de S = Entrada - Salida - Conc. usada en el
Crecimiento

$$\frac{dS}{dt} = DS_r - DS - \mu \frac{X}{Y} \quad (4)$$

Con las ecuaciones 1, 2 y 4 podemos obtener, sustituyendo (2) en (1), el cambio instantáneo de organismos en el instante t :

$$\frac{dX}{dt} = X \left[\mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) - D \right] \quad (5)$$

Sustituyendo (2) en la ecuación (5) obtenemos que el cambio instantáneo del sustrato es:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_r - S) - \mu_m \frac{X}{Y} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (6)$$

Estas ecuaciones son fundamentales para el cultivo continuo (Herbert et al. 1956). De la ecuación (2) se puede obtener el valor de S, obteniéndose:

$$S = K_s \left(\frac{\mu}{\mu_m - \mu} \right) \quad (7)$$

Ahora en el caso de equilibrio, de la ecuación (1) puede verse que éste corresponde a cuando $\mu = D$, entonces S toma la forma:

$$S = K_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \quad (8)$$

De la ecuación (3) puede verse que cuando la población se encuentra en estado de equilibrio ($dX/dt = 0$) también debe suceder que $dS/dt = 0$ ya que Y es distinta de cero. Esto, en la ecuación (4) significa que:

$$X = Y(S_r - S) \quad (9)$$

sustituyendo (8) en (9) tendremos:

$$X = Y \left[S_r - K_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \right] \quad (10)$$

De éstas ecuaciones las concentraciones de X y S pueden ser predecidas para cualquier valor de D y S_r siempre y cuando contemos con los valores de Y , K_s y μ_m (Monod, 1950).

Con la ecuación 2 podemos obtener la velocidad de dilución crítica (D_c) que se alcanzará cuando tengamos el valor mas alto posible de μ que corresponde a $D_c \approx \mu_m$ donde $S_r \gg K_s$.

$$D_c = \mu_m \left(\frac{S_r}{K_s + S_r} \right) \quad (11)$$

Con lo anterior podemos definir a la producción de un aparato de cultivo continuo como la cantidad de organismos producidos por unidad de tiempo por unidad de volúmen (DX), ésto se obtiene multiplicando por D ambos lados de la ecuación 10 así:

$$DX = DY \left[S_r - K_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \right] \quad (12)$$

Así si D se incrementa de cero a D_c , X decrece de YS_r a cero.

Para encontrar el valor de D que hace que la cantida de organismos producidos por unidad de tiempo por unidad de volúmen en DX, sea máxima, se usan*propias del calculo diferencial. Este valor resulta ser: (ver apendice I para la derivación y la seleccion de la raíz)

$$D_m = \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_r}} \right) \quad (13)$$

* las técnicas

MATERIALES Y METODOS

Para el cultivo continuo se han desarrollado dos tipos de

aparatos automáticos: Uno de ellos es un recipiente que mantiene una densidad de cultivo constante, regulada por un fotodetector que registra la densidad óptica: cuando ésta aumenta, se diluye el cultivo con medio nutritivo (Turbidostato) El otro tipo de aparato, controla la densidad con la velocidad de lavado con medio nutritivo (Quemostato).

En la literatura se describen muchos aparatos con las características anteriores (Droop, 1966; Carpenter, 1968; Taub et al. 1968; Dunstan y Menzel, 1971; Paasche, 1973; Ukeles, 1973; Sorgeloos et al. 1976; y Canzonier y Brunetti, 1975) sin embargo, no dejan de ser costosos y complicados por requerir sistemas complementarios muy especializados que convierten al sistema en poco usual, a pesar de sus ventajas en el ahorro de tiempo para su mantenimiento y disponibilidad constante del organismo cultivado. Para éste trabajo se eligió usar un quemostato por ser el aparato más sencillo de simplificar.

1. - El Quemostato:

El diseño del quemostato para el cultivo de M. lutheri (Fig. 1) se basa en los trabajos y recomendaciones de Droop (1966), Elsworth (1969), Persoone y Sorgeloos (1975), Ukeles (1973),

Canzonier y Brunetti (1975) y Sorgeloos et al. (1976) y consta de tres partes:

a. - Cámara de Cultivo:

La primera cámara es la de cultivo (3). Es un tubo de plástico, de acuerdo con Persoone y Sorgeloos (1975), de una longitud de 50 cm., tapado en sus extremos con placas de acrílico que descansan sobre anillos de PVC de 15 cm. de diámetro. Este recipiente se encuentra a 10 cm. de distancia de una lámpara (Sylvania de 132 cm. de longitud, tipo luz fría) que se mantiene encendida todo el tiempo.

La cámara de cultivo (3) cuenta con cuatro salidas: dos superiores y dos inferiores, de estas últimas, una de ellas es la entrada de aire que mantiene el cultivo homogéneo, no sin antes ser filtrado a través de carbon activado y algodón contenidos en un tubo de vidrio pyrex de 30 cm. de largo y 2 cm. de diámetro, que se mantiene seco con una resistencia de 7.5 v., enredada en éste (A) Elsworth (1969). La segunda es la línea del sifón de nivel constante (a), que mantiene un volúmen definido en dicho recipiente. Las superiores son la entrada de medio de cultivo y el escape de aire, que se conecta a un tubo de ensayo que contiene agua destilada a fin de evitar la entrada de aire en caso de accidente (válvula, f).

b. - Recipiente del Medio de Cultivo:

La segunda cámara que contiene el medio de cultivo (1), tiene las mismas características que la primera aunque con una longitud de 150 cm.

El recipiente (1) se llena con medio de cultivo usando la entrada (b) a la cual se adapta un embudo de nalgano de 10 cm. de diámetro. Por la parte inferior se encuentra una entrada de aire filtrado a fin de mantener el medio homogéneo (i), existe una segunda salida que se conecta con un filtro mecánico (j) que consiste en un tubo de plástico de 3 cm. de diámetro y 15 cm. de longitud que contiene fibra de plástico, de este una línea lo conecta a la unidad de esterilización de rayos ultravioleta (UV) bactericida (B) montada sobre tubería de PVC, de esta parte una línea (c) que se conecta directamente con el recipiente (2) a la cual se une una entrada de aire filtrado (d), creando una corriente de aire-agua que llena el recipiente (2), el exceso de agua se drena por (e), regresando al recipiente (1), donde el aire escapa por la salida superior (f) que cuenta con una válvula similar a la anterior. En la línea de aire se encuentra una válvula horizontal (h) a fin de evitar la entrada de agua en el filtro de aire en caso de accidente.

c. - Recipiente Distribuidor:

La tercera cámara es el recipiente distribuidor (2), que es una botella de suero de 150 ml. de capacidad con su respectivo tapón de goma.

Al recipiente distribuidor, se conecta el capilar (g) intercambiable, que lleva el medio al recipiente de cultivo, esto permite controlar la velocidad de lavado usando tubos capilares de diferentes capacidades. El aparato de cultivo, cuenta además con una cámara de crecimiento extra, que sustituye a la original en caso de accidente por contaminación.

2. - Preparación del Medio de Cultivo y su Esterilización:

La esterilización de todos los materiales del aparato consistió en lavados con hipoclorito de sodio, en una solución al 1.5 por ciento durante 24 horas, exceptuando los tubos de polietileno, que se encontraban estériles de fábrica.

El medio de cultivo usado fue f/2 de Guillard (1972), preparado libre de vitaminas: su esterilización fue Química y consistió en la adición de 3 ml. de hipoclorito de sodio por litro de medio, dejándolo reposar 12 horas y después precipitar el hipoclorito con 150 mg. de tiosulfato de sodio por litro de medio

de cultivo (Hemerick, 1973). Después de éste tratamiento se forma un precipitado cuyo efecto sobre el crecimiento de M. lutheri no se ha contemplado en éste trabajo.

La solución de vitaminas, se preparó de acuerdo con el medio #/2, modificando únicamente la concentración de vitamina B12 para tener 10 μg /ml. de medio de cultivo, con el fin de que ésta concentración fuera el valor del sustrato limitante de acuerdo con Droop (1958). La solución madre de vitaminas fue mantenida en ampollitas selladas de 5 ml., esterilizadas en autoclave a 3 Kg/cm² y 125 °C durante 10 min. previamente acidificadas (Guillard 1972) las cuales posteriormente fueron almacenadas en un congelador. La esterilización de los recipientes y el medio de cultivo para la reserva de M. lutheri fue similar al tratamiento de las vitaminas aunque el tiempo de permanencia en la autoclave fue de 15 minutos.

3. - El Organismo:

Cuatro recipientes erlenmeyer de 125 ml. fueron usados para mantener la reserva del alga M. lutheri, que fue donada por el Dr Thomas del National Marine Fisheries Service en La Jolla, Calif. Las vitaminas se añadieron después de que los materiales y el medio de cultivo fueron esterilizados y se les permitió reposar 12 horas en una caja de transferencia con luz ultravioleta (Hamilton, 1973).

La reserva de M. lutheri, fué mantenido en un cuarto con temperatura controlada de 20 ± 1 °C e iluminación constante y su condición fué monoxenica.

El inóculo de los recipientes del quemostato consistio en un litro de cultivo de la especie con una densidad promedio de 250×10^3 cel. por ml. que fué transferida usando una corriente de aire filtrado, para desplazar el volumen del recipiente del inóculo, a través de una conexión con la cámara de crecimiento del aparato.

4. - Mediciones de Densidad de los Cultivos :

La densidad del cultivo (X) en cel./ml. se determinó por conteos de células en un hematocitometro de 0.1 mm. de profundidad, con el fin de reducir el error en el conteo : se determinó el número de células para cuatro cámaras y determinar su promedio.

5. - Método de obtención para los valores de Dilución, Velocidad de Crecimiento y la Producción Máxima:

a). - Dilución.

La determinación de los valores correspondientes de dilución se realizó con las mediciones del volumen recuperado cada 24 horas

en un recipiente colector de 19 litros, definiendo las unidades del valor de flujo en litros.

b). - Velocidad de Crecimiento.

La metodología usada para determinar el valor de la velocidad de crecimiento μ fué de acuerdo con la recomendación de Quillard (1973) así la ecuación queda como:

$$\frac{3.322}{t_2 - t_1} \left[\log \frac{X_2}{X_1} \right] = \mu$$

dónde:

3.322=factor que nos permite trabajar con logaritmo de base 2 .

t_n = al tiempo de lectura correspondiente al

número de organismos observados (X_n) .

Donde los puntos del período exponencial fueron seleccionados por inspección de la grafica $\log. X$ contra t (Quillard, 1973).

c). - Producción Máxima.

La determinación de la producción máxima (DX) siguió dos caminos. el propuesto por Droop (1966) y el desarrollado en éste trabajo.

Para el primer método fue necesario obtener una regresión lineal de los datos graficados de densidad X contra dilución D. La ecuación nos describe X en función de D, que nos permite obtener el producto DX que tiene un máximo cuando $f'(D)=0$, y describe la producción máxima para el quemostato.

El segundo método consiste en desconocer la aparente relación lineal de X contra D y elaborar un modelo teórico que se asemeje a la ecuación descrita por Monod (1950) como DX o producción. Para esto fue necesario desarrollar uno de sus términos con una serie de Taylor alrededor de cero y elaborar una ecuación que nos permita describir el comportamiento no lineal. La determinación de los coeficientes de la ecuación nos permite obtener la solución del sistema DX como una aproximación a la ecuación de Monod, y ofrece además la alternativa de la determinación teórica de la constante de saturación K_s y la constante de producción Y.

La ecuación 12 puede representarse como sigue:

$$f(D) = AD - \frac{BD^2}{C-D} = AD - \frac{BD^2}{C} \left[\frac{1}{1 - \frac{D}{C}} \right] \quad (14)$$

donde:

$$A = YS_r \quad B = YK_s \quad y \quad C = \mu_m$$

Desarrollando en serie de Taylor el término $(1/(1-D/C))$ alrededor de cero tenemos que

$$\left[\frac{1}{1-\frac{D}{C}} \right] \approx 1 + \frac{D}{C} + \frac{D^2}{C^2} + \dots \quad (15)$$

Como $C \gg D$ (ya que si la dilución D es mayor que la velocidad máxima de crecimiento entonces el cultivo es lavado), entonces en el desarrollo en serie de Taylor podemos despreciar desde los términos cuadráticos en adelante, quedándonos simplemente:

$$\left[\frac{1}{1-\frac{D}{C}} \right] \approx 1 + \frac{D}{C} \quad (16)$$

Sustituyendo esta aproximación en la ecuación (14), nos queda

$$\begin{aligned} DX &\approx AD - \frac{BD^2}{C} \left[1 + \frac{D}{C} \right] \\ DX &\approx AD - \frac{BD^2}{C} - \frac{BD^3}{C^2} \end{aligned} \quad (17)$$

dividiendo entre D:

$$X \approx A - B \left(\frac{D}{C} + \frac{D^2}{C^2} \right) \quad (18)$$

Los coeficientes A y B que aparecen aquí pueden ser determinados ajustando una curva por el método de mínimos cuadrados que mejor se ajuste a los datos experimentales, pero que sea de la forma (18). Haciendo esto tendremos:

$$E(A, B) = \sum_{i=1}^N \left[X_i - \left\{ A - B \left(\frac{D_i}{C} + \frac{D_i^2}{C^2} \right) \right\} \right]^2 \quad (19)$$

derivando parcialmente primero con respecto a A y después con respecto a B, tenemos:

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

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

donde N es el número de datos. igualando a cero y reordenando:

$$\sum_{i=1}^N X_i - NA + B \sum_{i=1}^N \left(\frac{D_i}{C} + \frac{D_i^2}{C} \right) = 0 \quad (20)$$

$$\sum_{i=1}^N X_i \left(\frac{D_i}{C} + \frac{D_i^2}{C^2} \right) - A \sum_{i=1}^N \left(\frac{D_i}{C} + \frac{D_i^2}{C^2} \right) + B \sum_{i=1}^N \left(\frac{D_i}{C} + \frac{D_i^2}{C^2} \right)^2 = 0 \quad (21)$$

definiendo S1, S2, S3 y S4 como:

$$S_1 = \sum_{i=1}^N X_i$$

$$S_3 = \sum_{i=1}^N X_i \left(\frac{D_i}{C} + \frac{D_i^2}{C^2} \right)$$

$$S_2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{D_i}{C} + \frac{D_i^2}{C^2} \right)$$

$$S_4 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{D_i}{C} + \frac{D_i^2}{C^2} \right)^2$$

podemos escribir 20 y 21 como sigue:

$$S_1 - NA + BS_2 = 0$$

$$S_3 - AS_2 + BS_4 = 0$$

reordenando nos queda el siguiente sistema de dos ecuaciones de dos incógnitas:

$$NA - BS_2 = S_1$$

$$AS_2 - BS_4 = S_3$$

cuyo determinante, \det , es

$$\det = DI = \begin{vmatrix} N & -S_2 \\ S_2 & -S_4 \end{vmatrix} = S_2^2 - NS_4$$

obtenemos A y B como:

$$A = \frac{\begin{vmatrix} S_1 & -S_2 \\ S_3 & -S_4 \end{vmatrix}}{DI} = \frac{S_2 S_3 - S_1 S_4}{DI}$$

$$B = \frac{\begin{vmatrix} N_1 & -S_2 \\ S_2 & -S_3 \end{vmatrix}}{DI} = \frac{NS_3 - S_2 S_1}{DI}$$

RESULTADOS

1. - El Aparato de Cultivo

Los primeros ensayos de funcionamiento para el sistema de cultivo continuo bajo condiciones rudimentarias, determinaron el uso de un aparato de filtración de aire (Elsworth, 1969) con el fin de eliminar esporas de Euplotes sp. que contaminaron el sistema, y un aparato de esterilización (Canonier y Brunetti, 1975) para el medio de cultivo con el fin de destruir las algas unicelulares que resistieron en forma de esporas la esterilización química.

Como las diferentes partes del sistema ya han sido descritas,

basta mencionar que las válvulas (f) de la figura 1, se incluyeron para evitar la entrada de aire sin filtrar a las cámaras 1 y 3 en caso de accidente, como por ejemplo un corte en la corriente eléctrica, y de esta manera evitar la contaminación del sistema. El trabajo bajo estas condiciones, muy frecuentes en el sitio de instalación, marcó también la necesidad de incluir un arrancador para la lámpara de UV para encenderla después del apagón.

En la figura 1 se puede ver la disposición de todas las partes del quemostato y puede localizarse la válvula horizontal (h) por encima del nivel del líquido en los recipientes, su localización es importante ya que si por alguna razón el flujo de aire se ve interrumpido, las tuberías de éste se inundan inmediatamente corriendo el riesgo de llegar al filtro de aire (A), ocasionando nuevamente problemas de contaminación. Por consiguiente esta válvula impide el paso de agua al filtro, tanto por su funcionamiento como por su localización.

Los metales quelados en el medio de cultivo, bloquearon frecuentemente al dosificador (g) colocándose por ésta causa un filtro mecánico (j) que trató el medio antes de su arribo al capilar.

El recipiente (1) del quemostato, de una longitud de 1.5 m. fue reforzado en su parte inferior con un doble tubo de plástico

de 50 cm. de longitud . Esto lo causó el uso de tubo de plástico de sólo 0.16 mm. de grosor en comparación con 0.2 mm. recomendados por Persoone y Sorgeloos (1975). Sin embargo el uso de refuerzos nos permitió usar recipientes de hasta 2 m. de largo.

Un punto que requirió mucha atención fue el problema de la homogeneización del cultivo, para ésto se usó un difusor de aire tubular de dos secciones de 5 cm. de largo, como se aprecia en el recipiente (3) de la figura 1. Con ésto la sedimentación no fué apreciable sino hasta después de 30 días de uso continuo. Un problema similar surgió en la tubería del sifón (a) al cual se fijaron una gran cantidad de M. lutheri, por ésto, éste tuvo que ser reemplazado cada 15 días por otro que se encontraba dentro de una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 por ciento.

Por último el sistema de cultivo ocupó un espacio de 50 cm. de base por 2 m. de altura y para su mantenimiento e instalación se ocupó la labor de dos personas.

2. - Constante de Velocidad de Crecimiento Máxima.

Como en el período de crecimiento exponencial la concentración del sustrato es muy grande comparada con el valor de K_s entonces el valor de la velocidad de crecimiento es μ_{max} (Herbert et al. 1956).

Para determinar μ_m fue necesario realizar cultivos estáticos y obtener la curva de crecimiento del organismo. Esto fue posible al calibrar el quemostato con un flujo nulo y drenar el líquido hasta conservar solamente un litro del cultivo, completando el resto con medio nutritivo (9 l.).

Siete curvas de crecimiento fueron obtenidas de ésta forma y sus respectivos valores de μ se muestran en la Tabla I. Estos valores fueron promediados para obtener la velocidad de crecimiento máxima μ_m (0.875) con un error estandar de 0.18.

2. - Velocidad de Dilución para la Máxima Producción .

Treinta y cuatro lecturas del numero de células en el estadio de equilibrio y sus correspondientes valores de dilución fueron obtenidas del quemostato durante un período de 3 meses, trabajando con diluciones entre 0.15 y 0.70 volúmenes por día (Tabla II). La concentración del sustrato en la entrada fue de 10 $\mu\text{g./ml.}$ de vitamina B12 correspondiente al valor de S_r .

Las lecturas anteriores se usaron para determinar la máxima producción utilizando:

a). - Metodología de Droop (1966).

Asumiendo la relación de X contra D como lineal (Fig. 2) obtenemos la regresión de mínimos cuadrados que está representada por la siguiente ecuación :

$$f(X) = -18.14D - 16.03$$

Construyamos ahora la función que nos representa la producción del sistema, multiplicando por D ambos lados de la ecuación anterior

$$DX = f_1(D) = -18.14D^2 - 16.03D$$

La gráfica de esta función es una parábola y como D y DX son ambas positivas entonces la parte de la gráfica que tiene interés se encuentra en el primer cuadrante.

Derivando DX, con respecto a D e igualando a cero seleccionamos la D que hace que DX sea máxima, en particular ésta resulta ser:

$$D_m = 0.44 \text{ vol/día.}$$

b). - Aproximación a la ecuación de Monod.

Los valores de los coeficientes obtenidos por el método desarrollado son $A=14.50$ y $B=7.84$ que nos definen la relación entre la dilución y densidad como:

$$\text{utilizando en } DX = A - B \cdot D$$

$$f(D)=DX = 14.5D - 8.9D^2 - 10.3D^3$$

Relación que nos representa una parábola no simétrica (Fig. 3), en donde el valor de la dilución máxima será tal que la derivada de DX con respecto de D sea cero:

$$f'(D) = 14.5 - 17.8D - 30.9D^2$$

$$f' = 0$$

$$D_m = 0.45 \text{ vol./día}$$

4. - Comparación de las Aproximaciones al Modelo predictorio de Monod.

Después de calcular la dilución máxima con los modelos de Droop (1966) y el desarrollado en éste trabajo, se calcularon la suma de errores cuadrados para discernir entre el modelo que más se ajuste al comportamiento de los datos reales. Los resultados son, para la recta de regresión X contra D (Droop, 1966) de 315.84, contra la aproximación desarrollada, donde la suma de errores de X

contra D es 173.73, en los intervalos, de $D=0.1$ hasta 0.89. La (Tabla III) muestra los valores de la suma de errores cuadrados para diferentes intervalos que definen una mejor aproximación para el modelo desarrollado e incrementa su exactitud para las diluciones mayores, comparado con el modelo de Droop (Fig. 2 y 3).

5. - Constante de Cosecha Y y Constante de Saturación K_s .

Los valores de los coeficientes A y B permitieron obtener los valores de Y como 1.45 cel. / μg . de B_{12} , y K_s como 5.4 μg de B_{12} . Los valores de Y y K_s de acuerdo con la metodología de Droop no fueron calculados, ya que este ensayo biológico no se pudo reproducir por la dificultad de trabajar en condiciones axénicas.

La curva de Monod (Fig. 2 y 3) se obtuvo sustituyendo los valores de K_s y Y en las ecuaciones 10 y 13.

DISCUSION

1.- El quemostato Diseñado.

Las ventajas de trabajar con sistemas de cultivo para fitoplácton que cuenten con recipientes de un diámetro menor a su

altura han sido discutidas ampliamente por Persoone y Sorgeloos (1975), del cual pueden resumirse los siguientes puntos:

- a) Una mejor mezcla del cultivo que evita la sedimentación y distribuye de mejor manera los nutrientes que entran a la cámara por unidad de tiempo.
- b) El tiempo de exposición a la fuente luminosa es regular y mayor que para los sistemas con diámetros mayores.
- c) Un ahorro de espacio en su instalación en comparación con los recipientes convencionales de cultivo.

De los puntos citados, el que merece más atención al construir una cámara de cultivo es el segundo, ya que la fuente luminosa para los cultivos de algas unicelulares, es un factor limitante para su crecimiento (Droop, 1975). Por esta razón los resultados para los valores de densidad en el sistema usado son mayores que los reportados para los recipientes convencionales de cultivo, este efecto no solo ocurre para M. lutheri sino también para otras especies (Persoone y Sorgeloos, 1975).

En adición a las ventajas antes mencionadas, los recipientes usados para la construcción del sistema son de materiales económicos como los tubos de polietileno y las botellas de suero que pueden adquirirse en cualquier parte del país (ver apéndice II).

Estas características convierten al sistema en desechable y

de fácil reemplazo, efecto que reduce la labor de mantenimiento. El equipo de aereación lo integra únicamente una bomba de aire de las usadas en la acuarofilia. El único aparato de difícil adquisición que forma parte del sistema, es la unidad de esterilización UV que puede considerarse como sofisticado; sin embargo, la necesidad de mantener el sistema libre de contaminación justifica su adquisición.

2. - Producción del Sistema.

Los sistemas de cultivo continuo para algas unicelulares a gran escala, no se encuentran descritos en la literatura consultada a excepción de los trabajos de Dunstan y Menzel (1971), Ukeles (1973) y Droop (1975). La mayoría de los trabajos, muy bien resumidos por Ukeles (1976), se refieren a sistemas de pequeña escala, para estudios de nutrición y cinética. Los trabajos con M. lutheri están limitados a los descritos por Droop (1966, 1968 y 1975). Entre éstos solamente el último habla de un sistema de producción a gran escala.

La producción del quemostato es de 230×10^9 cel./semana, en un volumen de 28 l. comparado con la producción del sistema de Droop (1975) de 320×10^9 cel./semana en un volumen de 46 l. La producción es similar aunque el valor de 230 en el sistema de Droop correspondería a un volumen de 33 l.. Sin embargo el volumen

total y el espacio ocupado por el quemostato diseñado, abren una línea de investigación para realizar ensayos de producción masiva. En consecuencia, es muy grande la posibilidad de contar con un sistema de producción mas eficiente.

↓
Podemos considerar un sistema de cultivo masivo basado en unidades de crecimiento alrededor de una sola fuente luminosa y con un solo recipiente distribuidor, el cual, en un espacio de 2 m. puede albergar a 6 cámaras de crecimiento de 10 l. y a un recipiente de reserva del medio de cultivo de 250 l.. Este sistema sería capaz de producir en condiciones de dilución óptima alrededor de 180 l. por semana conteniendo aproximadamente 1.4×10^{12} cel./semana .

Lo anterior ejemplifica una posible utilización del quemostato diseñado; sin embargo, necesidades particulares de espacio, producción, condiciones ambientales y otras, determinarán las modificaciones del sistema para optimizar su uso.

3.- La precisión de los datos para el estadio de equilibrio.

El proceso de cultivo continuo se caracteriza por mantener a la población cultivada en estadio de equilibrio. Es lógico asumir que manteniendo las condiciones constantes, el sistema pueda funcionar por tiempo ilimitado. Estas condiciones comprenden los

factores físicos, químicos y las características biológicas del organismo, que de ser modificadas, ocasionarán que el sistema alcance una nueva condición de equilibrio a no ser que el cambio sea extremo.

Así la discrepancia de nuestros datos experimentales, con los precedidos por el modelo de Monod (1950) se atribuyen a la ausencia de control de éstos factores, aunque las características del sistema tiendan a solucionarlas. De ésta manera el efecto de una buena homogeneización en la cámara de crecimiento es determinante (Herbert et al. 1956) ya que si las algas unicelulares se fijan sobre cualquier superficie del recipiente, el valor de la dilución crítica D_c no puede obtenerse en forma práctica. Entonces al trabajar con diluciones mayores de 0.88 vol./día, aún encontrábamos algas en el líquido colectado a la salida del quemostato.

Las condiciones higiénicas del laboratorio en dónde se realizó el trabajo no son las más adecuadas para trabajar con sistemas de cultivo en condiciones axénicas o monoxénicas. La dificultad más grande a la que hubo que enfrentarse, fué la contaminación por Dunaliella sp. cultivada en el interior del laboratorio en tanques de 100 l. al descubierto, que interrumpió varias veces el experimento (durante los dos primeros meses de pruebas esto sucedía regularmente después de 15 días de cultivo continuo).

El material y el medio de cultivo, entonces, fueron tratados con mucha precaución y debe de considerarse a éste renglón como el punto débil de cualquier trabajo de cultivo continuo. El hecho de trabajar con una cámara de crecimiento de emergencia fué la alternativa más práctica que resolvió este problema, junto con los mecanismos de filtración de aire y esterilización del medio de cultivo.

La contaminación por otras especies de microalgas puede, en dado caso, ser registrada y tratada con la metodología propuesta por Fencel (1966), lo cual permite predecir el crecimiento del organismo contaminante en la cámara de crecimiento, para su aprovechamiento si las características del trabajo lo permiten.

Como el objeto del trabajo fue el realizarlo bajo condiciones rudimentarias, el sistema se mantuvo a la temperatura ambiente lo cual no tuvo un efecto marcado sobre los resultados obtenidos (Tabla II). De ninguna manera se trata de afirmar que la temperatura no afectó el comportamiento del cultivo; aunque, si el sistema se coloca en un cuarto donde esta se controle, los resultados podrían estar más cerca de los predecidos.

La velocidad de asimilación del sustrato limitante y su efecto sobre la formación de biomasa Y , se ha considerado constante para la elaboración de los modelos predictorios del sistema; aunque esta se encuentra en relación directa, con el

estado fisiológico y la edad del organismo. Esto causa también una discrepancia entre los datos obtenidos y la predicción teórica basada en la ecuación 4 (figuras 2 y 3).

4. - Aproximación a la ecuación de Monod.

La analogía con el proceso químico de la actividad enzimática de Michaelis-Menten, ofrece la solución para elaborar un modelo predictorio aplicando los métodos de Lineweaver y Burk, y la representación gráfica de Eadie-Hofstu, métodos para estimar la constante de saturación K_s (Fenc1, 1966).

Los métodos anteriores requieren de mediciones de la velocidad de crecimiento correspondiente a diferentes concentraciones del sustrato. Estos valores, para el caso de las algas unicelulares, solo pueden identificarse al registrar la velocidad de crecimiento, en un cultivo estático con sus correspondientes valores del cambio en la concentración del sustrato. Esta operación requiere de una metodología y equipo capaz de detectar los cambios en la concentración del sustrato para cualquier momento. El método alternativo es entonces, realizar cultivos estáticos con diferentes concentraciones del sustrato en cuestión, pero en este caso las diferencias de las velocidades de crecimiento no son detectadas y el efecto de la concentración del sustrato repercute solamente sobre la densidad

máxima alcanzada (Droop, 1966).

A raíz de lo anterior se han desarrollado métodos indirectos que permitan obtener los valores de K_s y Y . El método desarrollado por Herbert *et al.* (1956) requiere de mediciones del sustrato residual, para diferentes diluciones, lo que resultaría sofisticado para nuestro caso. El desarrollado por Droop (1966) parece más sencillo, aunque asume que la relación de la densidad y la dilución es lineal, y exige además, que el trabajo se realice en condiciones axénicas a fin de efectuar un ensayo biológico para la determinación del sustrato residual y K_s .

Esta circunstancia obligo el desarrollo de una nueva aproximación que permita, estimar en forma teórica, los valores de K_s y Y partiendo de los pares de valores correspondientes de densidad y dilución.

El desarrollo de éste modelo (ecuación 17) permite también trabajar en condiciones rudimentarias, y requiere solamente de la determinación de la velocidad de crecimiento máxima. Este valor puede obtenerse de una curva de crecimiento para un cultivo estático, y corresponde al punto de inflexión en la curva logística.

El modelo es simplemente una aproximación al descrito por la ecuación 14, desarrollando el último término con una serie de

Taylor alrededor de cero. Este efecto puede verse claramente en las Fig.2 y 3, en donde para diluciones pequeñas el modelo desarrollado es idéntico a la predicción de Monod, sin embargo el modelo, para diluciones mayores, se comporta parabólicamente como la ecuación de Monod, pero se asemeja más a los datos reales.

La aproximación descrita se basa en la ecuación 2 y su discrepancia con los datos reales podría ser atribuida a la relación de consumo del sustrato en función de la velocidad de crecimiento. Esta última, como dijimos antes, está sujeta a variaciones ocasionadas por factores fisiológicos que incluyen desde la edad del organismo hasta su relación con los parámetros del medio ambiente.

Por lo tanto a nuestro juicio, la aproximación a Monod, nos permite obtener un modelo predictorio más cercano a los datos reales, sin asumir relaciones aparentes, en donde la exactitud de los resultados estará en función directa de la precisión en las mediciones de la densidad y la dilución.

CONCLUSIONES.

- 1.-El Quemostato diseñado puede construirse en cualquier parte del país por su precio y su fácil adquisición.

2.- La aproximación al modelo predictorio de producción puede ser aplicada a trabajos bajo condiciones rudimentarias.

3.- El modelo desarrollado ofrece la alternativa de obtener los valores de la constante de saturación y de la constante de cosecha con una exactitud en función directa de la precisión de las mediciones de densidad y dilución.

4.- El sistema de cultivo continuo propuesto puede servir de patrón para desarrollar un sistema de producción a escala masiva.

AGRADECIMIENTO:

La realización de éste trabajo no hubiera sido posible a no ser por la valiosa ayuda prestada por el Matemático Faustino Sánchez G., el P.O. Alejandro Parés y el Dr. Robert Ogden; la colaboración del Dr. Thomas se menciona en el texto.

Mi sincero agradecimiento a todas las personas que con su interés me ayudaron y en especial a la dirección y estímulo del Dr. Jacques Patrois.

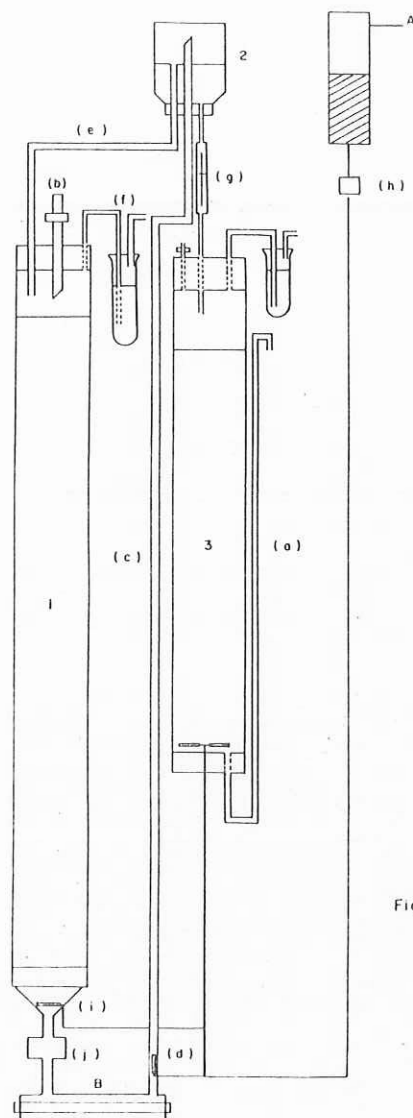


Fig 1 QUEMOSTATO PROPUESTO PARA EL CULTIVO DE *Monochrysis lutheri* EN DONDE:
 1.-RECIPIENTE DEL MEDIO DE CULTIVO
 2.-RECIPIENTE DISTRIBUIDOR.
 3.-CAMARA DE CULTIVO
 A.-FILTRO DE AIRE.
 B.-UNIDAD DE UV

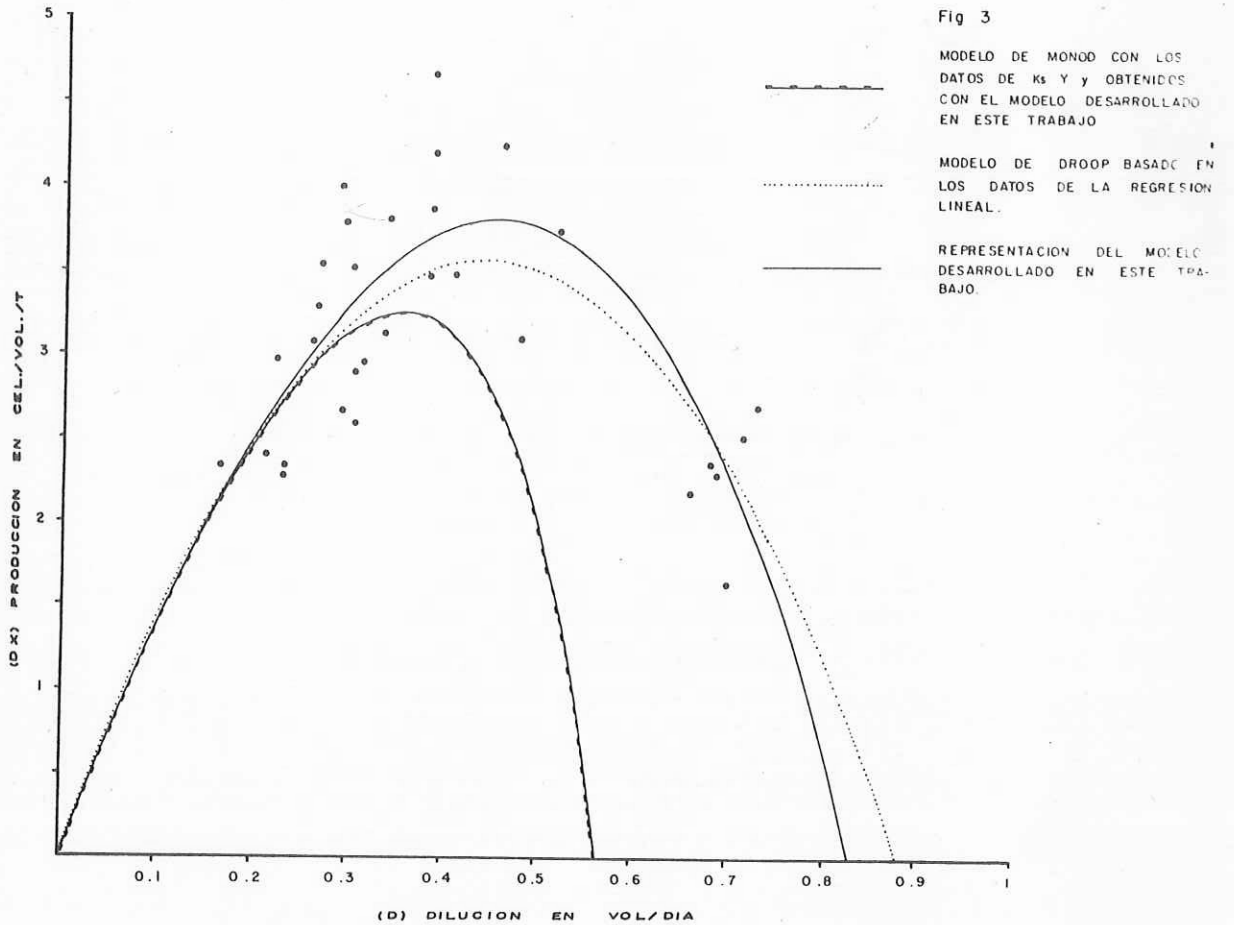
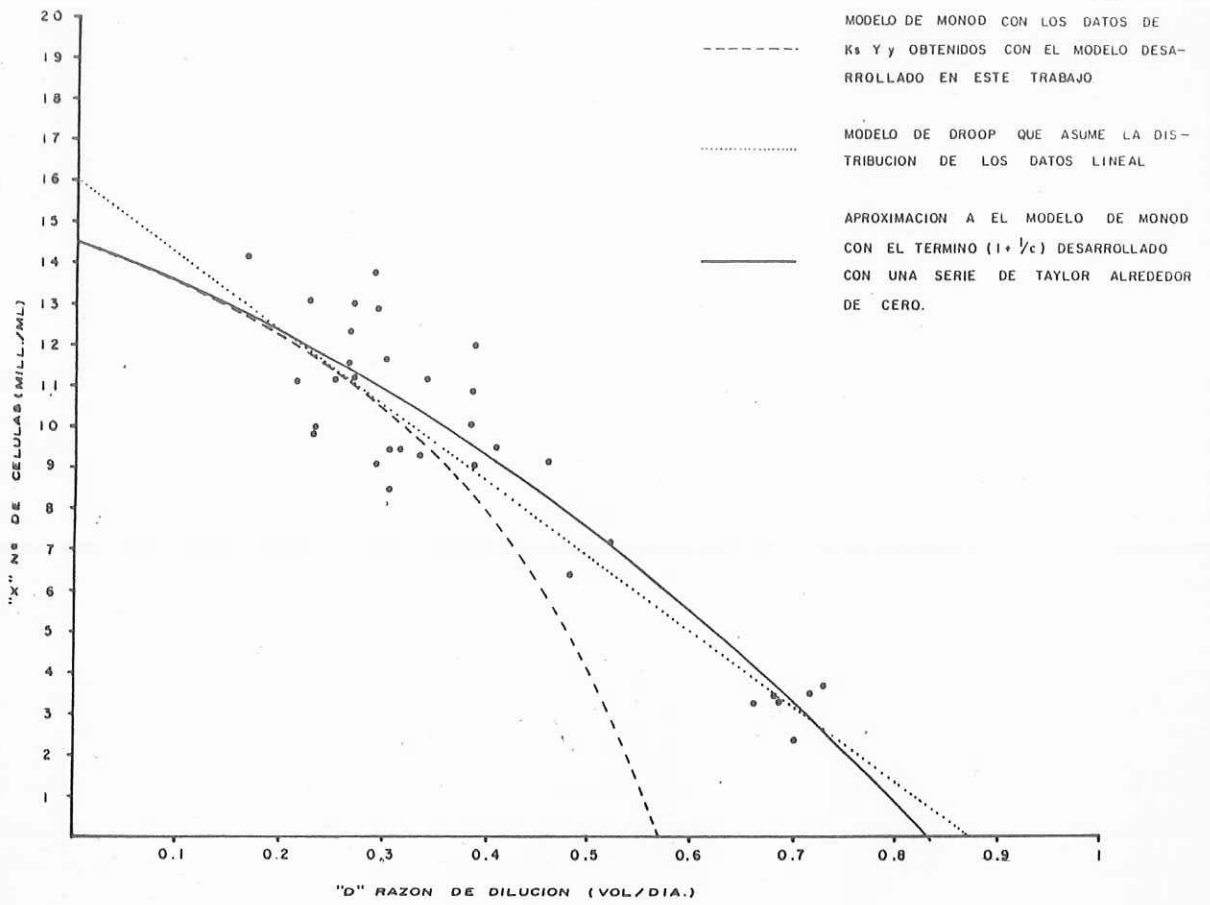


TABLA I-- VALORES DE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO
 PARA 7 CULTIVOS ESTATICOS DE M. lutheri DE
 DONDE SE OBTIENE $\mu_m = 0.875$

CULTIVO N°	Vel. de Crecimiento μ
1	0.8401
2	1.117
3	1.023
4	0.579
5	1.082
6	0.703
7	0.7838

TABLA II MEDICIONES DE DENSIDAD (X), DILUCION (D), Y TEMPERA -
 TURA (T), PARA EL QUEMOSTATO DISEÑADO, LOS VALORES
 DE LA DILUCION ESTAN ORDENADOS EN ORDEN CRECI-
 ENTE.

X	D	T°C	X	D	T°C
14.175	.164	18.0	9.44	.314	19.0
12.206	.200	18.0	9.315	.335	17.0
11.113	.214	18.5	11.141	.340	17.0
13.097	.225	18.5	10.059	.383	17.5
9.834	.231	18.0	9.028	.385	17.0
9.992	.233	17.0	10.85	.385	17.0
11.152	.252	16.0	11.981	.387	17.0
11.524	.264	18.0	8.49	.408	17.0
12.338	.265	17.0	9.160	.460	18.0
13.017	.270	18.0	6.400	.480	23.5
11.191	.271	16.0	7.14	.520	24.0
13.748	.289	18.0	3.277	.660	19.7
12.88	.293	18.5	3.416	.680	19.0
9.045	.293	16.0	3.330	.686	20.7
11.625	.301	17.0	2.332	.70	20.5
8.439	.305	17.0	3.48	.715	21.16
9.431	.306	18.0	3.682	.729	20.7

TABLA III SUMA DE ERRORES CUADRADOS PARA LOS MODELOS DE DROOP 1966 Y EL DESARROLLADO CON ESTE TRABAJO

Intervalo	Droop X contra D	Modelo X contra D
0.1 - 0.89	315	179.73
0.01 - .89	262	207.0
0.3 - .89	451	112.5
0.4 - .89	528.9	79.28
0.7 - .89	897.96	2.34

REFERENCIAS:

- BURLEW, J.S. 1953. Algal culture from laboratory to pilot plant. Publ. Carnegie Inst., No.600. 357p.
- CANZONIER, W.J. y R. Brunetti. 1975. Low-cost continuous algal culture system. En: 10th European Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, 1:27-31.
- CARPENTER, E.J. 1968. A simple inexpensive algal chemostat. Limnol. Oceanogr., 13:720-721.
- CONOVER, R.L. 1970. Cultivation of plankton populations. Helgoländer wiss meeresunters, 21:401-444.
- CRUZ, S.A. de la y Alfonso E. 1975. Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. Ciencias, serie 8, Investigaciones marinas, No.17.
- DAVIS, H.C. y R. Ukeles. 1961. Mass culture of phytoplankton as foods for metazoons. Science, 134:562:564.
- DROOP, M.R. 1958. Requirement for thiamine among some marine and supra-litoral protista. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 37:323-329.
- DROOP, M.R. 1966. Vitamin B12 and marine ecology. III. An experimental with a chemostat. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 46:659-671.
- DROOP, M.R. 1968. Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake growth and inhibition in Monochrysis lutheri. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 48:689-733.
- DROOP, M.R. 1969. Algae. Methods in microbiology. Vol.3B. London: Academic Press, p.269-313.
- DROOP, M.R. 1970. Vitamin B12 and marine ecology. V. Continuous culture as an approach to nutritional kinetics. Helgolander wiss meeresunters, 20:629-636.
- DROOP, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. En: 10th European Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, 1:17-23.
- DUNSTAN, W.M. y D.W. Menzel. 1971. Continuous culture of natural populations of phytoplankton in dilute treated sewage effluent. Limnol. Oceanogr., 16:623-632.
- ELSWORTH, R. 1969. Treatment of process air for deep culture. Methods in Microbiology, Vol.1. London: Academic Press, p.123-136.
- FENCL, Z. 1966. Theoretical analysis of continuous culture systems. Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms. Prague: Czechoslovak Academy of Sciences, p.69-153.

- FLASSCH, J.P., G. Salaun y Y. Normant. 1975. Viability of a phytoflagellate after freezing. En: 6th annual meeting world mariculture society, p.423-428.
- GABBOTT, T.A., D.A. Jones, D.H. Nicholls, R.W. Langton y M.M. Helm. 1975. Studies on the design and acceptability of microcapsulated diets for marine particulate feeders. II. Bivalve molluscs and fish larvae. En: 10th European Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, 1:24-26.
- GATESOUBE, F.J. y Pierre Luquet. 1977. Recherche d'une alimentation artificielle adaptee a l'elevage des stades larvaires des poisson I. Comparaison de quelques techniques destinees a ameliorer la stability a l'eau des aliments. Actes de colloques du C.N.E.M.O. 4:13-20.
- GUILLARD, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana, (Hustedt) and Detonula confervacea (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol., 8:229-230.
- GUILLARD, R.R.L. y V. Cassie. 1963. Minimum cyanocobalamin requirements of some marine centric diatoms. Limnol. Oceanogr., 8: 161-168.
- GUILLARD, R.R.L. 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of marine invertebrates animals. New York: Plenum, 409 p.
- GUILLARD, R.R.L. 1973. Division rates. Handbook of phycological methods. London: Cambridge U. Press, p.289-311.
- HARE, T.A. y R.R. Schmidt. 1968. Continuous dilution method for mass culture of synchronizaed cells. Appl. microbiol., 16:496-499.
- HAMILTON, R.D. 1973. Sterilization. Handbook of phycological methods. London: Cambridge U. Press, p.181-194.
- HAMILTON, R.D. y Carlucci. 1966. Use of ultraviolet-irradiated sea water in the preparation of culture media. Nature, 211:483-484.
- HEMERICK, G. 1973. Mass culture. Handbook of phycological methods. London: Cambridge U. Press, p.255-266.
- HERBERT, D., R. Elsworth y R.G. Telling. 1956. The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. J. Gen. Microbiol., 14:601-622.
- HERBERT, D. 1964. Multi-stage continuous culture. Continuous cultivation of microorganisms. Prague: Czechoslovak Academy of Sciences, p.23-44.

- ↓
 HOLM-HANSEN, O. 1973. Preservation by freezing and freezi-drying. Handbook of phycological methods. London: Cambridge U. Press, 448p.
- JONES, D.A., J.G. Munford y P.A. Gabbott. 1974. Microcapsules as artificial food particules for aquatic filter feeders. Nature, 247:233-235.
- KUBITSCHKEK, H.E. 1970. Introduction to research with continuous culture. New Jersey: Prentice-Hall, 103p.
- MADDUX, W.S. y R.F. Jones. 1964. Some interactions of temperature light intensity and nutrient concentration during the continuous culture of Nitzschia closterium and Tetraselmis sp. Limnol. Oceanogr., 9:79-86.
- MALEK, I. 1958. The physiological state of microorganisms in continuous culture. Continuous cultivation of microorganisms. Prague: Czechoslovak Academy of Sciences, 234p.
- MEYERS, S.P., D.P. Butler y G.F. Sirine. 1971. Encapsulation: a new approach to larval feeding. The American Fish Farmer, 6:15-20.
- MONOD, J. 1950. La technique de culture continue: théorie et applications. Annels Inst. Pasteur. Paris, 79:390-410.
- MONOD, J. 1942. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Paris: Hermann et Cie., 210p.
- MYERS, J. y L.B. Clark. 1944. Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. II. An apparatus for the continuous culture of Chlorella. J. Gen. Physiol., 28:03-112.
- NORTHROP, J.H. 1960. Apparatus for the maintenance of bacterial cultures in the steady state. II. Improved turbidity control & culture cell. J. Gen. Physiol., 43:551-554.
- PAASCHE, E. 1973. Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. I. Thalassiosira pseudonana (Cyclotella nana) growth in a chemostat with silicate as limiting nutrients. Mar. Biol., 19:117-126.
- PERSOONE, G. y P. Sorgeloos. 1975. Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. I. Devices and methods. Aquaculture, 6:275-289.
- PHILLIPS, J.N. y J. Myers. 1954. Measurement of algal growth under controlled steady-state conditions. Plant Physiol., 29: 148-152.

- PIPES, W.O. y P.K. Sotiris. 1961 Light limited growth of Chlorella in continuous culture. Appl. Microbiol., 10:1-5.
- PIPES, W.O. 1962. Carbon dioxide-limited growth of Chlorella, in continuous culture. Appl. Microbiol., 10:281-288.
- PROVASOLI, L. J.J.A. y M.R. Droop. 1957. The development of artificial media for marine algae. Arch. Mikrobiol., 25:392-428.
- RETOVSKY, R. 1966. Continuous cultivation of algae. Theoretical & methodological basis of continuous cultures of microorganisms. London: Academic Press, p.443-455.
- ROTHBARD, S. 1975. Control of Euplotes sp by formalin in growth tanks of Chlorella sp. used as growth medium for the rotifer Brachionus plicatilis which serves as feed for halchling. Bamidgeh, 27(4):101-109.
- SORGELOOS, P. 1974. The influence of algal food preparation on its nutritional efficiency for Artemia salina L. larvae. Thalassia Jugoslavica, 10(1/2):313-320.
- SORGELOOS, P., E. Van Outryve, G. Persoone. 1976. New type of turbidostat with intermittent determination of cell density outside the culture vessel. Appl. & Env. Microbiol., 31(3):327-331.
- TAUB, F.B. y A. M. Dollar. 1968. Improvement of a continuous culture apparatus for long term use. Appl. Microbiol., 16:232-235.
- TAUB, F.B. 1974. A continuous algal culture system for feeding shellfish. Proc. Nat. Shellfish Ass., 64:15.
- UKELES, R. 1965. A simple method for the mass culture of marine algae. Limnol. Oceanogr., 10:492-495.
- UKELES, R. 1973. Continuous culture: a method for the production of unicellular algal foods. Handbook of phycological methods. London: Cambridge U. Press, p.233-254.
- UKELES, R. 1976. Cultivation of plants: unicellular plants. Marine Ecology, Vol.III, Part 1. London: Wiley, p.367-466.

APENDICE I

Para encontrar la dilución D tal que DX , sea máximo, se deriva la ecuación 12 con respecto a D y tenemos:

$$f'(D) = Y \left[Sr - Ks \left(\frac{2D\mu_m - 2D^2 + D^3}{(\mu_m - D)^2} \right) \right]$$

$$= Y \left[Sr - Ks \left(\frac{2D\mu_m - D^2}{(\mu_m - D)^2} \right) \right]$$

de ésta ecuación valores críticos (las D 's tales que $f'(D) = 0$)

son:

$$f'(D) = 0 \Leftrightarrow Sr(\mu_m - D)^2 - 2KsD\mu_m + KsD^2 = 0$$

$$Sr\mu_m^2 - 2Sr\mu_m D + SrD^2 - 2KsD\mu_m + KsD^2 = 0$$

$$(Sr + Ks)D^2 - (Sr + Ks)2\mu_m D + Sr\mu_m^2 = 0$$

$$D = \frac{2\mu_m \pm \sqrt{4\mu_m^2 - \frac{4Sr\mu_m^2}{(Sr + Ks)}}}{2}$$

$$= \mu_m \pm \mu_m \sqrt{1 - \frac{Sr}{(Sr + Ks)}}$$

$$D_1 = \mu_m \left(1 + \sqrt{\frac{Ks}{Sr + Ks}} \right)$$

$$D_2 = \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{Ks}{Sr + Ks}} \right)$$

Si la función $f_1(D)$ alcanza su máximo en cualquiera de éstos valores críticos, entonces debe suceder que la segunda derivada de f_1 evaluada en aquel valor crítico que hace que f_1 sea máxima, sea negativo, obteniendo antes la segunda derivada:

$$f_1'(D) = Y \left[S_r - K_s \left(\frac{2D\mu_m - D^2}{(\mu_m - D)^2} \right) \right]$$

$$f_1''(D) = -K_s Y \left[\frac{(\mu_m - D)^2(2\mu_m - 2D) - (2\mu_m D - D^2) 2(\mu_m - D)(-1)}{(\mu_m - D)^4} \right]$$

$$= -K_s Y \left[\frac{2}{(\mu_m - D)} + \frac{4\mu_m D - 2D^2}{(\mu_m - D)^3} \right]$$

$$= -K_s Y \left[\frac{2\mu_m^2}{(\mu_m - D)^3} \right]$$

Como K_s , Y y μ_m son positivos, entonces $-K_s Y 2\mu_m^2$ es negativo, es decir, para determinar el signo de la segunda derivada de f_1 en cada uno de valores críticos el término importante es:

$$\left[\frac{1}{(\mu_m - D)^3} \right]$$

Evaluando f_1'' en los valores críticos.

$$f_1''(D_1) = -2 K_s Y \mu_m^2 \left[\frac{1}{\left(\mu_m - \mu_m - \mu_m \sqrt{\frac{K_s}{S_r + K_s}} \right)^3} \right]$$

$$= -2 K_s Y \mu_m^2 \left[\frac{1}{\left(-\mu_m \sqrt{\frac{K_s}{S_r + K_s}} \right)^3} \right]$$

como puede verse $f_1''(D_1) > 0$ y por tanto en D_1 , f_1 no alcanza su máximo.

$$f_1''(D_2) = -2 K_s Y \mu_m^2 \left[\frac{1}{\left(\mu_m - \mu_m + \mu_m \sqrt{\frac{K_s}{S_r + K_s}} \right)^3} \right]$$

$$f_1''(D_2) = -2 K_s Y \mu_m^2 \left[\frac{1}{\left(\mu_m \sqrt{\frac{K_s}{S_r + K_s}} \right)^3} \right]$$

como $f_1''(D_2) < 0$, en D_2 , f_1 alcanza su máximo, cuyo valor es

$$f_1(D_2) = Y \left[S_r \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{S_r + K_s}} \right) - K_s \left(\frac{\mu_m^2 - 2 \mu_m^2 \sqrt{\frac{K_s}{S_r + K_s}} + \mu_m^2 \left(\frac{K_s}{S_r + K_s} \right)}{\mu_m \sqrt{\frac{K_s}{S_r + K_s}}} \right) \right]$$

Por esto, la solución anterior se usa para la ecuación 13.

APENDICE II

A continuación se muestra una relación general de los materiales usados para la construcción y control del aparato de cultivo y los lugares donde pueden obtenerse en el país:

Material que se encuentra en cualquier ferretería :

1. - Tubería de PVC de diferentes diámetros.
2. - Abrazaderas de metal de 20 cm. de diámetro.
3. - Manguera de plástico transparente .
4. - Lámparas para tubos de luz fría.
5. - Resistencia eléctrica de 7.5 v.
6. - Transformador de corriente eléctrica de 110 a 7.5 v.
7. - Hipoclorito de sodio (blanqueador).

Material que puede encontrarse en cualquier tienda de acuariofília:

1. - Bomba de aire.
2. - Mangueras de plástico transparente de diámetros pequeños.
3. - Difusores de aire.
4. - Fibra de plástico para los filtros mecánicos.

5. - Carbón activado.
6. - Puede encontrarse la lámpara germicida.

Material que puede adquirirse en cualquier casa distribuidora de equipo para laboratorio:

1. - Microscopio.
2. - Hematocitómetro.
3. - Vidrieria pyrex.
4. - Reactivos.
5. - Tapones de goma.

Equipo que solo se puede adquirir en casas especializadas:

1. - Bolsas de plástico. Puede encontrarse con los fabricantes de éstas.
2. - Lámpara germicida (UV). En las casas fabricantes de lámparas.
3. - Acrilico. Este puede sustituirse por plástico o madera.

Eta lista no incluye los precios por las diferencias que existen en las zonas económicas del país.