

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS

CULTIVO SEMICONTINUO DE LAS MICROALGAS
Isochrysis galbana Y Tetraselmis suecica
PARA SU USO COMO ALIMENTO DE LARVAS Y
ADULTOS DE Mytilus californianus.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

O C E A N O L O G O

PRESENTAN:

GRISELDA PARES SIERRA

Y

GUSTAVO ALONSO LEYVA

ENSENADA B. CFA.

MARZO 1982.

A G R A D E C I M I E N T O S

Queremos agradecer al Instituto de Investigaciones Oceanológicas el habernos permitido realizar este trabajo dentro del Proyecto-Bivalvos de Baja California (Sección Mejillón).

Agradecemos también al personal de la sección su ayuda en la elaboración de esta tesis, muy especialmente al Oc. Carlos Cáceres Martinez por su dirección y orientación en el trabajo sin lo cual no hubiera sido posible su realización; al compañero Luis Mc. Anally por su participación y ayuda. Así mismo queremos agradecer a los compañeros de la Escuela Superior de Ciencias Marinas que de una u otra forma intervinieron en la realización de este trabajo.

A los sinodales del Comité de tesis que revisaron el escrito y dirigieron el exámen profesional agradecemos sus valiosas criticas y sugerencias.

Finalmente queremos agradecer al M.C. Roberto Millán N. por su ayuda y apoyo en la dirección de esta tesis.

I N D I C E

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	5
III. OBJETIVOS	7
IV. MATERIALES Y METODOS	8
1.- Laboratorio de cultivo	8
2.- Bolsas de cultivo	14
3.- Experimento para la obtención de las diluciones óptimas	19
4.- Método para la obtención de la velocidad de crecimiento y la dilución óptima	21
5.- Método para la obtención del tiempo de genera-- ción	24
6.- Método para la obtención de las oscilaciones - del sistema	24
7.- Método para la obtención de la velocidad de - crecimiento teórica para los cultivos semiconti <u>n</u> nuos	25
V. RESULTADOS	
1.- Laboratorio de cultivo	27
2.- Diluciones óptimas	28

	<u>Página</u>
3.- Producción del sistema	36
4.- Oscilaciones del sistema	39
5.- Comparación de los resultados obtenidos con los modelos teóricos para los cultivos con- tinuos y semicontinuos	39
VI. DISCUSION	44
VII. CONCLUSIONES	51
VIII. RECOMENDACIONES	52
IX. BIBLIOGRAFIA	53

LISTA DE FIGURAS

<u>Figuras</u>		<u>Páginas</u>
1	Vista de planta del laboratorio para el cultivo de microalgas.	9
2	Vista de frente de la pared (A) del laboratorio de cultivo donde se muestran sus componentes principales.	10
3	Vista de frente de la pared (C) del laboratorio de cultivo de microalgas.	11
4	Vista de frente de la pared (D) del laboratorio de cultivo de microalgas.	12
5	Vista de frente de la pared (B) del laboratorio de cultivo de microalgas.	13
6	Esquema que muestra la unidad de filtración y esterilización.	15
7	Bolsas de cultivo semicontinuo.	16
8	Bolsas de cultivo semicontinuo con la modificación en el sistema de sellado descrito por Trotta (1981).	17
9	Valores de densidad (cel/ml) de la microalga <u>Isochrysis galbana</u> correspondientes a cada dilución.	30
10	Valores de densidad (cel/ml) de la microalga <u>Isochrysis galbana</u> correspondiente a cada dilución.	31
11	Valores de densidad (cel/ml) de la microalga <u>Tetraselmis suecica</u> correspondientes a cada dilución.	32
12	Relación entre la densidad y la dilución para un cultivo semicontinuo de <u>Isochrysis galbana</u> .	34
13	Relación entre la densidad y la dilución para un cultivo semicontinuo de <u>Tetraselmis suecica</u> .	35

Figuras		Páginas
14	Relación entre la producción y la dilución en el cultivo semicontinuo de <u>Isochrysis galbana</u> .	37
15	Relación entre la producción y la dilución en el cultivo semicontinuo de <u>Tetraselmis suecica</u> .	38
16	Comparación de la velocidad de crecimiento entre los valores experimentales y los valores teóricos en los cultivos continuos y semicontinuos. <u>Isochrysis galbana</u> .	42
17	Comparación de la velocidad de crecimiento entre los valores experimentales y los valores teóricos en los cultivos continuos y semicontinuos. <u>Tetraselmis suecica</u> .	43

LISTA DE TABLAS

<u>Tablas</u>		<u>Páginas</u>
1	Diluciones experimentales para las dos especies cultivadas.	20
2	Velocidad máxima promedio para <u>Isochrysis galbana</u> y <u>Tetraselmis suecica</u> .	29
3	Tiempo de generación del cultivo (g en días); coeficiente de variación secuencial ($\delta X/\bar{X}$) y estimación del azar de las variaciones (ΔX) para las densidades promedio (x - cel/ml) correspondiente a cada dilución (D) para las dos especies.	33
4	Valor de dilución (D); número de datos (n), velocidad de crecimiento promedio para los cultivos semi continuos correspondientes a cada D (μ_t), velocidad de crecimiento promedio experimental para cada D ($\bar{\mu}$), desviación estándar ($S\mu$), prueba T de Student para el valor de la (D) contra la ($\bar{\mu}$) ($t_s D$).	40

I. INTRODUCCION

Una de las principales aplicaciones del cultivo de microalgas es servir como alimento a formas larvarias filtroalimentadoras de peces marinos o a invertebrados marinos en estado larval o adulto (Droop, 1969; Trotta, 1981; Laing y Helm, 1981).

Una producción en forma continua de microalgas es esencial para el éxito del cultivo de muchos invertebrados marinos (Ukeles, 1973; Canzonier y Brunnetti, 1975; Laing y Helm, 1981).

El gran interés comercial que existe por la propagación de moluscos y crustáceos ha hecho urgente el desarrollo de métodos para proveer de alimento a estos invertebrados (Palmer et al. 1975). Por esta necesidad de producción masiva se han desarrollado sistemas de cultivo discontinuos y continuos (Trotta, 1981).

Los sistemas de cultivo discontinuo o estáticos son usados en muchos laboratorios de producción de microalgas y parten de inocular las células en un recipiente con agua de mar enriquecida (medio de cultivo) y únicamente permiten su crecimiento (Kubitschek, 1970). En este tipo de sistema la razón de crecimiento y productividad son dependientes de la edad del cultivo y mientras el cultivo se hace viejo puede ser más riesgosa su utilización como alimento debido a la acumulación de metabolitos de las algas o de bacterias (Palmer et al., 1975; Wilson, 1979).

Para reducir o evitar los cambios incontrolables en la población de microalgas y asegurar una producción constante, varios investigadores han optado el automatizar el sistema y trabajar con sistemas de cultivo continuo (Droop, 1975; Ukeles, 1976).

Un cultivo continuo es un sistema en el cual la población de microalgas se encuentra en un volumen constante cerca o en el estado de equilibrio establecido por la continua adición de medio de cultivo y su recuperación proporcional al cosecharse (Fencel, 1966; Hemerick, 1973).

Un sistema de cultivo semicontinuo se caracteriza por la remoción regular de un volumen estandar de medio de cultivo a ciertos intervalos de tiempo y el reemplazo de éste con medio nuevo para obtener el volumen original, lo que se conoce como razón de dilución. (Fencel, 1966; Ukeles, 1973).

Estos dos tipos de cultivo se basan en alcanzar un estado de equilibrio en la división de las microalgas, establecido por la razón de dilución (Kubitschek, 1970; Droop, 1975). En la práctica no es posible obtener un estado de equilibrio completamente; primero, por que todas las células necesitan estar expuestas al mismo ambiente y esta condición no se alcanza por que la adición continua de nutrientes produce un gradiente químico que desaparece hasta que se mezclan bien y, segundo, por que siempre en cualquier cultivo está ocurriendo selección y mutaciones. (Kubitschek, 1970).

Sin embargo el desarrollo de los cultivos está bien descrito por los trabajos matemáticos de los cultivos continuos (Kubitschek, 1970).

[Los cultivos estáticos tienen un tiempo de vida limitado pasando a través de una sucesión de fases que va, desde el tiempo del inóculo, hasta la muerte del cultivo (Droop, 1969; Kubitschek, 1970)]. Sin embargo en cultivos continuos pueden mantenerse las condiciones de crecimiento indefinidamente; o sea un estado de equilibrio establecido por la razón de dilución.

Otras ventajas de los sistemas de cultivo continuo sobre los estáticos de acuerdo con Kubitschek, (1970); Palmer et al., (1975), Droop, (1975) son:

- Las tasas de crecimiento y división de las células son más -

fácilmente controladas y mantenidas por periodos largos.

- La concentración de la población puede mantenerse independiente de la velocidad de crecimiento.

- Las células pueden mantenerse por periodos largos en ambientes químicos constantes.

- El tamaño y composición bioquímica de las microalgas en estos sistemas se mantienen constante .

Los sistemas de cultivo continuo pueden operar en principio - como un quemostato o turbidostato.

Un quemostato es el sistema que envuelve una dilución continua con medio fresco en un volumen fijo en el cual uno de los nutrientes actúa como factor limitante (Caperon, 1968; Eppley y Strickland, 1968; - Kubitschek, 1970).

El turbidostato es el sistema en el cual la población es sostenida a un nivel de turbidez constante lograda por la adición automática de medio fresco (dilución) cuando la concentración de células excede a un valor predeterminado (Kubitschek, 1970).

Para poder cultivar y establecer altas densidades de microalgas en cualquier sistema de cultivo es necesario proveerles los factores físicos esenciales en sus niveles óptimos. Estos factores incluyen iluminación, control de temperatura, de aire (para el control de PH y - provisión de CO₂) y las características del recipiente de cultivo (Guillard, 1973; Ukeles, 1976; Trotta, 1981).

Los recipientes de cultivo más frecuentemente usados son de vidrio ya sea esféricos o cilíndricos con fondo plano y últimamente tubos de polietileno delgados con fondo cónico. Estos últimos recipientes presentan grandes ventajas, donde una de las más importantes es que debido a su base de área pequeña las microalgas son fácilmente puestas en

suspensión por el aire, evitando la sedimentación y el subsecuente desarrollo bacterial (Persoone y Sorgeloos, 1975).

Esta investigación se llevó a cabo en el área de Acuacultura dentro del proyecto Bivalvos de Baja California (Sección Mejillón) del Instituto de Investigaciones Oceanológicas dependiente de la Universidad Autónoma de Baja California. Dada las necesidades de producción de fitoplancton, se intentó resolver el problema con una técnica sencilla y fácil de reproducir que provea de alimento a larvas y adultos del mejillón Mytilus californianus cultivado en el laboratorio.

II. ANTECEDENTES

El crecimiento y desarrollo de las microalgas fue estudiado primeramente en cultivos estáticos. El tamaño, composición y características funcionales de los organismos durante el cultivo varían considerablemente haciendo difícil la interpretación de los datos (Kubitschek, 1970). Chlorella (Chlorophyceae) fue la primera especie fotosintética utilizada para ser cultivada en forma continua (Myer y Clark, 1944). Sin embargo es hasta 1950 cuando Monod desarrolla la teoría básica de los cultivos continuos con bacterias. Fencel (1966) provee una revisión intensiva sobre la teoría de los cultivos continuos y demuestra matemáticamente que los procesos de cultivo continuo y semicontinuo son únicamente diferentes métodos de cultivo continuo, hacer una diferenciación entre ellos es incorrecta.

Ahora se llevan a cabo numerosos trabajos con microalgas bajo el tipo de sistemas de cultivo continuo; ya sea para explorar los mecanismos de limitación de nutrientes (Droop, 1966, 1968 y 1969; Caperon, 1968; Carpenter, 1968; Taub y Dollar, 1968; Goldman, 1978; Brown y Harris, 1978) o bien para alcanzar la mayor producción posible (Droop, 1975; Ukeles, 1973; Palmer et al., 1975; Canzonier y Brunetti, 1975).

Con el desarrollo de todos estos trabajos se fueron implementando también diferentes aparatos de cultivo de microalgas, algunos muy complejos usados para estudiar la fisiología y bioquímica de las algas en condiciones libres de bacterias (condiciones axénicas) (Droop, 1966; Caperon, 1968; Taub y Dollar, 1968), otros mucho menos sofisticados para cultivar las microalgas y así utilizarlas como alimento de invertebrados

marinos (Loosanoff y Davis, 1963; Ukeles, 1973; Taub, 1974; Canzonier y Brunetti, 1975; Palmer et al., 1975; Ukéles, 1976; Laing y Helm, 1981; Helm et al., 1979; Trotta, 1981).

Las algas comunmente utilizadas como alimento de invertebrados marinos se desarrollan bien en un rango de temperatura de 16 - 24°C (Guillard, 1972).

Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica son dos especies que se han utilizado ampliamente para alimentar larvas y adultos de moluscos (Loosanoff y Davis, 1963; Walne, 1966; 1974; Droop, 1975).

I. galbana es una especie que presenta ventajas para cultivarse, debido a la abundante información publicada sobre sus requerimientos nutricionales y su crecimiento en respuesta a cambios en temperatura e iluminación (Caperon, 1968).

T. suecica puede cultivarse con un mínimo de mantenimiento y se considera como una especie de alto valor alimenticio para larvas, semillas y adultos de bivalvos (Walne, 1974; Helm et al., 1979; Helm, 1977 y Laing y Helm, 1981).

III. OBJETIVOS

Debido a la necesidad de un lugar para cultivar microalgas, el primer objetivo de este trabajo es la habilitación de un laboratorio. - En este laboratorio se obtendrá la dilución óptima para la máxima producción de las especies Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica en un sistema de cultivo semicontinuo, siendo éste nuestro segundo y más importante objetivo.

El tercer objetivo es programar la producción de fitoplancton a partir de las diluciones obtenidas y así alimentar larvas y adultos de Mytilus californianus.

IV. MATERIALES Y METODOS

1.- Laboratorio de cultivo

El laboratorio de cultivo de microalgas tiene un área de 8.74 metros² (figura 1), está totalmente pintado de blanco para un mejor aprovechamiento de la luz. Dentro del laboratorio se encuentran dispuestas unas series de barras que sirven de soportes a los recipientes de cultivo (figuras 2, 3, y 4), estos soportes están únicamente colocados sobre escuadras de acero que permiten desmontarlos fácilmente (figura 2).

El piso tiene una pendiente apropiada que hace posible el desagüe rápido y fácil.

El laboratorio cuenta con 21 lámparas o tubos fluorescentes - (Sylvania, "Cool White" 75W) como fuente de luz que están distribuidas en forma vertical sobre las paredes, como lo muestran las figuras 2, 3, y 4 y se mantienen encendidas todo el tiempo. El sistema eléctrico está protegido por un dispositivo de seguridad en caso de sobrecarga; dentro del laboratorio se cuenta con dos tomacorrientes de 110 W con tierra, a una altura de 1.8 m del piso a fin de evitar corto circuito por el agua. Se cuenta con un aparato de aire acondicionado (AMANA, 3790--3730 Wats) que mantiene el laboratorio a una temperatura de 20 ± 3 C, - la cual se registra en un termómetro de máximos y mínimos (Figura 5). - El aire usado para la homogenización de los cultivos proviene de un compresor (DAYTON, Speedaire 2Z870) que está colocado fuera del laboratorio. El aire pasa a través de un filtro del tipo Elsworth (Elsworth, - 1969) y se mantiene seco por una resistencia, llega al laboratorio por una

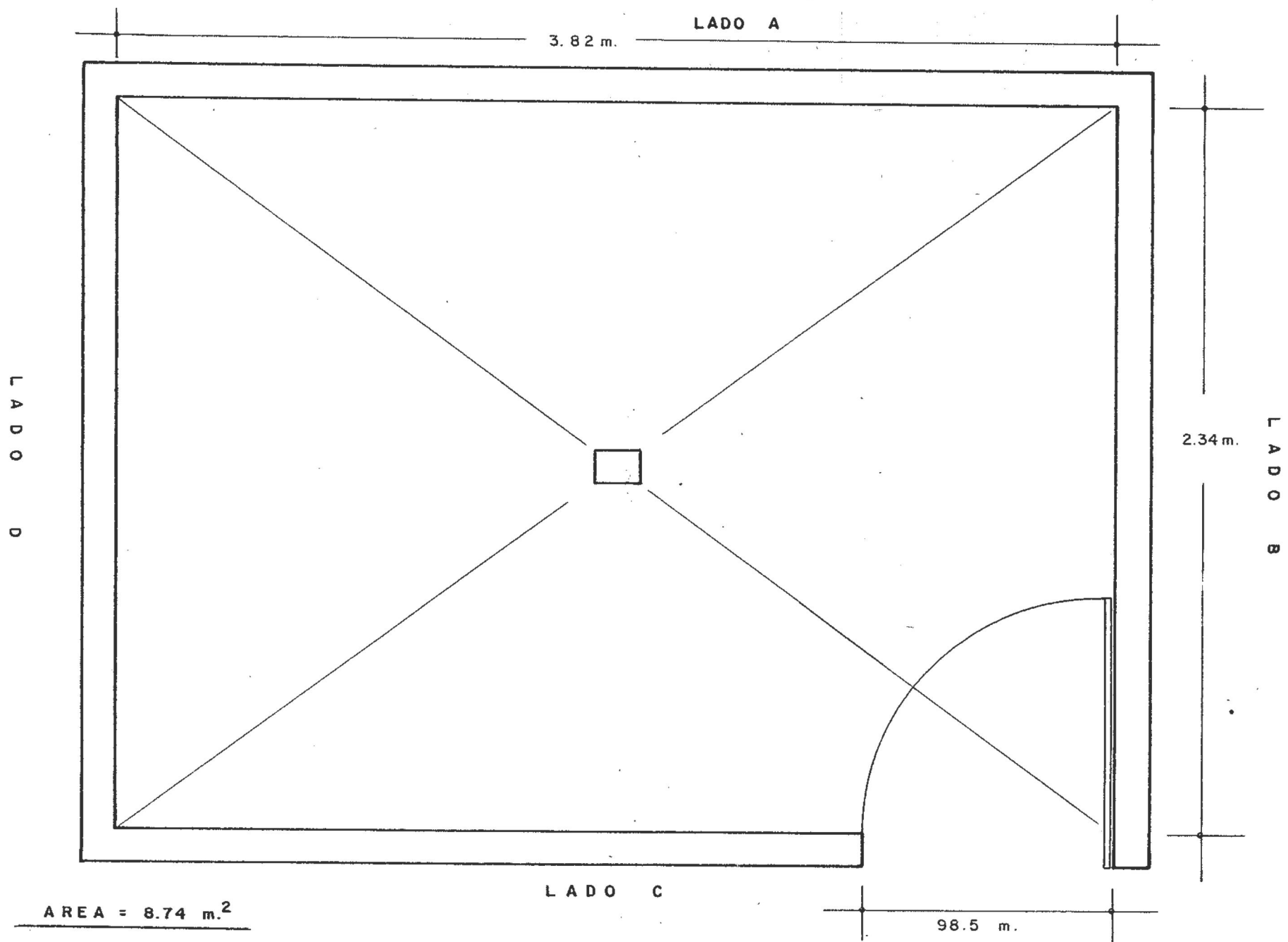
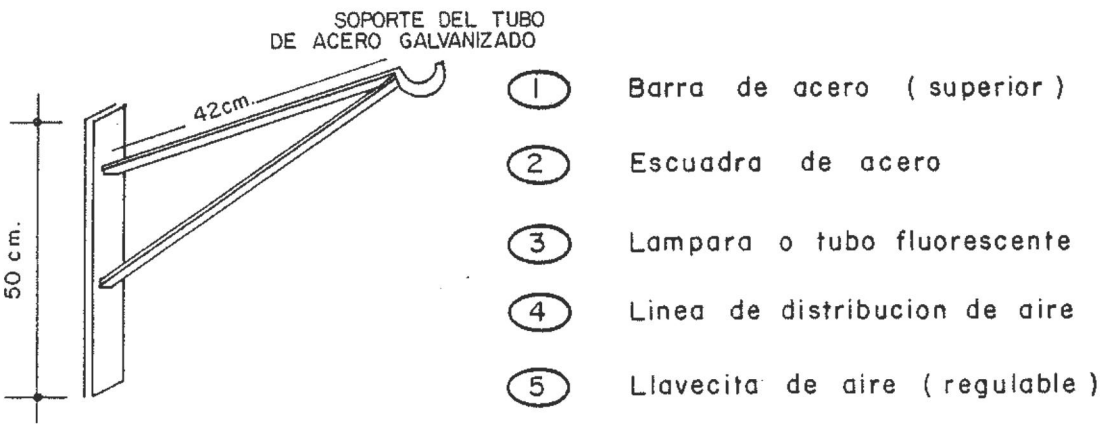
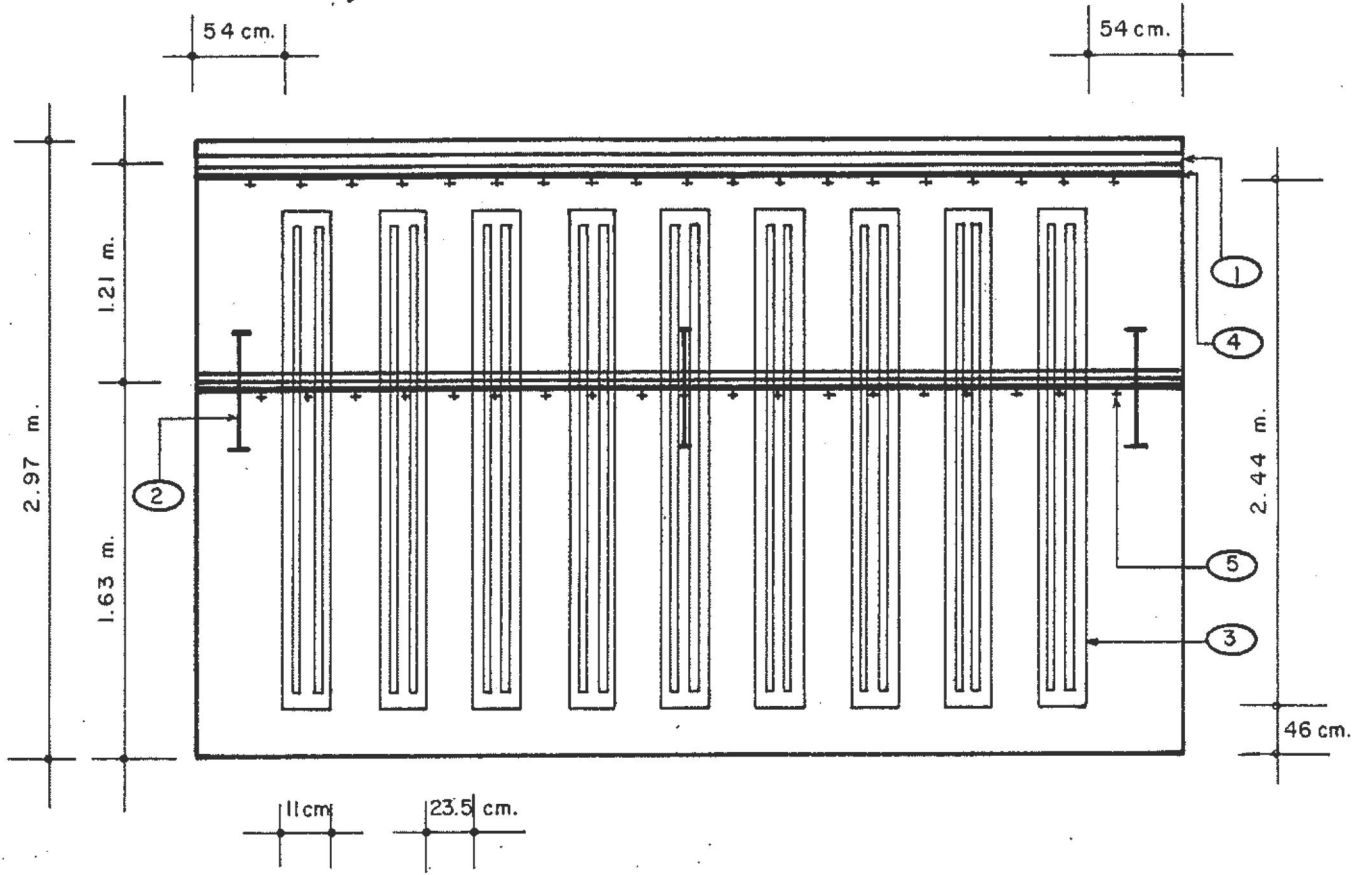
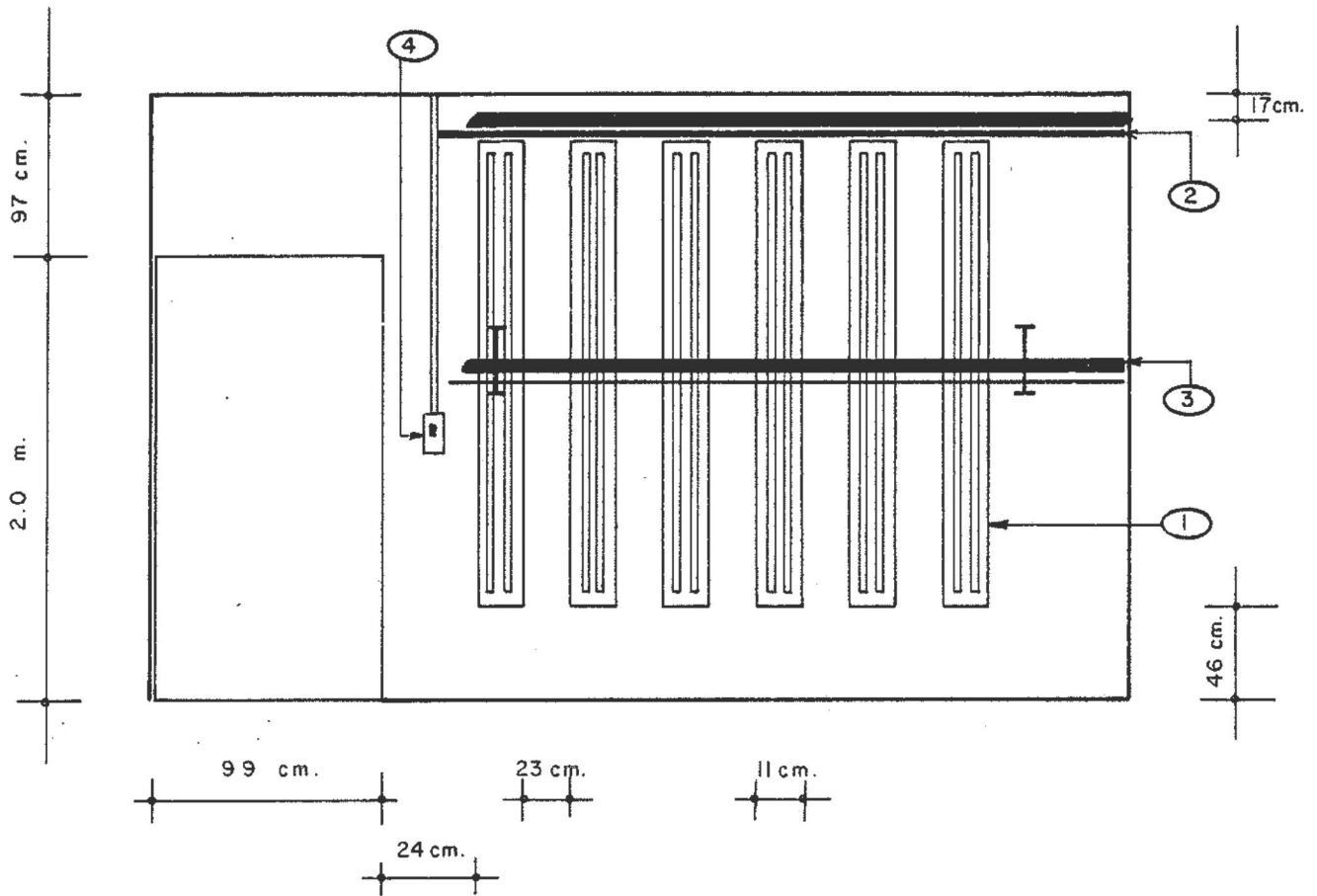


Fig. 1: VISTA DE PLANTA DEL LABORATORIO PARA EL CULTIVO DE MICRO ALGAS



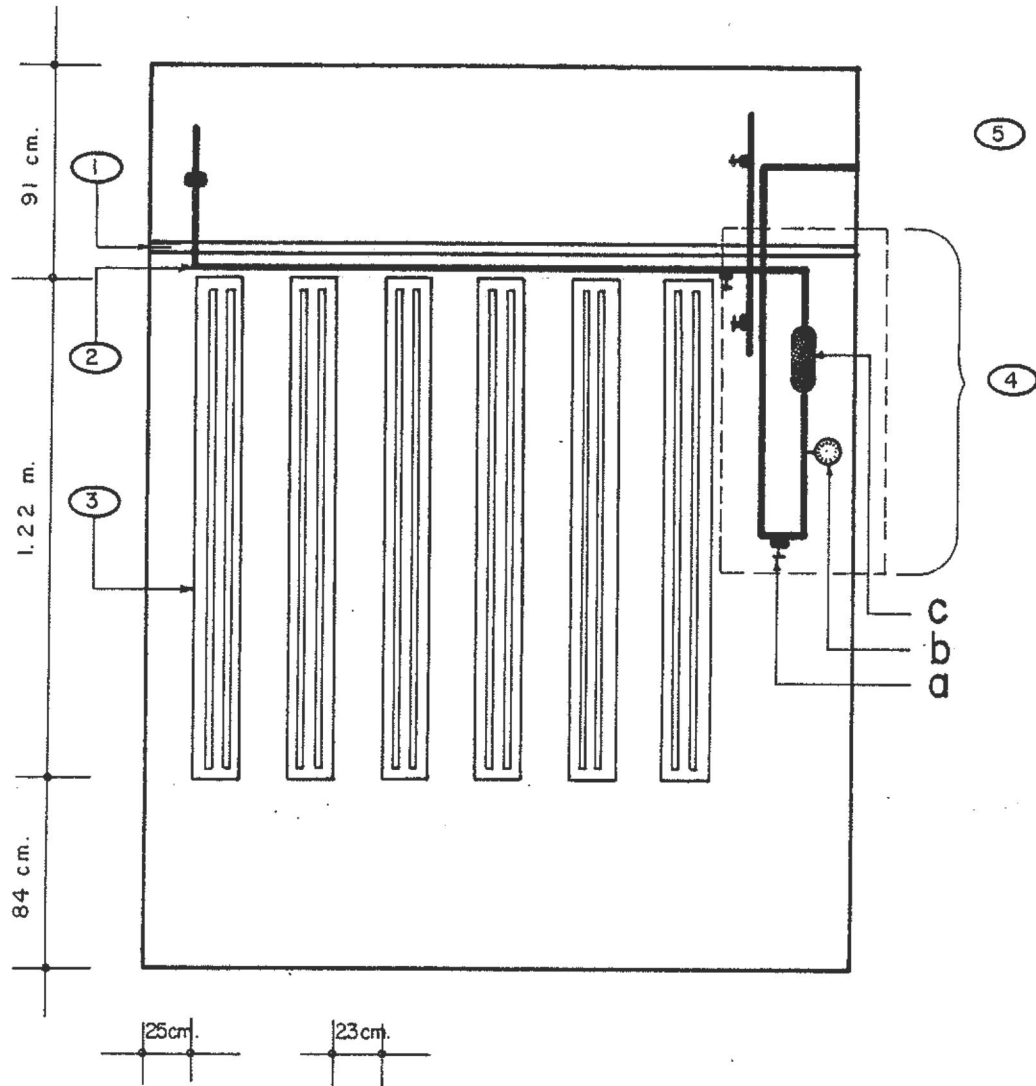
VISTA LATERAL DE ②

Fig. 2 - VISTA DE FRENTE DE LA PARED A DEL LABORATORIO DE CULTIVO, DONDE SE MUESTRAN SUS COMPONENTES PRINCIPALES.



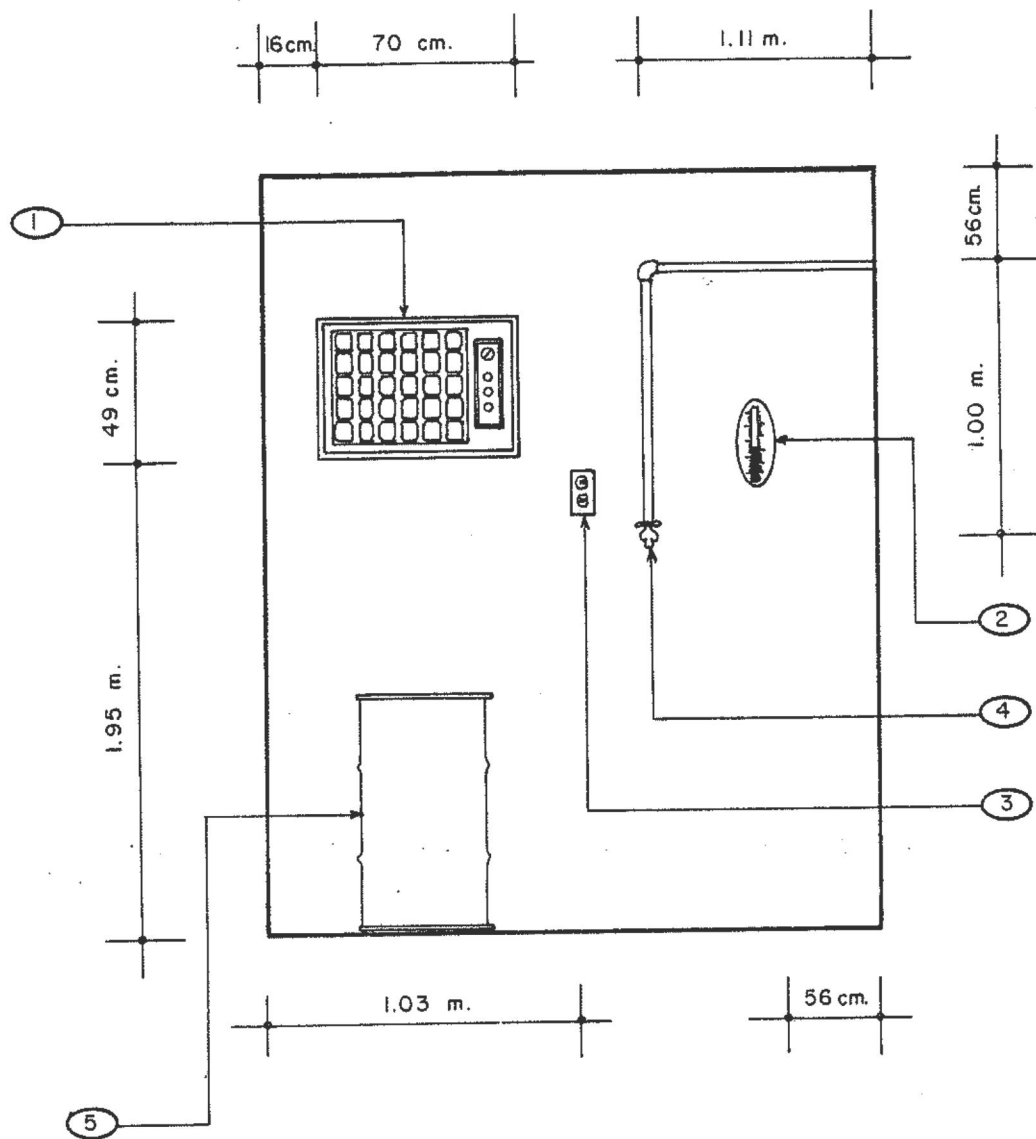
- (1) Lámpara o tubo fluorescente (3) Barra de acero (inferior)
 (2) Línea de distribución de aire (4) Apagador

Fig. 3 - VISTA DE FRENTE DE LA PARED C DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE MICRO ALGAS .



- | | | | |
|---|--|----|------------------------------|
| ① | BARRA DE ACERO | ④ | SISTEMA ADICIONAL DE DRENADO |
| ② | LÍNEA DE DISTRIBUCIÓN DE AIRE | a) | Llave de drenado |
| ③ | LAMPARA O TUBO FLUORESCENTE | b) | Manómetro |
| | | c) | Filtro Millipore. 45 μ |
| ⑤ | LLAVES DE PASO DE AIRE A TODOS NIVELES | | |

Fig. 4 : VISTA DE FRENTE DE LA PARED D DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE MICRO ALGAS .



- | | | | |
|---|---------------------------------|---|----------------------------------|
| ① | Aparato de aire acondicionado | ④ | Llave de agua de mar |
| ② | Termómetro de máximos y mínimos | ⑤ | Tanque de almacenaje de 250 lts. |
| ③ | Tomacorriente | | |

Fig. 5 - VISTA DE FRENTE DE LA PARED B DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE MICRO ALGAS.

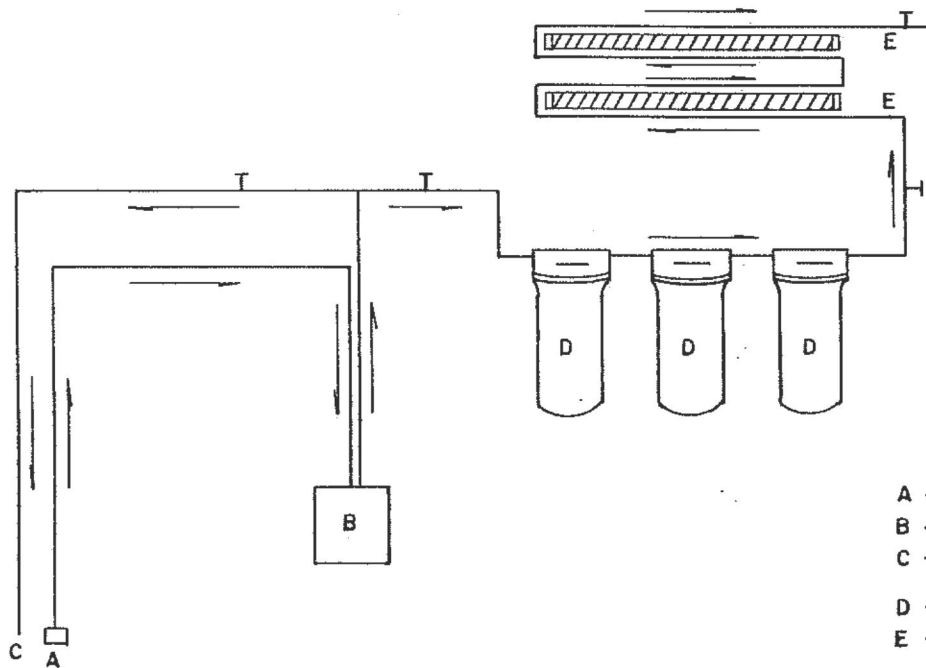
tubería de PVC de $3/4$ '. Antes de ser distribuido a cada una de las -
bolsas de cultivo pasa por un sistema adicional de drenado para eli-
minar el vapor de agua que se condensa y posteriormente pasa por otro
filtro de membrana Millipore (ULTIPO-DFA) de 0.2 de porosidad (figura
4). El aire sigue una línea de distribución compuesta por una tubería-
de PVC de $1/2$ ' con llaves de paso en los niveles correspondientes -
(figuras 2, 3 y 4). Cada una de las bolsas cuenta con una llave de paso pa-
ra regular la entrada de aire.

El laboratorio recibe agua de mar directamente del depósito
de la Escuela de Ciencias Marinas y es llevada a un tanque de almace-
naje de 250 litros por medio de una red de distribución (figura 5).

El agua de mar que se usa en el laboratorio pasa a través -
de una unidad de filtración y esterilización que está formada por una
válvula de pie, un sistema de filtración tipo Corning (tres filtros -
de 1μ de porosidad) y un sistema de luz UV de 2600 \AA de longitud de
onda con cátodo de tipo caliente y vapor de mercurio (Hamilton, 1973).
Esta unidad de filtración y esterilización se encuentra montada en una
estructura móvil en la que se controla el flujo de agua de mar por me-
dio de una llave de paso (figura 6).

2.- Bolsas de Cultivo

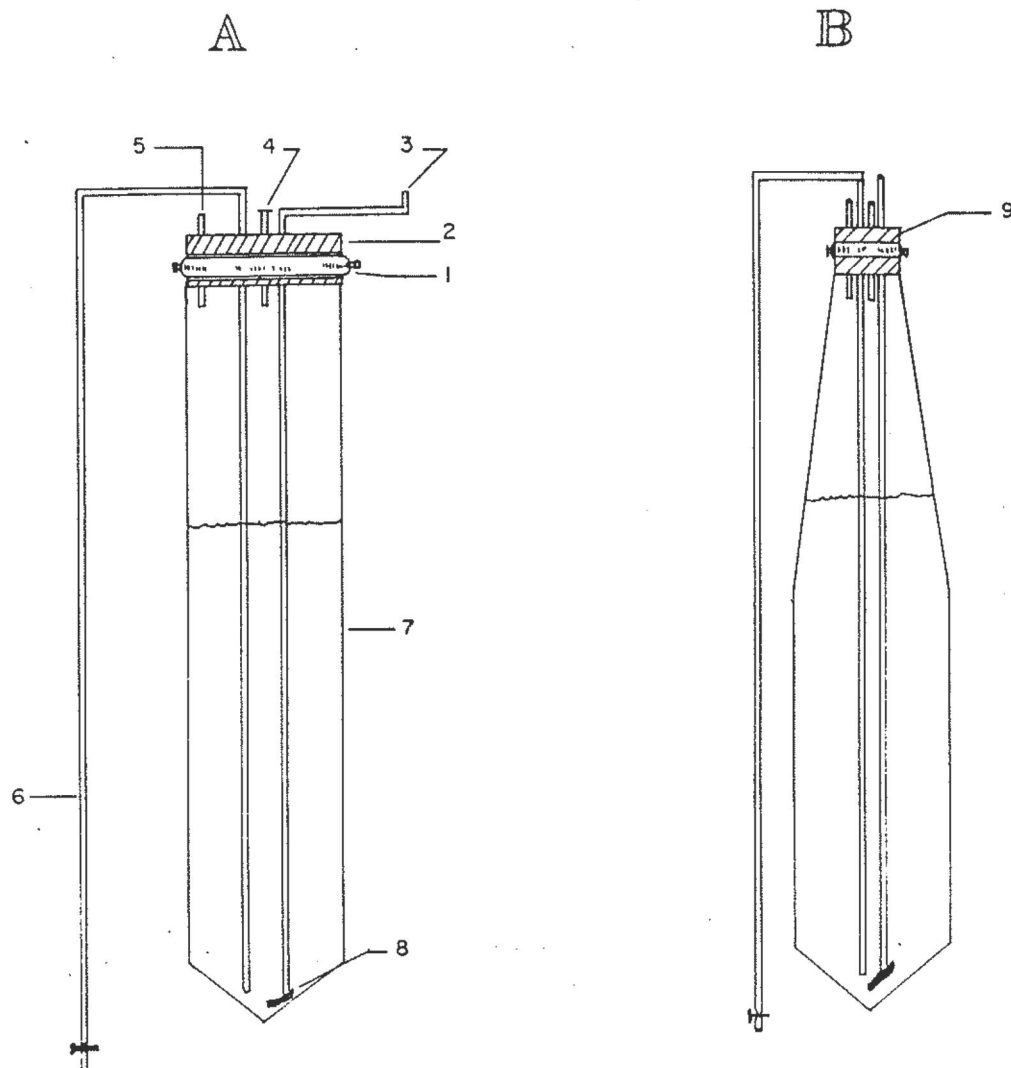
Como recipiente de cultivo se usaron bolsas de polietileno-
transparentes de 0.16 mm de grosor, estos recipientes se encuentran -
sellados en su parte inferior con un sellador para bolsas de plástico
comercial formando un fondo cónico (figura 7) cuando la capacidad exce-
de a 5 litros se usó el sistema de sellado propuesto por Trotta (1981);
que consiste en un tubo de PVC abierto que presiona la bolsa en su -
parte inferior (figura 8). En su extremo superior se cierra con una-



- A - VALVULA DE PIE.
- B - BOMBA CENTRIFUGA DE $\frac{1}{8}$ H.P.
- C - RETORNO DEL AGUA DE MAR PARA REGULAR LA PRESION Y EL FLUJO.
- D - FILTROS DE UNA MICRA DE POROSIDAD.
- E - LAMPARAS DE LUZ ULTRAVIOLETA CON CATHODO CALIENTE.

Fig.- 6

ESQUEMA QUE MUESTRA LA UNIDAD DE FILTRACION Y ESTERILIZACION. LAS FLECHAS INDICAN LA DIRECCION DEL AGUA.



- 1- ABRAZADERA METALICA CON EMPAQUE DE GOMA
- 2- SOPORTE DE PVC DE 16 cm. DE DIAMETRO
- 3- ENTRADA DE AIRE
- 4- ACCESO PARA MEDIO DE CULTIVO Y NUTRIENTES
- 5- ESCAPE DE AIRE
- 6- SIFON DE COSECHA
- 7- BOLSA DE PLASTICO (.16 mm. de grosor)
- 8- DIFUSOR DE AIRE
- 9- SOPORTE DE PVC

Fig.- 7 - BOLSAS DE CULTIVO SEMICONTINUO

- A - Bolsas con base de 16 cm. de diámetro.
- B - Bolsas con base de 6 cm. de diámetro.

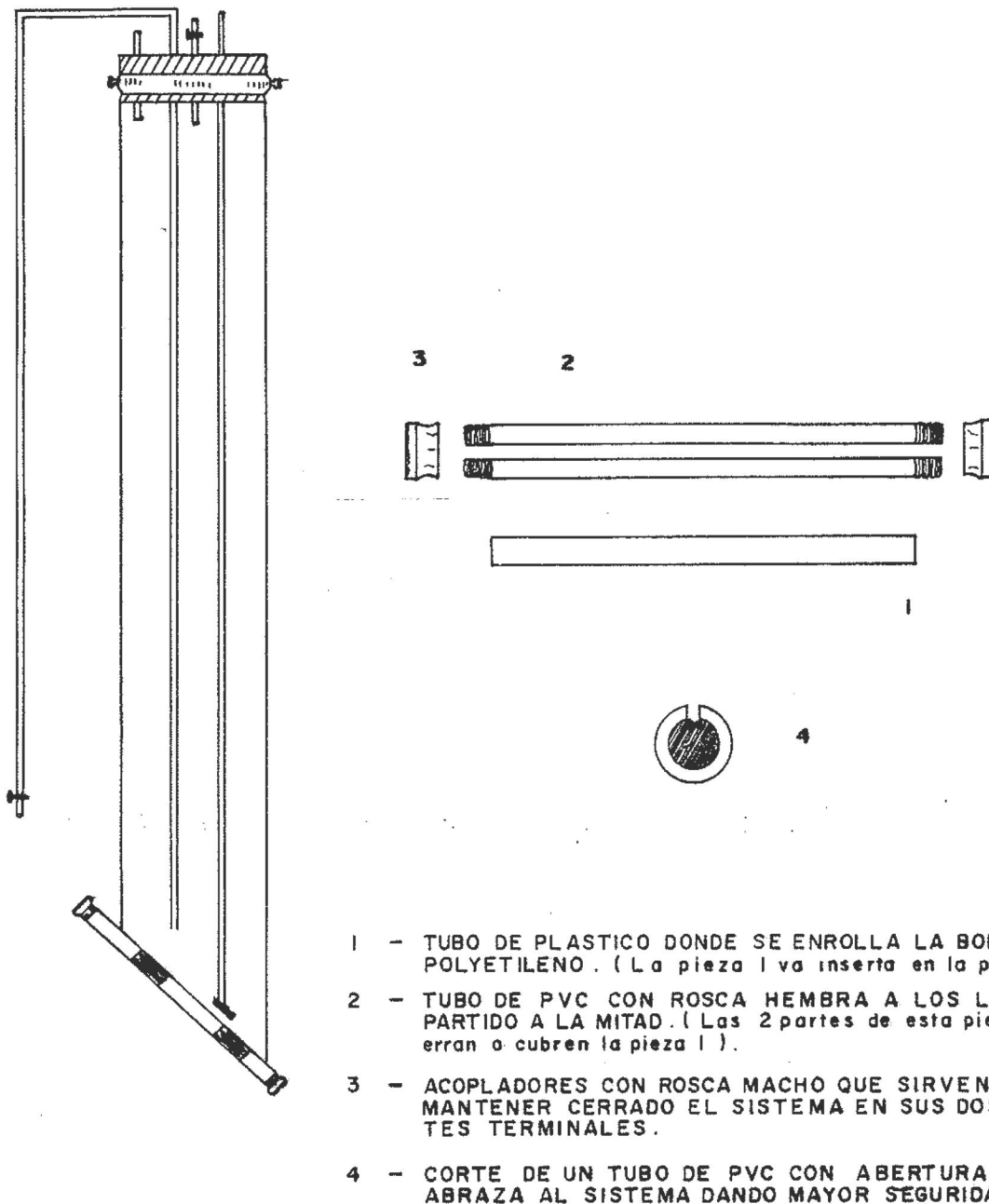


Fig. - 8 BOLSAS DE CULTIVO SEMICONTINUO CON LA MODIFICACION EN EL SISTEMA DE SELLADO - DESCRITO POR Trotta (1981) AMPLIACION DEL SISTEMA DE SELLADO Y SUS COMPONENTES.

base compuesta por un tubo de PVC de 6 cm de diámetro y 5 cm de alto y un tapón de goma o bien una base compuesta por un tubo de PVC de 16 cm de diámetro y 5 cm de alto tapada con una placa de acrílico; las bases están sujetas a las bolsas por una abrazadera metálica; tanto el tapón de goma como la placa de acrílico constan de cuatro perforaciones (a las perforaciones de la placa de acrílico se le adaptan tapones de goma) :

La primera perforación con un tubo de vidrio insertado para la entrada de aire, el tubo se continúa hasta el fondo del recipiente y en su parte terminal se coloca un difusor.

La segunda perforación también cuenta con un tubo de vidrio que va hasta el fondo para formar el sifón de cosecha, al tubo de vidrio en su parte superior se le conecta una manguera de vinilo y se cierra con una pinza metálica.

La tercera únicamente permite introducir un tubo pequeño de vidrio que sirve como escape o salida de aire.

La cuarta y última perforación soporta un tubo de vidrio igual que el anterior pero éste es usado para adiciones de medio de cultivo o nutrientes.

Las cepas de I. galbana y T. suecica se obtuvieron en la NOAA National Marine Fisheries Service de La Jolla, California, (E.U.A.) de la colección del Dr. W. H. Thomas, y fueron mantenidas en matraces Erlenmeyer de 125 ml y colocadas en un área con iluminación y temperatura controlada. La rutina de mantenimiento consiste en transferir cada especie una vez por semana; para casos de emergencias se mantiene un duplicado en la oscuridad que se transfiere cada 15 días. Para con

tinuar la producción de fitoplancton, con los Erlenmeyer se inoculan Fernbachs de 2.8 litros y con éstos a su vez se inoculan las bolsas de cultivo.

El medio de cultivo utilizado es el F/2 de Guillard (1972) libre de vitaminas, preparado en garrafrones de borosilicato de 18 litros de capacidad.

El agua que se usa en su preparación se filtra y esteriliza primeramente en la unidad movable con la que se cuenta y posteriormente se autoclava para asegurar la esterilización.

Los recipientes pequeños como Erlenmeyer y Ferbachs se esterilizan en una olla de presión de cocina, mientras que los garrafrones en una autoclave.

La solución de vitaminas del medio F/2 de Guillard (1972) se modificó a $5 \mu\text{g B}_{12}$ /litro.

3.- Experimento para la obtención de las diluciones óptimas.

Para determinar la dilución óptima en I. galbana se armaron 7-bolsas de cultivo con un volumen de 3 litros cada una, esterilizándolos químicamente con una solución de 3 ml. de hipoclorito de sodio por cada litro de agua, dejándolos reposar durante 24 horas. Los tubos de vidrio, tapones, mangueras de vinilo y difusores de aire se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. El tratamiento para los 8 recipientes del cultivo de T. suecica fue similar, a excepción del volumen que fue de 5 litros.

El llenado de las bolsas de cultivo se hizo a partir de los garrafrones a través de un sifón producido por una corriente de aire filtrado, que desplaza el volumen del recipiente llevando el medio de cultivo por una conexión hasta el recipiente de cultivo; este flujo es contro

lado al dejar escapar el aire a través de una salida especial que se abre con una llave de presión.

Cada bolsa de cultivo fue inoculado con medio litro de I. galbana a una densidad promedio de 227×10^3 células por ml. manteniéndose inicialmente el cultivo en estado estático con el fin de calcular la velocidad de crecimiento de la especie. Un procedimiento similar se siguió con T. suecica, sólo que las bolsas fueron inoculadas con dos litros de cultivo a una densidad promedio de 140×10^3 células por ml.

Cuando el cultivo alcanza su fase de crecimiento exponencial se inician las diluciones experimentales que se muestran en la tabla 1 para I. galbana y T. suecica.

TABLA No 1

DILUCIONES EXPERIMENTALES PARA LAS DOS ESPECIES CULTIVADAS

ESPECIE	DILUCIONES EXPERIMENTALES								
<u><i>Isochrysis galbana</i></u>	0.15	0.30	0.40	0.45	0.50	0.60	0.67		
<u><i>Tetraselmis suecica</i></u>	0.10	0.25	0.30	0.35	0.40	0.50	0.60	0.75	

Esto se realiza extrayendo el volumen correspondiente a cada dilución, reemplazándolo con medio de cultivo fresco una vez cada 24 horas. El crecimiento de la población para cada dilución se registró contando el número de células en un hematocitómetro Improver Neubauer de 0.1 mm de profundidad definiéndose así densidad de los cultivos en células por mililitro.

El experimento con las diferentes diluciones para I. galbana se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo durante 6 meses, mientras

que el experimento para T. suecica se hizo durante un periodo de 4 meses a temperatura ambiente y sin control de iluminación debido a que el laboratorio no se habilitaba aún.

Los datos utilizados para la determinación de la dilución óptima en las bolsas con diferentes diluciones para I. galbana fue de un tiempo máximo de 30 días; en el caso de T. suecica fue de 23 días.

4.- Método para la obtención de la velocidad de crecimiento y la dilución óptima.

Velocidad de crecimiento.

El cálculo de la velocidad de crecimiento máximo (μ_m) se obtuvo de acuerdo con la ecuación de Guillard (1973). Las concentraciones de células se determinan en la fase exponencial de crecimiento.

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

donde

μ = velocidad de crecimiento máximo

X_1 = concentración de células al tiempo t_1

X_2 = concentración de células al tiempo t_2

Dilución óptima

La dilución óptima del sistema se determinó haciendo uso de la metodología de Monod (1950) como sigue:

$$X = A - B \frac{D}{C - D} \quad (1)$$

donde

X = densidad de la población de microalgas expresada en número de células por unidad de volumen.

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

A = Constante; cuya forma de obtención se describe más adelante.

B = Constante; cuya forma de obtención se describe más adelante.

C = Constante; valor de la velocidad de crecimiento máxima para la especie de microalgas usada. Calculada de acuerdo con la metodología descrita por Guillard (1973).

Para aplicar la ecuación (1) es necesario contar con los valores de densidad (X_i) correspondientes para diferentes diluciones (D_i). Esto se obtiene del experimento hecho con las especies cultivadas.

Usando los datos experimentales para obtener la minimización de cuadrados de la ecuación (1) se obtiene que:

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

La ecuación (2) es derivada parcialmente primero con respecto de (A) y luego con respecto de (B) para obtener dos ecuaciones simultáneas que permiten estimar las dos constantes anteriores resultando:

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

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

Simplificando, tenemos:

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

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

Si se tiene que:

$$S_1 = \sum_{i=1}^n X_i \quad S_3 = \sum_{i=1}^n X_i \frac{D_i}{C-D_i}$$

$$S_2 = \sum_{i=1}^n \frac{D_i}{C-D_i} \quad S_4 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{D_i}{C-D_i} \right)^2$$

Entonces, sustituyendo en las ecuaciones (5) y (6) e igualando a cero, se obtienen:

$$S_1 - NA + BS_2 = 0 \quad (7)$$

$$S_3 - AS_2 + BS_4 = 0 \quad (8)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones (7) y (8) por determinantes, obtenemos las estimaciones de A y B como:

$$A = \frac{S_2 S_3 - S_1 S_4}{S_2^2 - N S_4}$$

$$B = \frac{N S_3 - S_2 S_1}{S_2^2 - N S_4}$$

Contando con los valores anteriores se sustituyen en la ecuación (1). -

La producción del sistema se expresa al multiplicar ésta ecuación por D:

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

La dilución óptima se obtiene derivando esta última ecuación - con respecto a D e igualando a cero, estimación que representa el máximo de la función DX. Así, la dilución que corresponde a la máxima producción es la dilución óptima.

5.- Método para la obtención del tiempo de generación (g).

La obtención del tiempo de generación (g) se determinó de acuerdo a Fencel (1966) usando la ecuación:

$$g = \frac{0.69 t}{\ln X - \ln X_0}$$

Esta ecuación es la fórmula fundamental para calcular el tiempo de generación en una población tomada entre dos mediciones, es decir, el incremento de la biomasa en el tiempo t. Con ella se calcularon los tiempos de generación para cada dilución.

6.- Método para la obtención de las oscilaciones del sistema.

La estimación de las oscilaciones del sistema se determinó - obteniendo los coeficientes de variación secuencial $(\partial X/\bar{X})$ para cada d_i

lución de acuerdo a Williams (1971). El coeficiente de variación secuencial se define como:

$$\frac{\partial X}{X} = \left(\sum_{i=1}^{n-1} \frac{\left(\frac{X_i}{\bar{X}} - \frac{X_{i+1}}{\bar{X}} \right)^2}{(n-1)} \right)^{1/2}$$

donde

\bar{X} = media de la población.

X_i = valor correspondiente a cada dilución.

N = número de observaciones.

Además se utilizó como una medida de la azarosidad de las variaciones secuenciales el estadístico ΔX , que se calcula como sigue (Williams, 1971):

$$\Delta X = 1 - \frac{\partial X^2}{2 S_x^2}$$

donde:

∂X^2 = diferencia sucesiva de la media cuadrática.

S_x = desviación estandar.

Para conocer si los valores obtenidos son o no azarosos se utilizó el estadístico de Young (1941).

7.- Método para la obtención de la velocidad de crecimiento teórica para los cultivos semicontinuos.

La velocidad de crecimiento teórica (μ_t) para los cultivos semi continuos se calculó de acuerdo a la metodología descrita por Fencel (1966) a partir de la ecuación:

$$D = 1 - \frac{1}{e^{\mu}} \quad \text{de donde} \quad \mu = \ln \frac{1}{1-D}$$

Esta velocidad de crecimiento teórica fue calculada para cada una de las diluciones en las dos especies cultivadas.

En los cultivos continuos se parte de que la velocidad de crecimiento de las especies cultivadas es igual a la dilución con la que se trabaja, es decir, que μ es igual a D.

Para determinar si existía diferencia significativa entre la μ teórica para los cultivos semicontinuos (Fencel, 1966) y la μ promedio experimental, se hicieron pruebas de significancia usando el método para comparar el valor fijo con una media (Sokal y Rohlf, 1969).

De la misma manera se hicieron pruebas de significancia entre el valor de cada dilución (D) y su velocidad de crecimiento (μ experimental) correspondiente.

V. RESULTADOS

1.- Laboratorio de cultivo

Los resultados de la habilitación del laboratorio de cultivo se muestran en las figuras 1-6.

Para llevar a cabo los experimentos de la obtención de las diluciones óptimas se montaron 12 bolsas de 5 litros cada una y posteriormente para proveer de alimento a larvas y adultos de M. californianus se armaron dos bolsas de 20 litros, dos de 15 litros y una de 5 litros.

El trabajo dentro del laboratorio de cultivo para más de dos personas simultáneamente fue difícil por lo reducido del área, ya que parte de ésta estaba ocupada por la unidad de esterilización y filtración.

Fue necesario regular de una forma precisa la entrada de aire a cada bolsa, puesto que si una bolsa tenía aire en exceso las demás tenían una homogenización deficiente.

La unidad de filtración y esterilización no fue eficiente para evitar la contaminación en los cultivos de I. galbana.

Las bolsas de cultivo que se muestran en la figura 7, se utilizaron en forma indistinta. Primeramente se trabajó con las bolsas con base de 16 cm. de diámetro con la placa de acrílico, pasándose después, al necesitar una mayor cantidad de bolsas de cultivo, a la base de 6 cm. de diámetro con tapón de goma, mostrando ambos tipos de bolsas un funcionamiento similar. La modificación de usar una base más pequeña dió como resultado un recipiente más sencillo.

2.- Diluciones óptimas

Las velocidades máximas de crecimiento para 11 cultivos estáticos de I. galbana y 5 cultivos estáticos de T. suecica se muestran en la tabla 2. La velocidad máxima de crecimiento para I. galbana fue de 1.008 divisiones/días y para T. suecica de 1.16 divisiones/días.

Los valores de densidad obtenidos diariamente para cada dilución en los cultivos semicontinuos de I. galbana y T. suecica se muestran en las gráficas de las figuras 9, 10 y 11. Con éstos valores se calculó la densidad promedio para cada dilución en las dos especies, las que se muestran en la tabla 3.

La relación que existe entre la densidad (X) y la dilución de acuerdo al modelo de Monod se muestra en la figura 12 para I. galbana y en la figura 13 para T. suecica, figuras que fueron construidas a partir de los valores de las constantes A y B:

<u>I. galbana</u>	<u>T. suecica</u>
A= 12.11	A= 15.25
B= 7.42	B= 8.44

Estas constantes nos permiten obtener los valores de las diluciones óptimas (D) para cada especie, sustituyendolos en la ecuación que define la producción del sistema:

$$DX = \frac{AD - BD^2}{C - D}$$

Esta ecuación se obtiene al multiplicar la ecuación de Monod por D. Así, tenemos que para:

<u>I. galbana</u>	<u>T. suecica</u>
$DX = 12.11 D - \frac{7.42 D^2}{1.008 - D}$	$DX = 15.25 D - \frac{8.44 D^2}{1.16 - D}$

TABLA N° 2 - VELOCIDAD MAXIMA PROMEDIO
 PARA *Isochrysis galbana*. Y
Tetraselmis suecica.

I. galbana

CULTIVO	VELOCIDAD MAXIMA DE CRECIMIENTO
1	0 . 9 0 6
2	1 . 0 7
3	0 . 9 7 6
4	1 . 0 0
5	1 . 1 6
6	1 . 0 6
7	1 . 1 4
8	0 . 8 3 9
9	0 . 9 1
10	0 . 9 4
11	1 . 0 9

$$\bar{\mu}_{\max} = 1.008$$

T. suecica

CULTIVO	VELOCIDAD MAXIMA DE CRECIMIENTO
1	1 . 1 5
2	1 . 1 7
3	1 . 0 8
4	1 . 2 4
5	1 . 2 7

$$\bar{\mu}_{\max} = 1.16$$

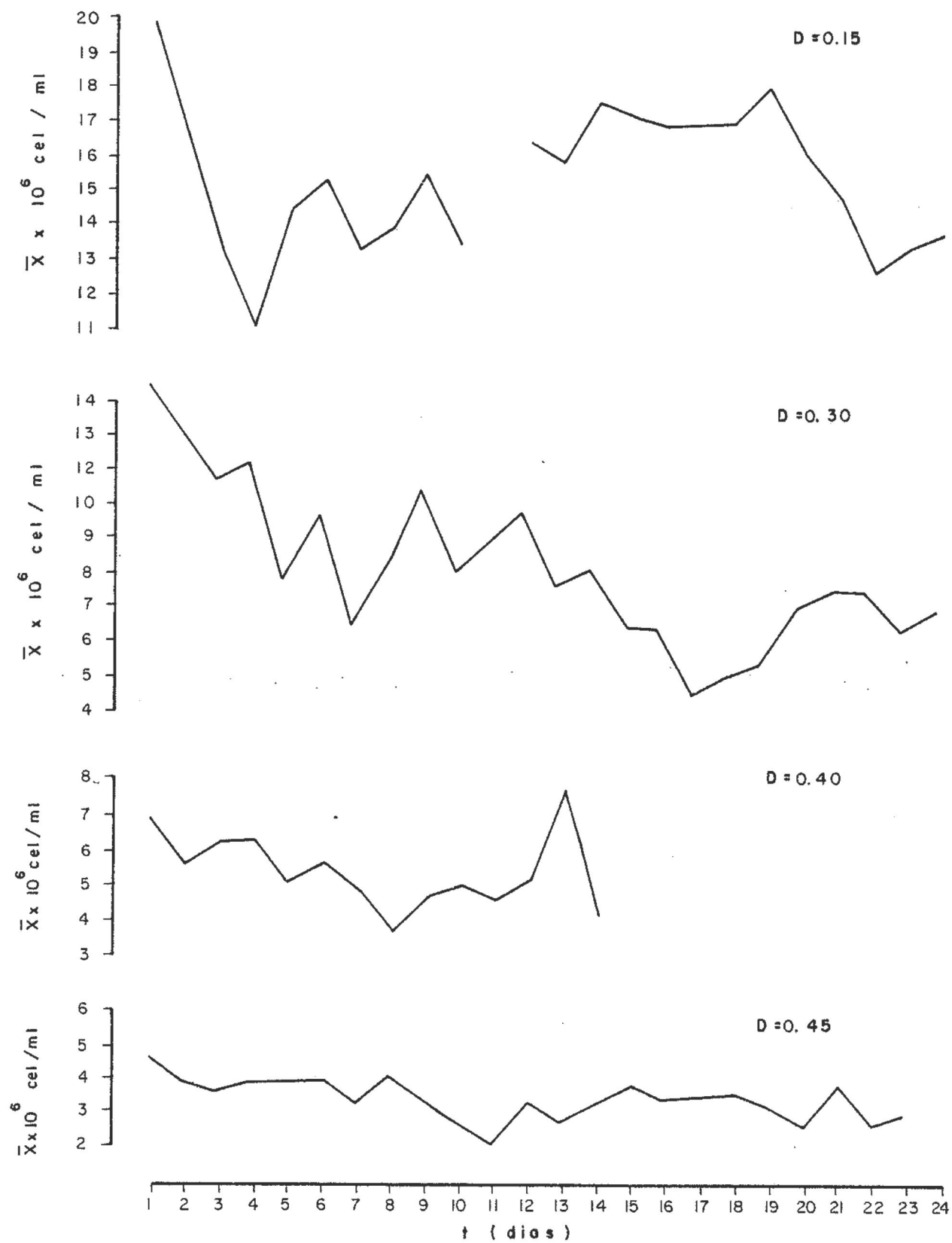


Fig. 9 - VALORES DE DENSIDAD (cel/ml) DE LA MICROALGA *Isochrysis galbana* CORRESPONDIENTES A CADA DILUCION (D)

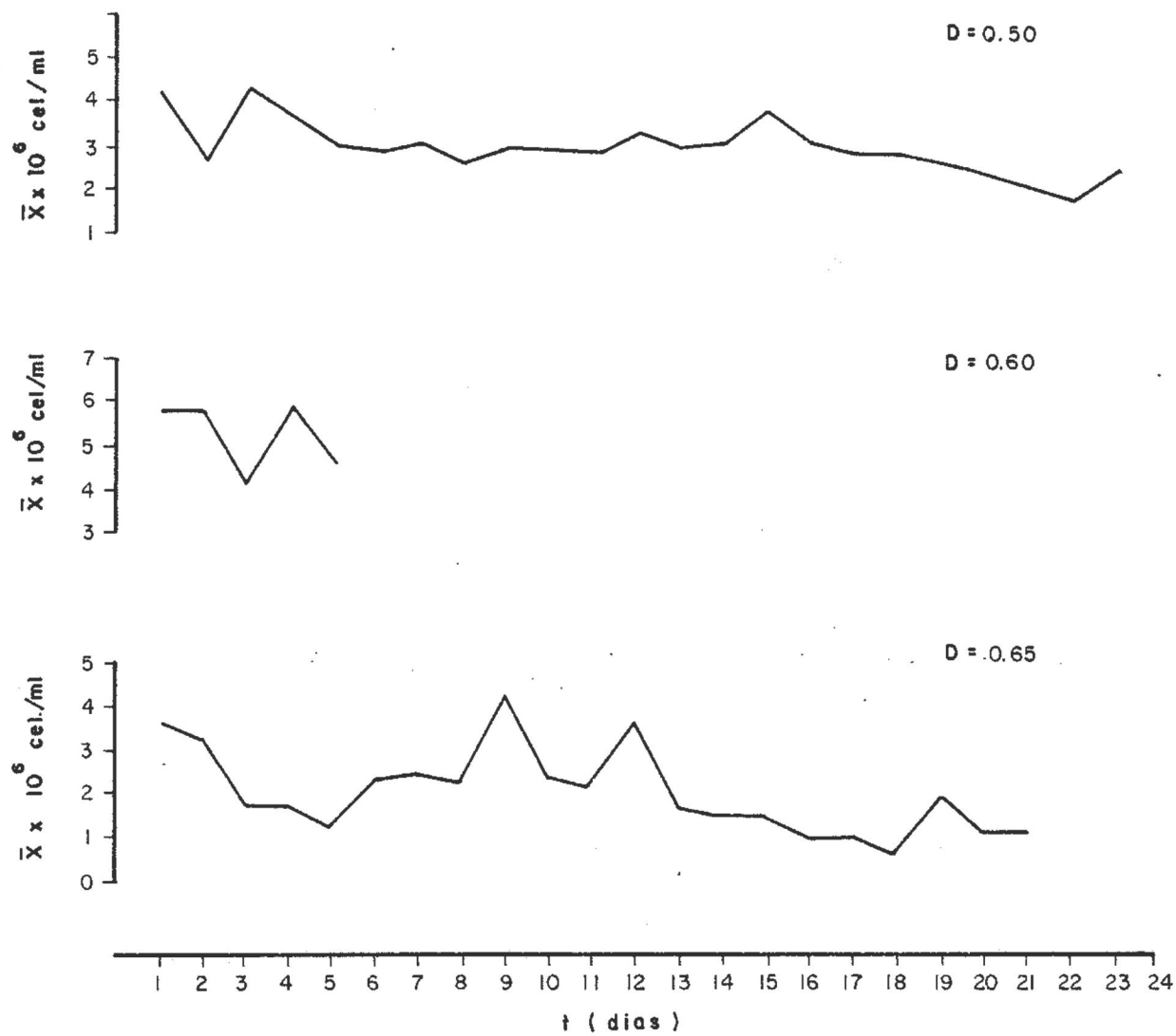


Fig. 10 - VALORES DE DENSIDAD (cel./ml) DE LA MICROALGA *Isochrysis galbana* CORRESPONDIENTES A CADA DILUCION (D)

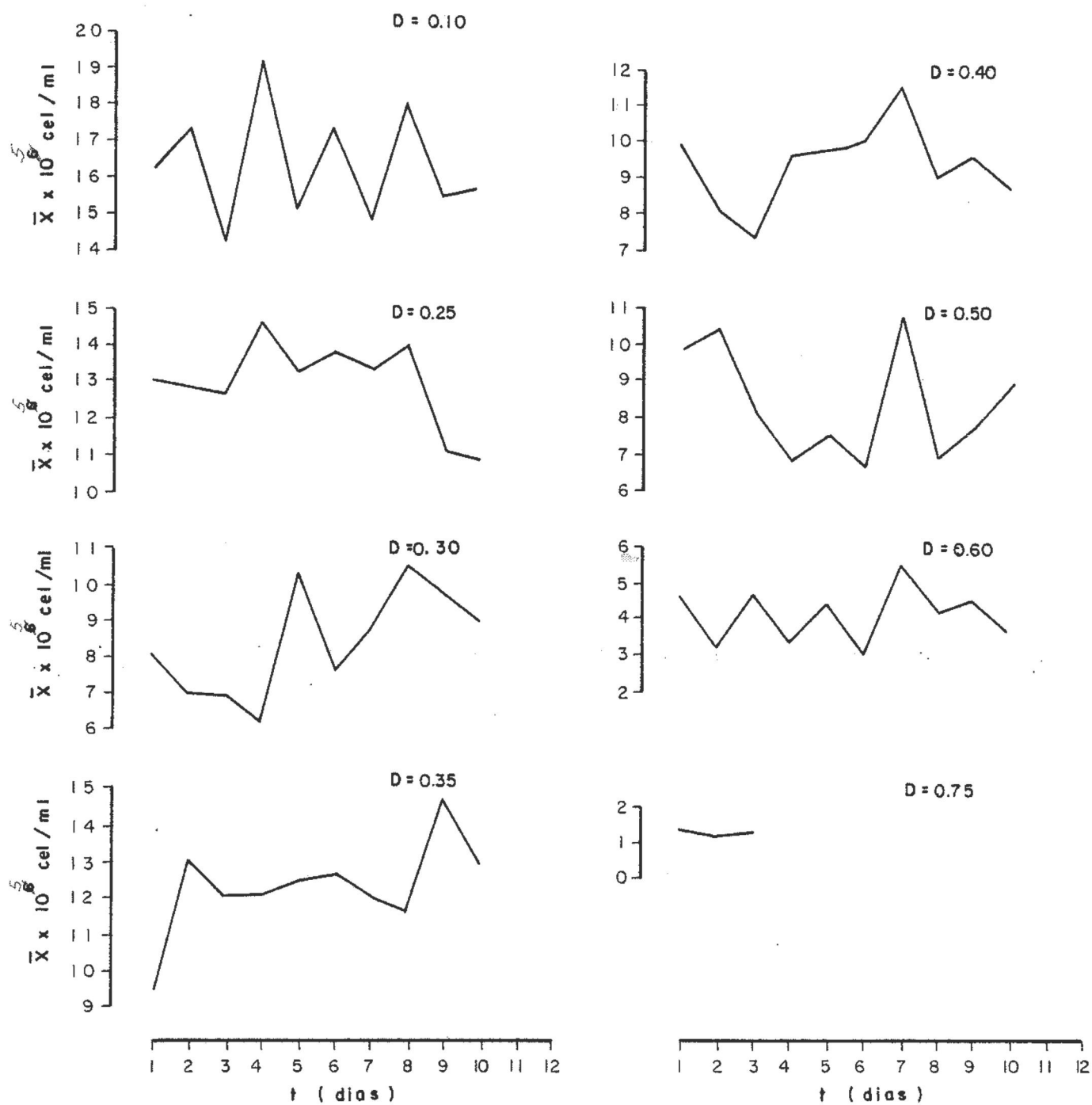


Fig. 11 = VALORES DE DENSIDAD (cel/ml) DE LA MICROALGA *Tetraselmis suecica* CORRESPONDIENTES A CADA DILUCIÓN (D)

TABLA N° 3

TIEMPO DE GENERACION DEL CULTIVO (g EN DIAS); COEFICIENTE DE VARIACION SECUENCIAL ($\delta X/\bar{X}$) Y ESTIMACION DEL AZAR-DE LAS VARIACIONES (ΔX) PARA LAS DENSIDADES PROMEDIO - (\bar{X} cel/ml) CORRESPONDIENTE A CADA DILUCION (D).

D	$\bar{X} \times 10^6$	g	NUMERO DE MUESTRAS	$\delta X/\bar{X}$	ΔX
0.15	15.15	3.63	23	0.1597	0.3886 *
0.30	9.12	2.02	24	0.1812	0.7276 **
0.40	5.34	1.38	14	0.2745	0.1470 NS
0.45	3.36	1.21	23	0.1722	0.616 **
0.50	2.89	1.13	23	0.2115	0.481 **
0.60	0.52	0.82	5	0.2854	0.420
0.67	0.21	0.683	20	0.4879	0.4642 *

Isochrysis galbana

D	$\bar{X} \times 10^5$	g	NUMERO DE MUESTRAS	$\delta X/\bar{X}$	ΔX
0.10	15.906	16.46	10	0.218	-0.064 NS
0.25	12.927	2.78	10	0.095	0.197 NS
0.30	12.442	1.97	10	0.145	0.231 NS
0.35	12.195	1.38	10	0.142	0.071 NS
0.40	9.371	1.36	10	0.152	0.221 NS
0.50	8.91	0.973	10	0.761	-0.019 NS
0.60	4.21	0.775	10	0.321	-0.625 **
0.75	1.244	0.612	3	0.146	-0.026 +

Tetraselmis suecica

NS No significativa al 10% (Azar)

* Significativa al 10% (No azarosa)

** Significativa al 2% (No azarosa)

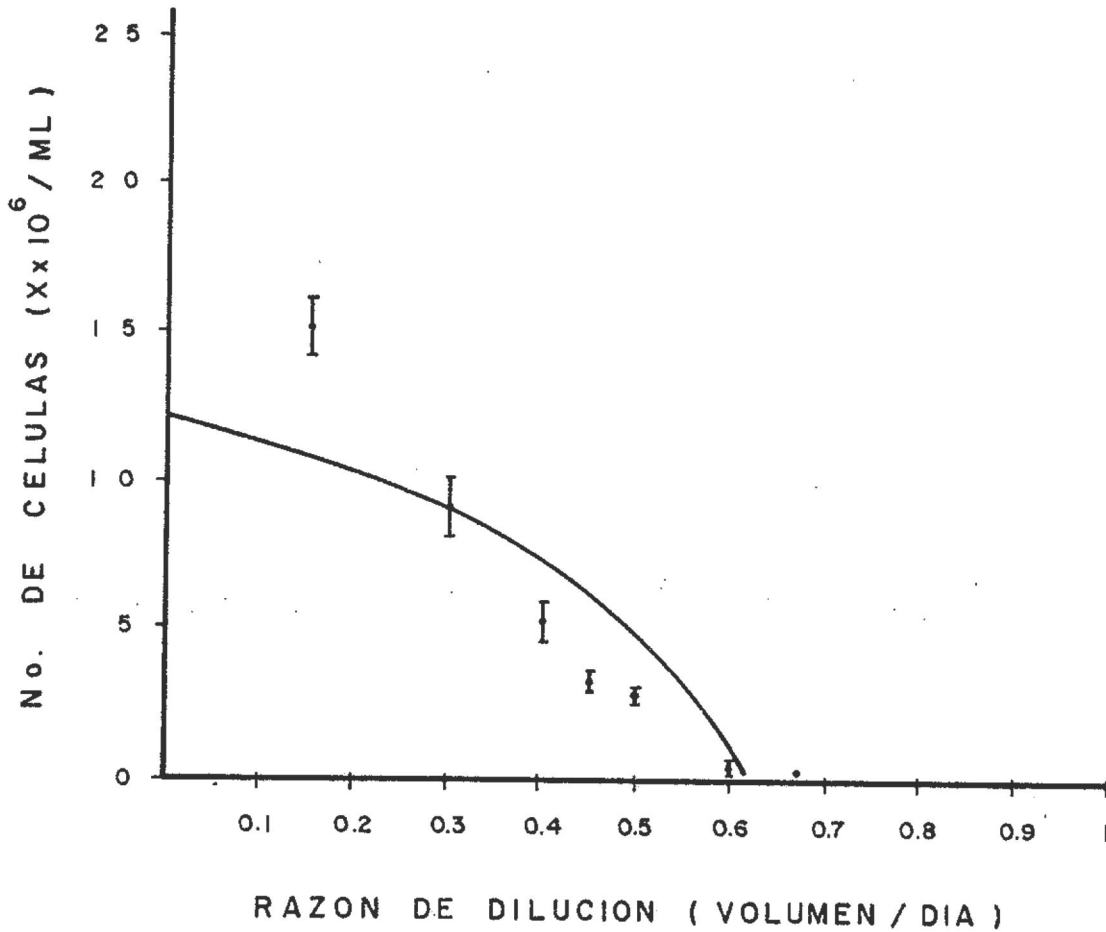


Fig. 12 RELACION ENTRE LA DENSIDAD Y LA DILUCION PARA UN CULTIVO SEMICONTINUO DE Isochrysis galbana, DONDE SE MUESTRAN LAS MEDIAS DE LOS VALORES OBTENIDOS CON LOS LIMITES DE CONFIANZA AL 95% DE UNA DISTRIBUCION NORMAL. LA RELACION SE OBTIENE DE ACUERDO AL MODELO DE MONOD (1950).

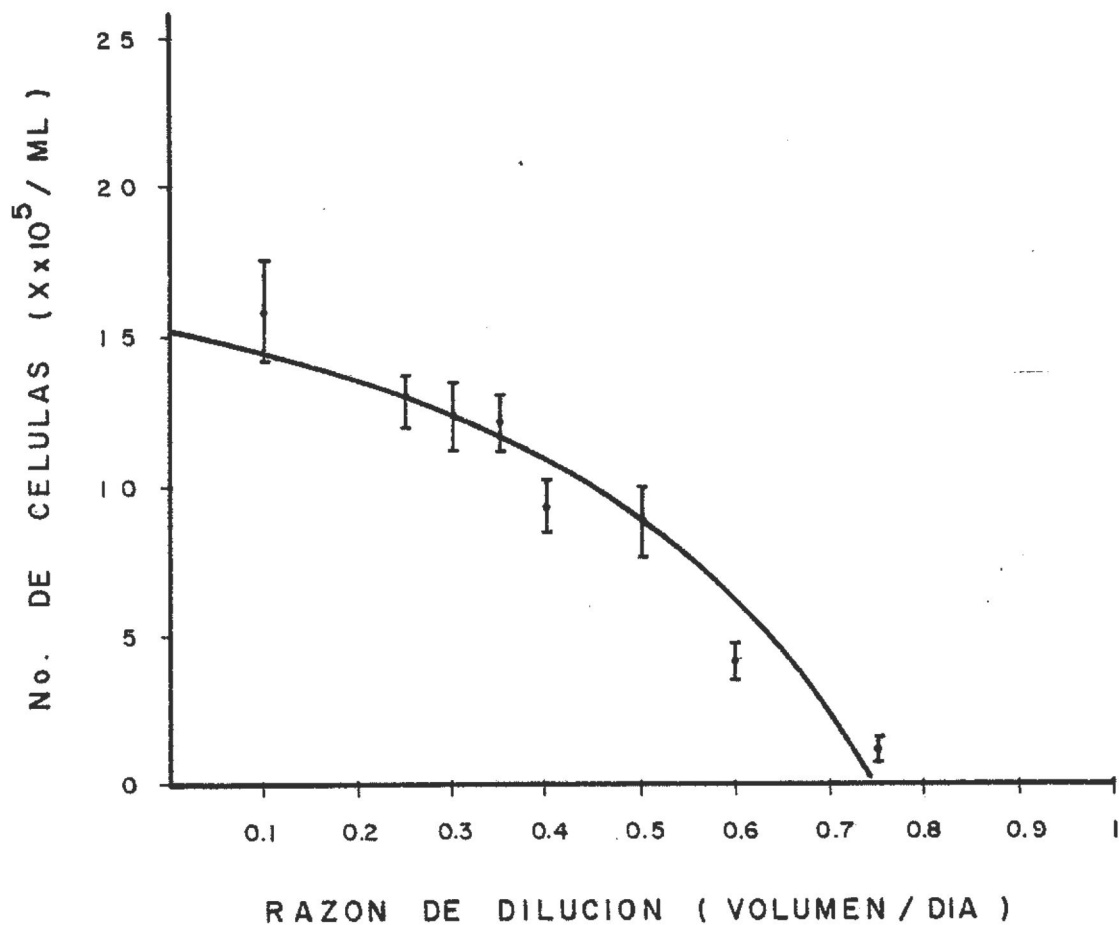


Fig. 13 RELACION ENTRE LA DENSIDAD Y LA DILUCION PARA UN CULTIVO SEMICONTINUO DE Tetraselmis suecica, DONDE SE MUESTRAN LAS MEDIAS DE LOS VALORES OBTENIDOS CON LOS LIMITES DE CONFIANZA AL 95 %. DE UNA DISTRIBUCION NORMAL. LA RELACION SE OBTIENE DE ACUERDO AL MODELO DE MONOD (1950).

Derivando las ecuaciones con respecto a D e igualando a cero;

<u>I. galbana</u>	<u>T. suecica</u>
$F'(DX) = 12.11 - \left[\frac{(1.008)(14.84)D - (7.42)D^2(-1)}{(1.008 - D)^2} \right]$	$F'(DX) = 15.25 - \left[\frac{(1.16 - D)(16.88)D - (8.44)D^2(-1)}{(1.16 - D)^2} \right]$

Reagrupando términos se obtiene una ecuación de segundo grado:

<u>I. galbana</u>	<u>T. suecica</u>
$19.53 D^2 - 39.36 D + 12.30 = 0$	$23.69 D^2 - 54.96 D + 20.52 = 0$

Resolviendo éstas ecuaciones se obtienen los valores de las diluciones óptimas para cada especie, tomando el valor negativo de la raíz de acuerdo a Cáceres (1979).

<u>I. galbana</u>	<u>T. suecica</u>
D = 0.38	D = 0.46

3.- Producción del sistema.

La gráfica que describe la producción es una parábola que se muestra en la figura 14 para I. galbana y en la figura 15 para T. suecica, en donde el punto de inflexión de la curva es la dilución óptima correspondiente a cada especie.

La producción del sistema se obtiene multiplicando la dilución óptima por la concentración de células para esa dilución; para I. galbana es de 2.9×10^6 cel/vol/día y para T. suecica es de 4.46×10^5 cel/vol/día. Para programar la producción de I. galbana fueron suficientes dos bolsas de 15 litros y una de 5 litros; para T. suecica dos bolsas de 5 litros.

Con ésto se cubrieron las necesidades de alimentación de lar--

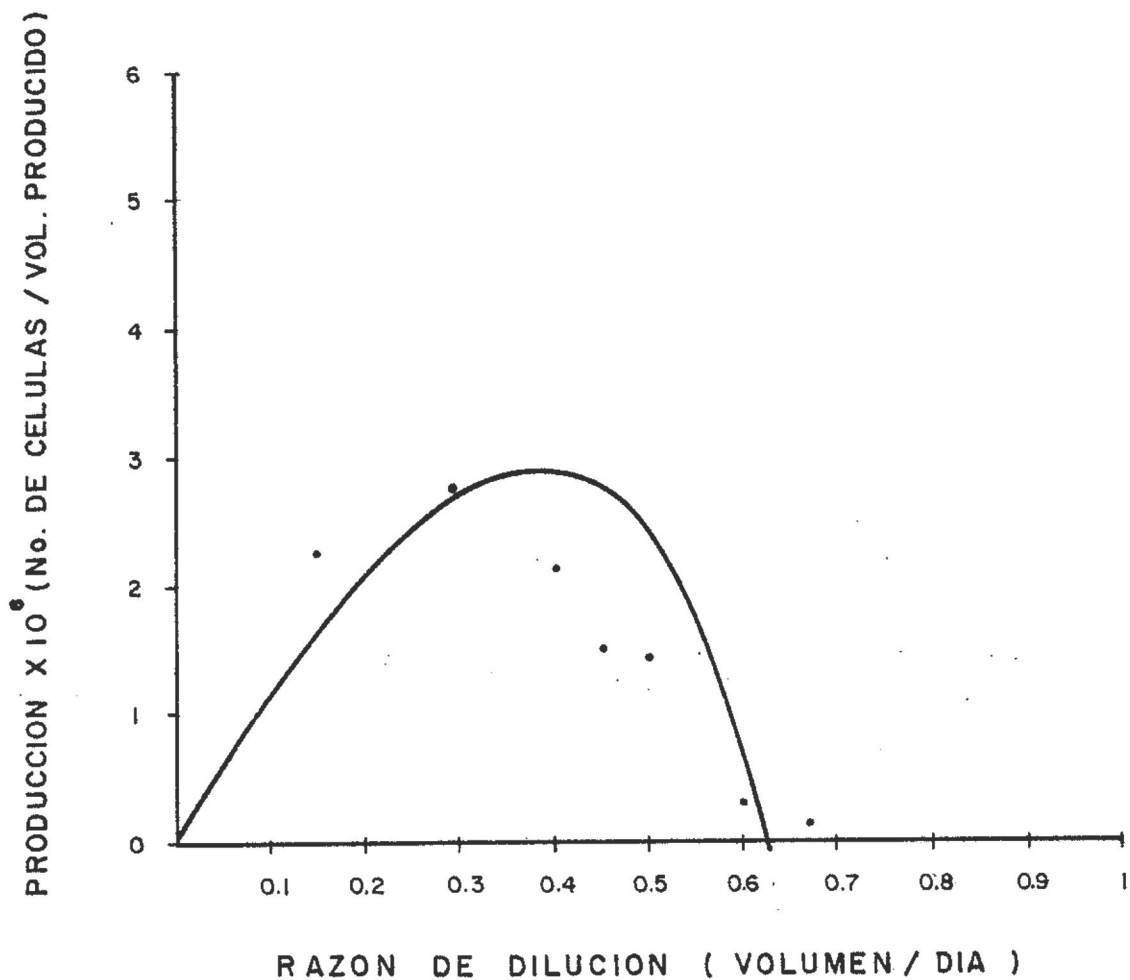


Fig. 14 RELACION ENTRE LA PRODUCCION Y LA DILUCION EN EL CULTIVO SEMICONTINUO DE Isochrysis galbana. LA DILUCION OPTIMA SE ENCUENTRA EN EL PUNTO DE INFLEXION DE LA CURVA.

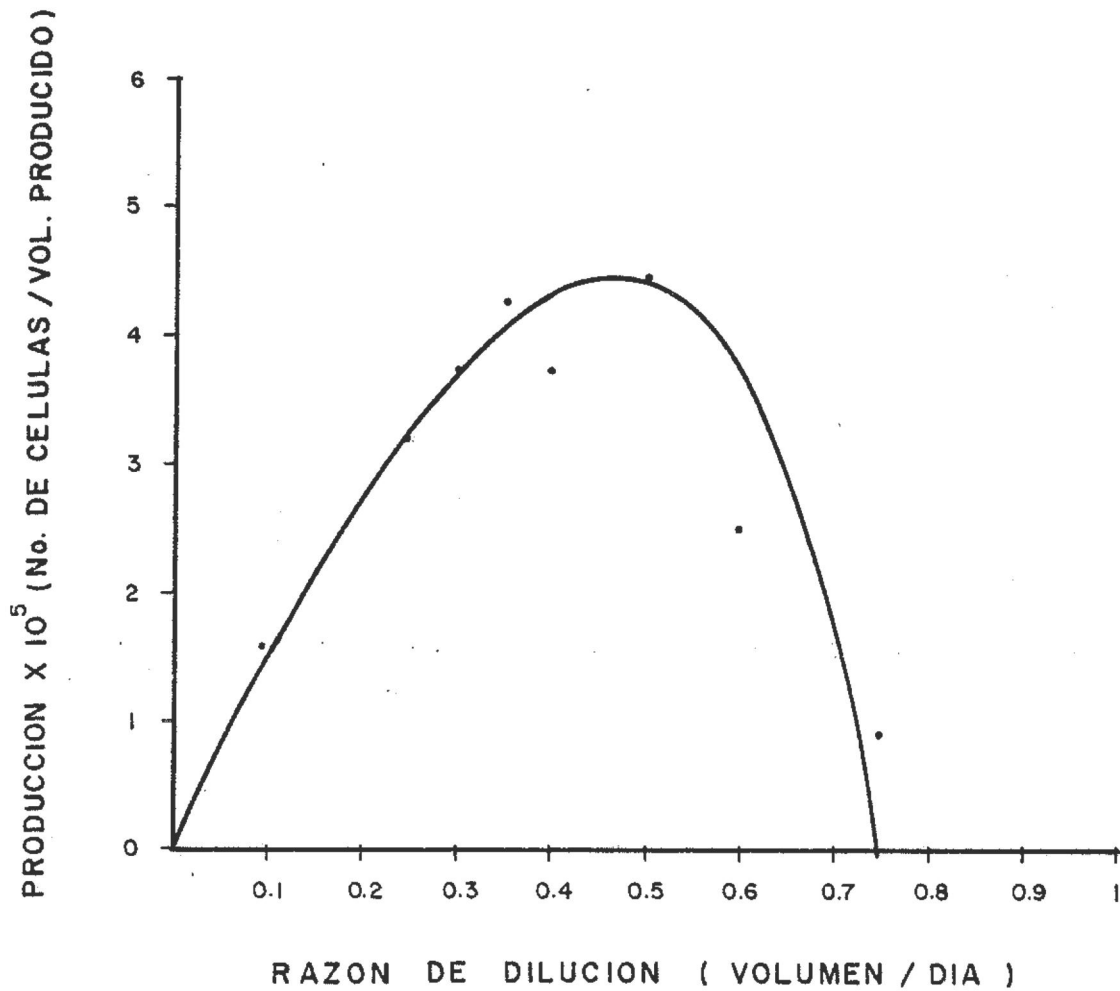


Fig. 15 RELACION ENTRE LA PRODUCCION Y LA DILUCION EN EL CULTIVO SEMICONTINUO DE Tetraselmis suecica. LA DILUCION OPTIMA SE ENCUENTRA EN EL PUNTO DE INFLEXION DE LA CURVA.

vas y adultos de M. californianus.

4.- Oscilaciones del sistema

En las figuras 9, 10 y 11 se pueden apreciar las variaciones diarias en la densidad de los cultivos de las dos especies. Para tener una medida de estas variaciones se estimaron las oscilaciones de cada cultivo correspondiente a su dilución y se muestran con el coeficiente de variación secuencial ($\Delta X/X$) en la tabla 3. En ésta misma tabla se muestra la azarosidad de las oscilaciones, resultando que para los cultivos de I. galbana en la dilución de 0.40 las oscilaciones se deben al azar y en las diluciones restantes no son azarosas; para T. suecica todas las oscilaciones son azarosas a excepción de la dilución de 0.60 que por una pequeña diferencia no lo es.

5.- Comparación de los resultados obtenidos con los modelos teóricos para los cultivos continuos y semicontinuos.

Los resultados de la velocidad de crecimiento de acuerdo a los modelos teóricos de los cultivos continuos y semicontinuos y los valores promedio de la velocidad de crecimiento experimental para I. galbana y T. suecica se muestra en la tabla 4, respectivamente. En ésta se indica que valores experimentales son significativamente distintos de los valores teóricos a un nivel de confianza del 95% aplicando la prueba t de Student. Para I. galbana existe diferencia entre la velocidad de crecimiento experimental ($\bar{\mu}$) y la velocidad de crecimiento teórica para los cultivos continuos en las diluciones 0.45, 0.50 y 0.67 y para T. suecica existe diferencia significativa en las diluciones 0.35, 0.50 y 0.60. En cambio, al hacer la prueba para determinar si hay diferencia significati

TABLA N° 4

VALOR DE DILUCION (D), NUMERO DE DATOS (n), VELOCIDAD DE CRECIMIENTO PROMEDIO TEORICO OBTENIDO A PARTIR DE LA RELACION DESCRITA POR FencI (1966) PARA CULTIVOS SEMICON-
TINUOS $\mu = \frac{1}{1-D}$ CORRESPONDIENTES A CADA D ($\mu \dagger$), VELOCIDAD DE CRECIMIENTO PROMEDIO EXPERIMENTAL PARA CADA D ($\bar{\mu}$), DESVIACION ESTANDAR ($S\mu$), PRUEBA T. DE STUDENT PARA COMPARAR EL VALOR DE $\mu \dagger$ CONTRA $\bar{\mu}$ ($\dagger s \bar{\mu}$) Y PRUEBA T DE STUDENT PARA EL VALOR DE LA D CONTRA LA $\bar{\mu}$ ($\dagger s D$).

D	n	$\mu \dagger$	$\bar{\mu}$	$S\mu$	$\dagger s \bar{\mu}$	$\dagger s D$
0.15	22	0.162	0.19	0.248	0.549	0.7843
0.30	24	0.356	0.34	0.18	0.270	1.0810
0.40	12	0.510	0.50	0.21	0.160	1.666
0.45	22	0.597	0.57	0.17	0.750	3.363 *
0.50	22	0.693	0.61	0.18	2.180*	2.894 *
0.60	4	0.916	0.84	0.29	0.500	1.655
0.67	19	1.108	1.01	0.454	0.95	3.300 *

Isochrysis galbana

D	n	$\mu \dagger$	$\bar{\mu}$	$S\mu$	$\dagger s \bar{\mu}$	$\dagger s D$
0.10	10	0.105	0.0419	0.184	-1.087	-1.001
0.25	10	0.287	0.248	0.110	-1.147	-0.058
0.30	10	0.356	0.350	0.162	-0.0117	0.0980
0.35	9	0.430	0.470	0.149	-0.081	2.448 *
0.40	10	0.510	0.505	0.155	-0.064	0.645
0.50	10	0.693	0.709	0.284	-0.179	2.348 *
0.60	10	0.916	0.890	0.357	-0.632	2.589 *
0.75	3	1.386	1.127	0.167	-2.697	3.927

Tetraselmis suecica

* PARA P = 0.05 DE UNA DISTRIBUCION \dagger student EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

va entre la velocidad de crecimiento experimental ($\bar{\mu}$) y la velocidad de crecimiento teórica para los cultivos semicontinuos (μ_t) se encontró que solo en la dilución 0.50 de I. galbana es significativa la diferencia, - para T. suecica no existe diferencia significativa en ninguna de las diluciones.

En las figuras 16 y 17 se muestra la relación que existe entre la velocidad de crecimiento teórica para los cultivos continuos, la velocidad teórica para los cultivos semicontinuos y la velocidad de crecimiento experimental obtenida, correspondiente a cada dilución. Además se muestra el tiempo de generación.

Isochrysis galbana

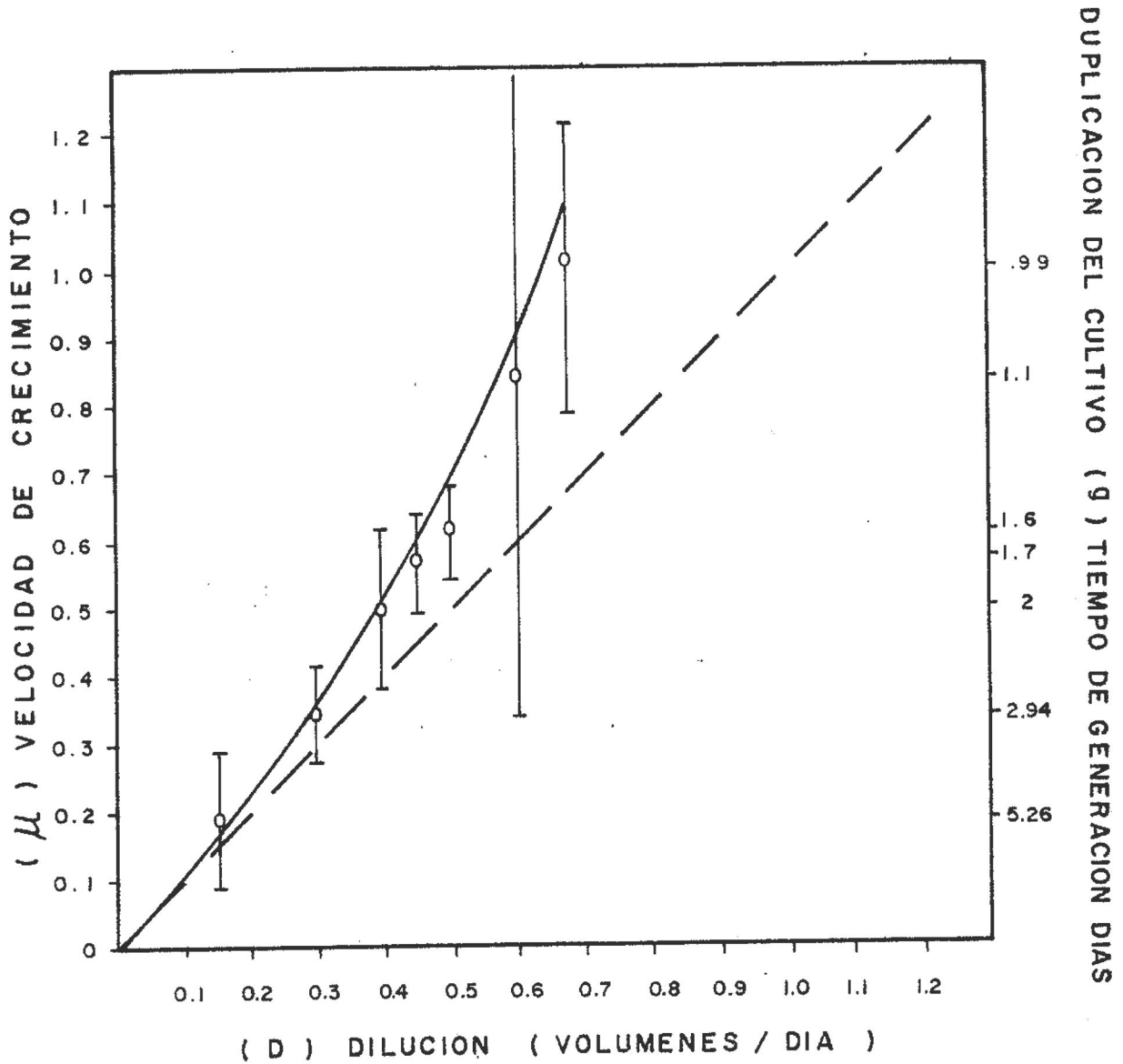


Fig. 16.- COMPARACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ENTRE LOS VALORES EXPERIMENTALES Y LOS VALORES TEORICOS EN LOS CULTIVOS CONTINUOS (----) Y SEMICONTINUOS (—)

Tetraselmis suecica

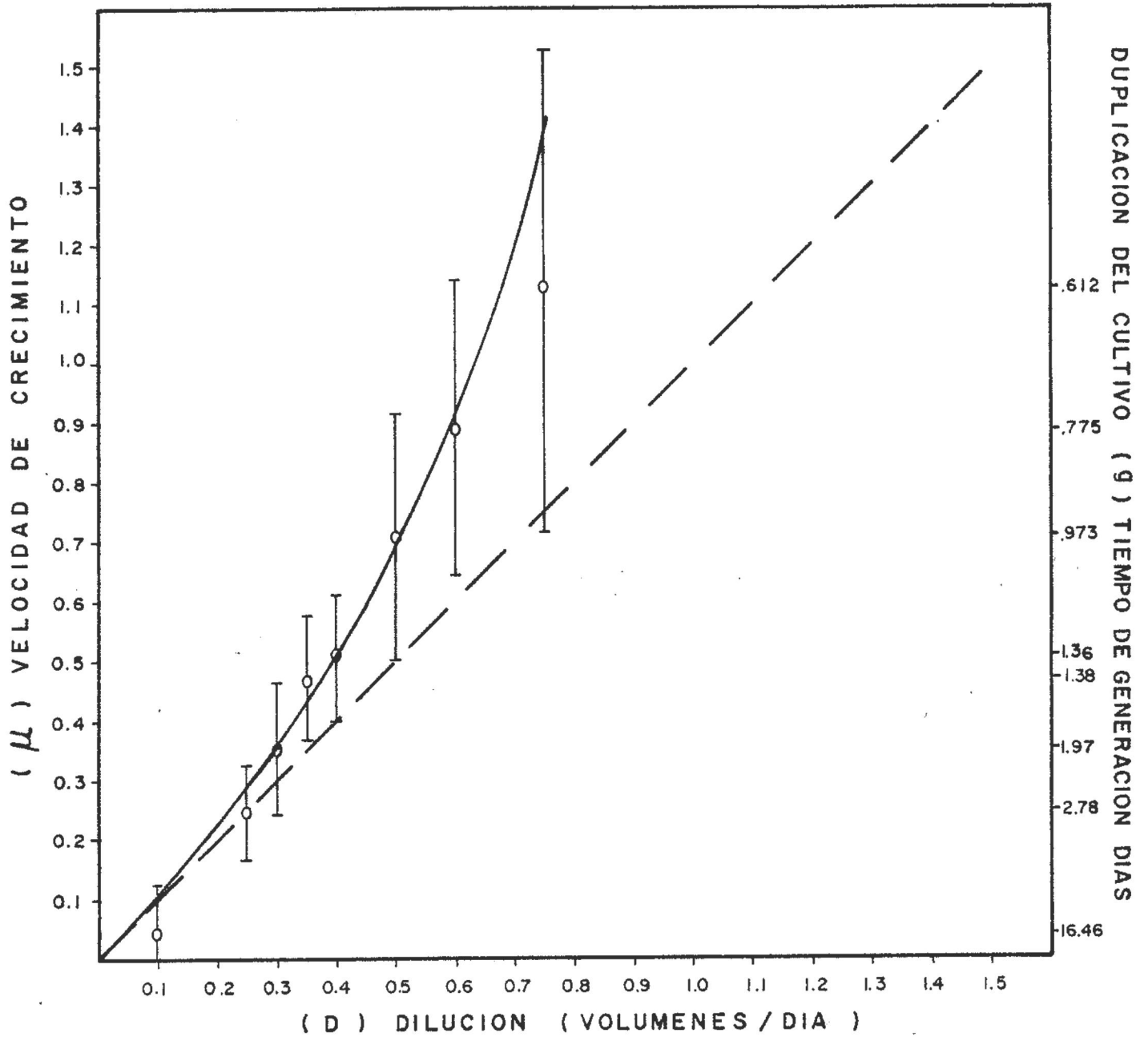


Fig. 17 - COMPARACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ENTRE LOS VALORES EXPERIMENTALES Y LOS VALORES TEORICOS EN LOS CULTIVOS CONTINUOS (-----) Y SEMICONTINUOS (—)

VI. DISCUSION

Laboratorio y bolsas de cultivo

Las dimensiones del área de trabajo fueron reducidas debido a que se contó con serias limitaciones para la construcción del laboratorio.

A la red de distribución de aire fue necesario adaptarle un sistema adicional de drenado, debido a que el vapor de agua al condensarse llenaba los tubos conductores del aire, provocando el peligro de proliferación de microorganismos que pudieran contaminar las bolsas de cultivo.

La unidad de esterilización se usó para tratar el agua de mar de los cultivos; en los de T. suecica no hubo problemas de contaminación, en cambio en el caso de los cultivos de I. galbana los problemas de contaminación fueron muy graves al grado de que los experimentos se interrumpieron en varias ocasiones. Para solucionar esto, se aumentó la precaución en el manejo del material y medio de cultivo durante los experimentos, pero el problema no pudo ser resuelto hasta que el medio de cultivo se esterilizó en autoclave. Sin embargo esta forma de esterilización está acompañada de bastantes problemas técnicos en el tratamiento de grandes volúmenes de agua (Baynes y Emerson, 1979). Esto puede ser resuelto esterilizando con rayos UV y filtrando con filtros de membrana, alternativa que se han aplicado en cultivo de microalgas con buenos resultados (Canzonier y Brunetti, 1975; Trotta, 1981) y abre perspectivas para la solución de este problema en nuestro país.

Los cambios en las bolsas de cultivo se debieron a que las bases de 8 cm. son más sencillas, fáciles de adquirir y de más bajo costo que las de 16 cm. de diámetro (figura 7).

Una vez que fue necesario aumentar la producción de fitoplancton, se aumentó el volumen de los recipientes, provocando que el sellado térmico no soportara el peso. Por esta razón se modificó el sellado anterior al descrito por Trotta, (1981),

Las ventajas que nos hicieron escoger el tipo de recipiente - construido con bolsas de polietileno y fondo cónico son ampliamente discutidas por Persoone y Sorgeloos (1975), Canzonier y Brunetti (1975) y Cáceres (1979), de donde las más importantes son:

1.- Una mejor mezcla del cultivo que evita la sedimentación de las algas y distribuye mejor los nutrientes que entran al recipiente de cultivo. Para lograr esto, se ha sustituido el fondo plano de los recipientes tradicionales por uno cónico que ofrece una base con área muy pequeña de donde las células que se pudieron sedimentar son fácilmente suspendidas por la corriente de aire, que además favorece la homogenización del medio nutritivo.

2.- La obtención de altas densidades de algas unicelulares en comparación con los sistemas tradicionales. Esto se obtiene al asociar al fondo cónico un diámetro pequeño para producir una columna delgada, - esta condición permite que la población cultivada sea iluminada en forma homogénea y segura.

3.- El ahorro de espacio en su instalación en comparación con los recipientes tradicionales del cultivo. El uso de columnas reduce el espacio ocupado, permite además adaptarse a diferentes configuraciones - espaciales, logrando de esta manera un mayor aprovechamiento de las áreas destinadas a la producción de fitoplancton.

4.- Los componentes que forman el recipiente de cultivo son de

fácil adquisición y bajo costo; además este sistema de cultivo puede ser reproducido en cualquier parte del país lo que presenta alternativa apropiadas para el desarrollo de unidades de cultivo masivo con propósitos acuaculturales.

Dilución óptima.

Como se aprecia en la tabla 3 los valores promedio de densidad en diluciones bajas son altos mientras que en diluciones altas son bajos para las dos especies.

Es claro que en un cultivo con una densidad alta en la que se inicia una pequeña dilución se mantendrá por un tiempo el cultivo a una densidad alta ya que lo que se extrae y posteriormente se reemplaza con medio de cultivo es poco. Sin embargo si se inicia con una alta dilución se tiende a dejar muy poca densidad por lo que el cultivo no puede recuperarse.

Esta relación que existe entre la densidad y su valor de dilución correspondiente se mostró en la figura 12 y 13. Los valores promedios experimentales para las diluciones extremas de 15 y 67 % en la figura 12, que corresponde a I. galbana no se ajustan bien a la curva teórica para los cultivos continuos descrita por la ecuación de Monod (1950). Pensamos que esto se debe a que el tratamiento de los datos fue hecho en base a la teoría de los cultivos continuos y en nuestro caso trabajamos con cultivo semicontinuo. En cambio para los valores de las diluciones medias existe un ajuste mejor a la curva teórica de los cultivos continuos, atribuyéndolo a que los cambios que sufren las poblaciones en estas diluciones no son tan extremos.

El comportamiento de las densidades medias experimentales con respecto a las teóricas en el caso de la figura 13, correspondiente a --

T. suecica siguen el mismo patrón que para I. galbana.

Lo anterior hace necesario analizar los resultados con un modelo que describa el comportamiento de la relación dilución-número de células en el cultivo semicontinuo.

Sin embargo el modelo de los cultivos continuos se aplicó basándose en que el cultivo semicontinuo es un tipo de cultivo continuo y hacer una diferenciación entre ambos procesos es incorrecto (Fencel, 1966).

La dilución para I. galbana fue de 0.38, un valor relativamente bajo comparado con el valor de dilución de 0.46 para T. suecica.

I. galbana mostró ser siempre más difícil de cultivar que T. suecica siendo propensa a contaminarse y muy sensible a cambio en condiciones fisico-químicas como medio de cultivo y temperatura.

T. suecica se cultivó en invierno bajo condiciones rudimentarias y sin control de temperatura y luz, mostrando ser una especie más resistente y fácil a cultivarse. Por esto nos explicamos el que I. galbana soportó una dilución menor que T. suecica.

Programación de la producción

En los experimentos que se llevaron a cabo en el Instituto de Investigación Oceanológicas con cultivos de adultos y larvas de M. californianus se necesitó una concentración de I. galbana diaria de 9×10^6 células y de T. suecica de 1.5×10^6 células.

Para programar la producción se consideraron estas necesidades y los valores de producción obtenidos para las dos especies cultivadas de 2.9×10^6 número de células por volumen producido para I. galbana y de 4.46×10^5 número de células por volumen producido para T. suecica. Con esto se calculó la capacidad de los recipientes de cultivo que cubriera los requerimientos de microalgas. Por lo tanto se necesitaron tres reci-

recipientes para cultivar a I. galbana; dos de 15 litros para alimentar a - adultos y uno de 5 litros para alimentar larvas de M. californianus, te - niendo una producción total de 10.15×10^{10} células diarias. Mientras - que para T. suecica se necesitaron dos recipientes de 20 litros cada - uno, cuya producción total fue de 1.78×10^{10} células diarias usándose - para alimentar adultos.

Esta producción está calculada para un nivel experimental, - sin embargo, el laboratorio de cultivo podría soportar una producción a un nivel piloto, en donde sería posible instalar 30 recipientes de cul - tivo con una capacidad de 40 litros y 8 recipientes de 15 litros. Es - decir, se estarían cultivando 1320 litros en un área de 8.74 m^2 .

Conociendo que el máximo requerimiento de microalgas para las larvas de bivalvos es de 160 000 células/ml (Breese y Malouf, 1974) y que un número de 15 larvas por ml. es óptimo (Loosanoff y Davis, 1963). - El laboratorio con una producción de 382.8×10^{10} células diarias de I. galbana podría alimentar una cantidad de 358 000 000 de larvas diaria - mente.

Oscilaciones en los cultivos experimentales

Las variaciones en densidad de los cultivos semicontinuos en - el estado de equilibrio de I. galbana y T. suecica medidas como el coe - ficiente de variación secuencial fueron de un promedio de 25 % en las - dos especies.

Las técnicas de cultivo semicontinuo presentan desventajas de una difícil automatización y no uniformidad en el proceso (Fencel, 1966) lo que trae como consecuencia una mayor variación en las oscilaciones - dentro del estado de equilibrio en los cultivos.

El valor de variación para T. suecica sería reducido grande--

mente si las condiciones físicas de cultivo hubieran sido controladas.

Para la población de I. galbana las oscilaciones en su mayoría tuvieron un comportamiento no azaroso, mientras que en T. suecica las oscilaciones fueron totalmente al azar; esto debido posiblemente a que las condiciones de cultivo para cada especie fueron diferentes.

En el cultivo de T. suecica los parámetros variaron en forma fortuita al no ser controlados, lo que hizo también que las variaciones dentro de los cultivos oscilaran de la misma manera. Para la población de I. galbana debido a que las condiciones sí fueron controladas quizás tuvo un mecanismo de regulación (Williams, 1971) que hizo que las oscilaciones siguiera un orden y fueran no azarasas.

Sin embargo estas oscilaciones en los cultivos no influyeron en la producción, ya que pudo ser programada con resultados satisfactorios.

En las figuras 16 y 17 se mostró la dependencia que existe entre la dilución (D), la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación para los cultivos de I. galbana y T. suecica respectivamente. Se puede observar que en diluciones pequeñas el tiempo de generación es grande, conforme la dilución aumenta el tiempo de generación disminuye. Esto se explica ya que el tiempo de generación es el tiempo en que el cultivo (como un todo) se duplica y es claro que cuando las diluciones son pequeñas las densidades son grandes y por tanto el tiempo que tarda el cultivo en duplicarse es alto y viceversa.

Teóricamente para los cultivos continuos la relación entre la D y la μ es lineal (es decir $\mu = D$) sin embargo esta relación para los cultivos semicontinuos está dada por la ec. $\mu = \ln \frac{1}{1-D}$ (Fenc1, 1966) y está representada en las curvas de las figuras 16 y 17. Se puede observar en estas figuras que los valores experimentales de la velocidad de crecimiento obtenidos para cada dilución se ajustan notablemente a

la curva teórica para los cultivos semicontinuos.

En las pruebas t (student) hechas, que se muestran en la tabla 4, se comprueba que al comparar los valores experimentales con los valores teóricos para los cultivos continuos existe diferencia significativa en tres diluciones para cada especie, mientras que al comparar los valores experimentales y los valores teóricos para los cultivos semicontinuos, sólo en una dilución de I. galbana hay diferencia significativa. Se resalta entonces que nuestros datos tienen un desajuste con el modelo de los cultivos continuos, este hecho ayuda a confirmar que para el tratamiento de los datos es necesario desarrollar un modelo que explique realmente el comportamiento de los cultivos semicontinuos.

VII. CONCLUSIONES

El sistema de cultivo utilizado alcanzó una eficiente y segura producción para lo cual fue designado.

El trabajar en un proceso de cultivo semicontinuo implica una menor sofisticación en los aparatos usados y una mejor utilización del espacio disponible en comparación con los sistemas de cultivo continuo.

La dilución óptima para la máxima producción obtenida para Isochrysis galbana fue de 0.38 y para Tetraselmis suecica fue de 0.46.

A partir de las diluciones obtenidas para cada especie se pudo programar la producción de microalgas para alimentar larvas y adultos de Mytilus californianus.

VIII. RECOMENDACIONES

1.- Para trabajos de producción de fitoplancton a una escala mayor es recomendable incrementar el área del laboratorio de tal manera que permita una manipulación más adecuada. → seguro?

2.- Se recomienda que la esterilización del agua de mar para la preparación del medio de cultivo sea por medio de rayos Ultra Violetas y además se haga pasar el agua por filtros de membrana de 0.2μ .

3.- Para el llenado diario de un número grande de bolsas con medio de cultivo fresco, se sugiere que exista una red de distribución que lleve el medio a cada bolsa y de esta manera sea más eficiente todo el sistema.

4.- Para trabajos a una escala mayor es necesario incrementar la capacidad del compresor para asegurar una mejor homogenización de las bolsas de cultivo.

5.- Para investigaciones similares a ésta sería recomendable la adquisición de una planta eléctrica para asegurar el control de los parámetros físicos (temperatura, luz y areación) que determinan el crecimiento de los cultivos.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Baynes, S.M. and Emerson, L.A.P., 1979. Production of algae for use in -
the rearing of larvae fish. Res. Tech. Rep. MAFF. Direct. Fish. Res.,
Lovestoft, N 53, Part 3, pp. 13-18.
- Breese, W.P. and Malouf, R.E., 1974. Hatchery manual for the Pacific - -
Oyster. Oregon State University, Sea Grant College Program. Publ. - -
ORESU-4-75-002. Agric. Exp. Station. Special Report N 443.
- Brown, E.J. and Harris, H.F. 1978. Kinetic of phosphate uptake by aquatic
microorganism: Desviation from a simple Michaelis-Menten. Limnol. Ocea-
nogr. 23(1): 26-34.
- Cáceres Martínez C., 1979. Cultivo continuo de la microalga Monochrysis-
lutheri bajo condiciones rudimentarias. Ensenada B. C. Unidad de Cien-
cias Marinas. Tesis 51 pp.
- Canzonier, W.J. and Brunetti, R. 1975. Low-cost continuous algal culture -
system. En: 10 th European Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium.
- Caperon, J. 1968. Population growth response of Isochrysis galbana to ni-
trate variation at limiting concentrations. Ecology 49:866-872.
- Carpenter, E.J. 1968. A simple, inexpensive algal chemostat. Limnol. - -
Ocenogr. 13: 720-721.
- Droop, M.R. 1966. Vitamin B₁₂ an marine ecology. III An experiment with -

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. 3 B. London: Academic Press, P. 269-313.

Droop, M.R. 1975 b. The chemostat in mariculture. En: 10 th European Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, 1: 17-23.

Elsworth, R. 1969. Treatment of process air for deep culture. Methods in Microbiology : Vol. 1. London: Academic. Press, P. 123-236.

Eppley, R. W. and Strickland, J.D.H. 1968. Kinetics of marine phytoplankton growth. Adv. Microbiol. Sea 14: 601-622.

Fencel, L. 1966. Theoretical analysis of continuous culture systems. Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms, P. 69-153.

Goldman, E. J. and Harris, R. F. 1978. Kinetic of phosphate uptake by aquatic microorganism: Desviation from a simple Michaelis-Menten equation. Limnol-Oceanogr. 23(1): 26-34.

Guillard, R. R. L. 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of 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. 181-194.

- Hamilton, R. D. 1973. Sterilization. Handbook of phycological methods. - London: Cambridge U. Press, p. 181-194.
- Helm, M. M. 1977. Mixed algal feeding of Ostrea edulis larvae with Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 57: - 1019-1029.
- Helm, M. M., Laing, I. and Jones, E. 1979. The development of a 200 l - algal culture vessel at Conwy. Fish. Res. Tech. Rep., Maff. Direct. - Fish. Res., Lowestoff, 53 (I): 1-7.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. Handbook of phycological methods. London: cambridge U. Press, p. 255-266.
- Kubitschek, Herbet E. 1970. Introduction to research with continuous cul-
ture. New Jersey: Prentice- Hall, 103 p.
- Laing, I. and M.M. Helm. 1981. Factors affecting the semicontinuous pro-
duction of Tetraselmis suecica (Kylin) Butch in 200 l vessels. Aqua--
culture. 22: 137-148.
- Loosanoff, V.L. and Davis, H. C. 1963. Rearing of bivalve molluscs. Ad--
vances in Marine Biology. 1:136.
- Monod, J. 1950. La technique de culture continue; théorie et applications.
Ann. Inst. Pasteur 79, 390-410.
- ✓ Myer, S. J. and Clark. 1944. Culture conditions and the development of -
the photosynthetic mechanism. II. An apparatus for continuous culture
of Chlorella. J. Gen. Phycol. 28: 103-112.
- ✓ Palmer, F., Ballard, K. and taub, F. A. 1975. A continuous culture appa-

ratus for mass production of algal. *Aquaculture*, 6: 319-331.

Persoone, G. and Sorgeloos, P. 1975. Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. I. - Devices and methods. *Aquaculture*. 6: 275-289.

Sokal, R. and Rohlf, F. 1969. *Biometry. The principles and practice of - statistics in biology research.* Freeman Company, San Francisco pp 757.

Taub, F. B. and 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. natn. Shellfish. Ass.* 64: 150.

Trotta, P. 1981. A simple e inexpensive system for continuous monoxenic-mass culture of marine microalgae. *Aquaculture*. 22: 383-387.

Ukeles, R. 1973. Continuous culture- A method for production of unicellular algal foods. p. 233-254. In: *Handbook of phycological methods.* - Stein, J. R. Ced. Cambridge Univ. Press. London, New York. 348 p.

Ukeles, R. 1976. Cultivation of plants : Unicellular plants *Marine Ecology*, Vol. III, Part 1. Londond : Wiley, p 367-466.

Walne, P. R. 1966. Experiments in large-scale culture of larvae of Ostrea edulis. L. *Fishery Invest.*, Lond., Ser. 2, 25(4), 53 pp.

Walne, P. R. 1974. *Culture of Bivalve Mollusc, 50 years experience at - Conwy.* Fishing News (Books), West Byfleet, 173 pp.

Wilson, J. H. 1979. Observations on the grazing rates and growth of Os-

trea edulis L. larval when fed algal cultures of different ages. J.-
exp. Mar. Biol. Ecol., 138: 187-199.

Williams, F. M. 1971. Dynamics of microbial populations en: Systems ana
lysis and simulation in Ecology. New York Academic Press. 197-265.

Young, L. C. 1941. On randomness in ordered sequences Ann. Math. Statist.
12, 293.