

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“ALTERNATIVAS EN EL CULTIVO DE MICROALGAS”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

ACUICULTORA

Presentado por:

Annabel Mireya González Reyes

GUAYAQUIL – ECUADOR

2000

AGRADECIMIENTO

A mis padres Porfirio González y Jesús María Reyes, a quienes amo y quiero mucho, por lo que doy gracias a Dios por mantenerlos con vida. Ellos quienes me apoyaron incondicionalmente en el transcurso de mi vida.

A mis hermanos y sobrinos por estar siempre apoyándome y levantarme el animo en tiempos difíciles.

A Dr. Jorge Calderón V., Director del CENAIM, por haber hecho posible la realización de la Tesis en dicha Institución, gracias por haber creído en mí.

A Acui. Henry Alvarez, Director de Tesis, por guiarme en la elaboración de la tesis y manuscrito de la misma.

A mis profesores de aquella época: Dr Nicolás Campaña, Dr. Roberto Jiménez , Acui. Henry Alvarez, Ing. Ecuador Marcillo, etc, quienes supieron transmitir todos sus conocimientos y experiencia profesional.

A MSc. Jerry Landívar, a quien estimo y admiro, gracias por ayudarme en el análisis estadístico y elaboración de la Tesis, sin tí no lo hubiera logrado.

A mis grandes amigas Angela Bazurto y Liliana Posligua por ayudarme en la traducción de las publicaciones.

DEDICATORIA

A Dios, Ser Supremo que me brinda la oportunidad de tener aún con vida a mis padres.

A mis viejos como los llamo, esos dos seres maravillosos que amo y quiero mucho, a quienes admiro por su orientación a la vida, amor, comprensión, dedicación y poder de sacrificio, quienes me dieron la mejor herencia que un hijo puede recibir y ver hecho realidad sus anhelos de verme formado una profesional .

A mis hermanos por sus consejos, orientación y apoyo moral.

DECLARACION EXPRESA

La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, corresponden exclusivamente a su autor, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado corresponderá a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.

Annabel Mireya González Reyes

Ing. Bolívar Vaca R.
Presidente del Tribunal

Ac. Henry Alvarez A.
Director de tesis

M.Sc. Jerry Landívar Z.
Miembro Principal

M.Sc. Ecuador Marcillo G.
Miembro Principal

RESUMEN

Con el propósito de encontrar fertilizantes de bajo costo para el desarrollo de los cultivos de algas unicelulares como *Tetraselmis maculata*, *Isocochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, empleadas en la alimentación de larvas de camarón del género *Liptopenaeidos* se ensaya la utilización de fertilizantes inorgánicos como nitrato de amonio, triple superfosfato y fertilizante foliar blauckorn comparados con la fórmula del tradicional medio Guillard f/2 de alto costo en forma individual y comparar otro tratamiento de desinfección del agua que reduzca el número de bacterias en el tratamiento del agua para el cultivo de las microalgas.

Se establece una comparación del crecimiento en los tratamientos con fertilizantes, siguiendo el aumento progresivo de los cultivos hasta 20 l, en donde comienza el ensayo utilizando el sistema batch, con la diatomea *Chaetoceros gracilis* y los flagelados *Tetraselmis maculata* e *Isocochrysis galbana*, utilizando el mejor tratamiento de agua. De los diferentes tratamientos de fertilización probados se obtuvo el mejor crecimiento para la especie *Chaetoceros gracilis*, con la adición de nitrato de amonio, para *Tetraselmis maculata* fue con adición de Triplesuperfosfato y para *Isocochrysis galbana* con Blauckorn, siendo beneficioso utilizar cualquiera de ellos.

En el tratamiento de desinfección del agua empleando el hipoclorito de sodio para la cloración del agua (cloro líquido) y acidificación del agua utilizando ácido muriático no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$), siendo ambos tratamientos buenos para ser utilizados y obtener el éxito del cultivo de microalgas.

INDICE

	Página
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I.- ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE ALGAS.	3
1.1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS MICROALGAS	3
1.1.1.- Morfología de las microalgas.....	4
1.1.2.- Reproducción	7
1.2.- DEMANDAS DE DESARROLLO	8
1.2.1.- Funciones de los elementos esenciales.....	8
1.2.2. - Formas de cultivo	10
1.2.3.- AISLAMIENTO DE LAS MICROALGAS	13
1) Técnica de diluciones seriadas.....	13
2) Técnica de la micropipeta	15
3) Técnica del agar	16
a) Rayado paralelo en placas de agar.....	17
b) Rayado en zig-zag.....	18
c) Rayado en agar inclinado	19
d) Rociado en placas.....	20
1.3.- CRECIMIENTO DE LAS ALGAS	21
1.3.1.- Fases de Crecimiento.....	21
1.3.2. - Factores que influyen sobre el cultivo	23
Luz	23
Temperatura	27
pH	28
Salinidad	29
Agitación	30
Evaporación y Precipitación	32
Tamaño de inóculo y densidad de población óptima	33
Nutrientes	33
Medios de cultivo	34
CAPITULO II .- AGENTE ANTIMICROBIANO	36
2.1.- DESINFECTANTES	36
2.1.1.- Dinámica de la desinfección	37
2.2.- CARACTERISTICAS DE UN DESINFECTANTE IDEAL	38
2.2.1.- Actividad microbiana	38
2.2.2.- Solubilidad	38
2.2.3.- Estabilidad	38
2.2.4.- Toxicidad	38
2.2.5.- Homogeneidad	38
2.2.6.- Compatibilidad	38
2.2.7.- Efectividad	38
2.2.8.- Disponibilidad	38

	Página
2.3.- CONDICIONES QUE INFLUYEN EN LA ACCION ANTIMICROBIAL	39
2.3.1.- Concentración o intensidad de los agentes microbiales	39
2.3.2.- Temperatura	39
2.3.3.- Especies de microorganismos.....	39
2.3.4.- Presencia de materia orgánica	39
2.3.5.- Acidez o alcalinidad	40
2.4.- EL CLORO	40
2.5. - ACIDO CLORHÍDRICO.....	41
CAPITULO III.- METODOLOGIA	43
3.1. - SELECCION DE EQUIPOS A UTILIZAR	43
3.1.1. – METODOLOGIA	45
a) Primera Etapa del Ensayo	45
b) Segunda Etapa del Ensayo	47
3.2.- RUTINA DE CULTIVO	51
3.2.1.- Mantenimiento de las cepas	51
a.- Tubos de Cepas	51
b.- Tubos de Producción	52
c.- Fiolas y Botellones (500, 1.000 , 2.000 ml y 10 L)	52
d.- Carboys , Cilindros (50, 500, 2.000 L)	53
3.3.- FORMULAS	54
Uso del Hemocitómetro	55
CAPITULO IV.- ANALISIS ESTADISTICO	58
4.1.- RESULTADOS	58
4.2.- ANALISIS ECONOMICO	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
ANEXOS	68
BIBLIOGRAFIA	72

INTRODUCCION

Desde el inicio del cultivo de camarón en hatchery, la producción de microalgas como alimento ha sido un aspecto fundamental para el éxito del mismo por lo que varias especies y sistemas de cultivo de microalgas han sido usadas hasta obtener aquella que proporcionaría una calidad nutricional, condiciones de cultivo aceptables y sencillas en su aplicación.

Muchas fueron las especies de microalgas probadas en el cultivo de los liptopenaeidos limitándonos a nombrar a algunas de ellas: *Skeletonema costatum* (Hudinaga, 1942; Hudinaga y Kiittaka, 1967; Liao, 1970; Liao y Huang, 1973), *Chaetoceros gracilis* (Simón 1978), *Tetraselmis sp* (Mock y Neal, 1974), *Isochrysis galbana* (Acuacop, 1983), *Chaetoceros calcitrans* (Seafdec, 1975), entre otras.

Estas especies de microalgas usadas en laboratorios de cultivos de larvas de camarones no solamente deben presentar una buena calidad nutricional y gran adaptabilidad a los sistemas de cultivos; además se busca que estos últimos sean económicos tanto en cultivos primarios como en masivos y mucho más en estos últimos donde el gasto en fertilizantes es mayor, logrando esa economía al utilizar como nutrientes, fertilizantes inorgánicos, orgánicos y foliares.

Se puede economizar mucho más si encontramos un producto que reúna a todos los componentes esenciales y microelementos en uno solo, en las proporciones y dosis adecuadas, similares a los medios de fertilización convencionales como Guillard y Walne.

Es por esta razón que el presente trabajo tiene por objeto realizar experiencias en el cultivo de microalgas con fertilizantes inorgánicos como el triple superfosfato, nitrato de amonio y fertilizante foliar Blaukorn.

El trabajo también busca comparar tratamiento de desinfección del agua con hipoclorito de sodio y ácido muriático.

CAPITULO I.- ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE ALGAS

1.1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS MICROALGAS

Las algas tienen una larga historia de fósiles, algunos de ellos posiblemente extendiéndose hasta el origen de las plantas celulares fotosintéticas, consideradas generalmente como el grupo a partir del cual se originaron plantas más complejas. Morfológicamente (forma y estructura) son plantas celulares que crecen como células individuales o agregaciones, aunque éstas son relativamente indiferenciales en órganos y solamente en los géneros más complejos se encuentran tejidos conductores. Sin embargo la gama de formas y color es vasta, desde células diminutas, de unos cuantos micrómetros en diámetro, hasta las grandes algas marinas del Antártico (Treece & Yates, 1993).

Normalmente o preferentemente las algas habitan los ambientes húmedos, en la tierra, aire, mar, lagunas, hielo y nieve. Ocupan las capas más superficiales, hasta los niveles donde hay penetración de luz solar. Su función dentro de la naturaleza destaca por su rol de formar parte del primer eslabón dentro de la cadena trófica.

Las algas que contienen clorofila como pigmento fotosintético, producen oxígeno como un derivado de la fotosíntesis. Las divisiones están definidas en base a dos tipos de propiedades bioquímicas: a) el tipo de pigmento y, b) la reserva alimenticia. Sobre la base de estas características parece que las algas procarióticas dan origen a las formas eucarióticas. Cada división se caracteriza por su propia distribución de pigmento, además de la presencia de clorofila a (Krueger et al., 1973).

1.1.1.- Morfología de las microalgas

En cuanto a su morfología la célula posee paredes ligeramente rígidas y pueden también presentar láminas que cubren la parte exterior de las paredes.

Los organelos que contiene pigmentos de las clorofíceas y euglenofíceas son llamados cloroplastos, un nombre que indica que su color típicamente predominante es el verde. Otros organelos pigmentados de las algas se los conoce como cromatóforos; estas células poseen sistemas enzimáticos relacionados con la fotosíntesis (Alexopoulos, 1967). por ejemplo:

Chaetoceros gracilis.- Es una diatomea marina céntrica de vida solitaria, de forma rectangular, midiendo de 4 a 6 micras sin incluir las setas. Se caracteriza porque su pared celular esta compuesta de sílice, la que se denomina frústula, compuesta de dos

valvas (conchas) las cuales se separan para formar células nuevas durante la división vegetativa (Trecece & Yates, 1993). (fig. # 1).

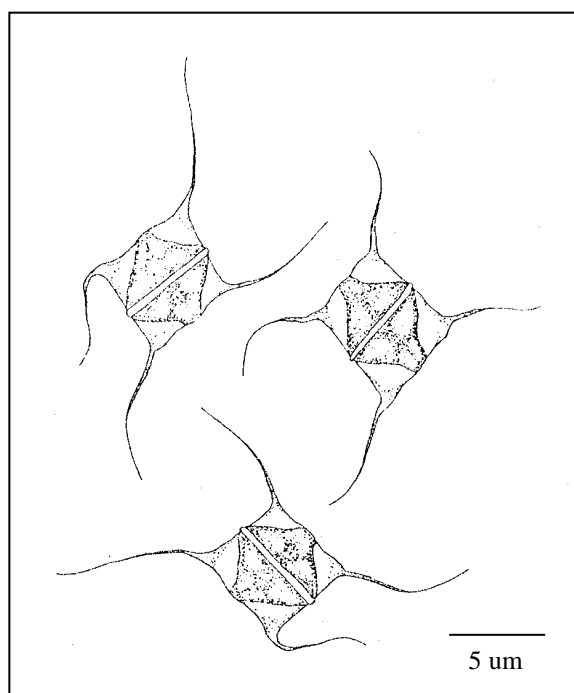


Figura #1.- *Chaetoceros sp.*

La mayoría de las especies de *Chaetocero* se caracterizan por tolerar altas temperaturas, siendo la temperatura máxima de crecimiento 37 °C, con crecimiento óptimo entre 25 °C y 35°C. La salinidad mínima para su crecimiento es 6 ups, pero puede crecer bien en salinidad de hasta 50 ups con crecimiento óptimo entre 17 y 25 ups.

Tetraselmis sp.- Es un alga comprimida elipsoidal, con 4 flagelos, el extremo posterior agudo y el extremo anterior de 4 lóbulos. Mide de 10 - 15 micras, tiene un color verde brillante. Es una especie eurihalina, con capacidad de formar esporas cuyos límites de tolerancia a variables físicas son muy amplias. Tiene una pared celular formada principalmente de carbohidratos (Pandilla, 1975 en: Paniagua & Granados, 1998), a lo

que Epifanio, 1979 en: Paniagua & Granados, 1998; atribuye su lenta digestibilidad al compararla con *Isochrysis galbana*; considerada como el alga menos nutritiva (Enright, 1984 en: Uribe, 1994). Crecen en el exterior a temperatura de 18 °C y 22 °C, con salinidad de 25 - 30 ups. (fig. # 2).

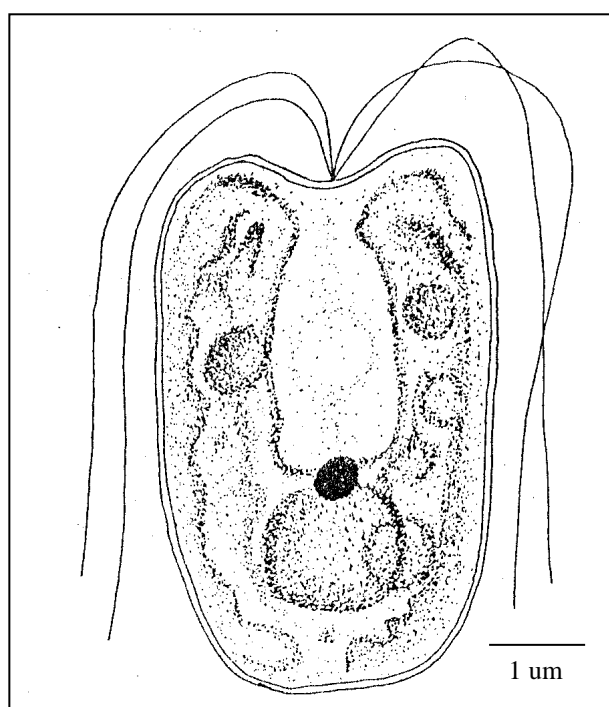


Figura # 2.- *Tetraselmis sp.*

Isochrysis galbana.- Es un flagelo en forma de esfera o pera, de color marrón de envoltura celular fina, que habita en climas templados con dos flagelos móviles. Mide de 3 - 5 micras. Cuando la densidad aumenta, el cultivo cambia de dorado-amarillento a café marrón. No tan solo tolera cambios ambientales sino que parece suprimir selectivamente el crecimiento de contaminantes indeseables (bacteria), su crecimiento máximo se encuentra a una temperatura que varía de 16-20 °C, a una salinidad de 25 - 28 ups (Flassch. 1978). Debido a su tamaño y a que es un flagelado desnudo es

fácilmente digerible por los consumidores. Su alto valor nutritivo le sitúa entre las especies más importantes para la alimentación de bivalvos marinos (Laing y Utting, 1980; Fabregas et. all., 1985; Romberger y Epifanio, 1981 en: Paniagua & Granados, 1989). (fig. # 3).

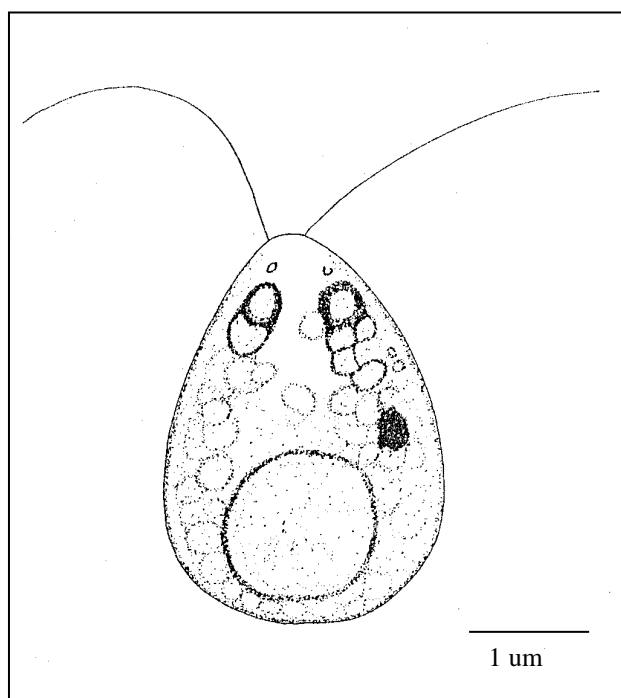


Figura # 3.- *Isochrysis galbana*

1.1.2.- Reproducción

En muchas ocasiones la reproducción de las algas ocurre sin ningún cambio en su ploidía, es decir son asexuales. Los mecanismos asexuales incluyen fisión, esporulación y liberación de fragmentos nucleados en formas multicelulares. La fisión es comúnmente binaria y ocurre dentro de la pared celular parenteral, si esta se encuentra presente. En otros tipos, la pared original es descartada y cada uno de los progenitores construye una pared antes o después de liberarse de la pared de la célula madre. En

otros tipos, especialmente en ciertas diatomeas y ciertos dinoflagelados, la pared original es repartida por el progenitor y cada nuevo individuo construye la porción faltante. Los procesos sexuales no han sido reportados para algas procarióticas (Cyanofíceas) contrariamente a lo ocurrido con las algas eucarióticas y Euglenofíceas, Crysofíceas o Cryptofíceas. (Fritsch, 1952; fig. # 4).

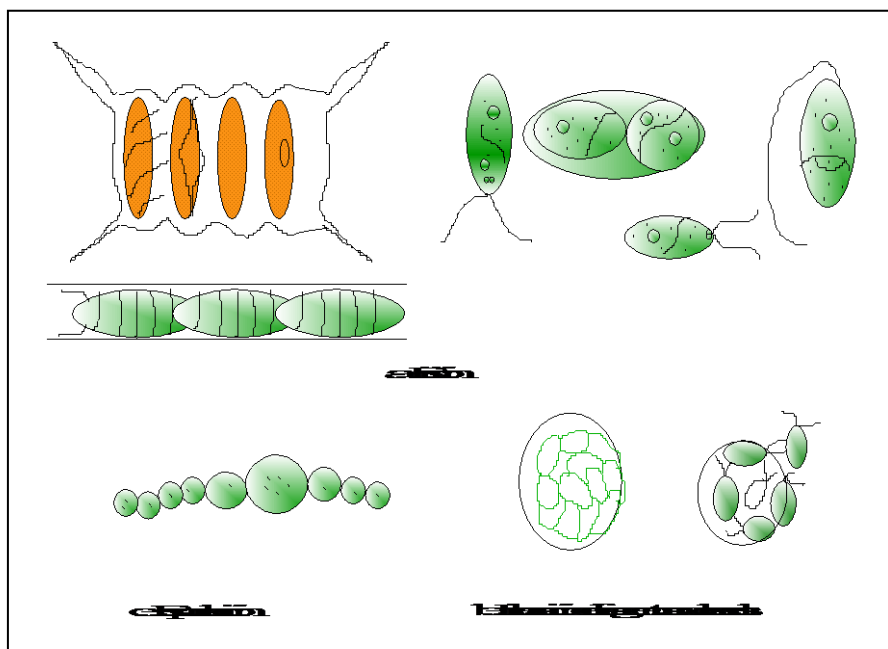


Figura #4.- Reproducción asexual de las microalgas

1.2.- DEMANDAS DE DESARROLLO

1.2.1.- Funciones de los elementos esenciales.-

Nitrógeno.- Forma parte de un gran número de compuestos orgánicos necesarios, aminoácidos, proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos y clorofila.

Fósforo.- Forma parte de compuestos orgánicos importantes como la glucosa, ATP, ácido nucleicos, fosfolípidos y ciertas coenzimas.

Azufre.- Está incorporado dentro de diversos compuestos orgánicos que incluyen aminoácidos, proteínas, coenzima A y las vitaminas Tiamina y Biotina.

Magnesio.- Es parte esencial de la molécula de clorofila y es necesario para la actividad de muchas coenzimas, incluyendo aquellos pasos importantes en la actuación del ATP, así mismo es esencial para mantener la estructura del ribosoma.

Calcio.- Influye en la permeabilidad de la membrana, se encuentra en las vacuolas, precipitado como cristales de oxalato cálcico o pectato cálcico en las paredes de las células. Algunas veces interfiere la capa de magnesio para activar la enzima.

Hierro.- Es necesario para síntesis de clorofila, es parte esencial del citocromo el cual actúa como portador de electrones para la fotosíntesis y en la respiración. .

Cloro.- Necesario para la fotosíntesis, donde activa enzimas para la producción de oxígeno a partir del agua se suponen otras acciones adicionales.

Manganeso.- Activa una o más enzimas en la síntesis de ácidos grasos así como es la enzima responsable de la formación del ARN y del ADN. Participa en la producción de oxígeno a partir del agua.

Cobre.- Actúa como portador de electrones y es parte de alguna enzima. Puede formar parte en la fijación del nitrógeno.

Molibdeno.- Actúa como portador de electrones en la conversión del NH_4 a NO_3 y es esencial para la fijación del nitrógeno.

Carbono, Hidrógeno, Oxígeno.- Son parte de todos los compuestos orgánicos.

1.2.2. - Formas de cultivo

El desarrollo de un método de cultivo de microalgas, depende de los requerimientos y exigencia de la calidad de los elementos mencionados en las diversas etapas en las que deben ser suministrados.

Según su naturaleza, los cultivos pueden clasificarse de diversos modos:

Cultivos Intensivos.- Son aquellos cultivos en que los factores del crecimiento se mantienen completamente bajo control, de modo tal que obtiene una máxima respuesta en la producción de la población.

Cultivos Extensivos.- Son aquellos cultivos en que solo se controlan las variables más accesibles en el manejo técnico, tales como las características químicas del medio y la densidad del cultivo, como reguladora de la luz.

Independientemente de estas dos clasificaciones, el método empleado en el cultivo según la forma de cosecharlo, se clasifican en:

Cultivos Discontinuos (BACTH).- En estos cultivos la población va pasando por las distintas fases de crecimiento, ajustándose generalmente a una función

logística (Schanz y Zahle, 1981). Estos produce cambios fisiológicos de la población a medida que transcurre el tiempo de cultivo.

Estos tipos de cultivos tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular. Esta supone la recogida completa del recipiente de cultivo y es la forma más simple de operar, aunque también supone mayor trabajo que otros sistemas. La carga de nutrientes y la luz son proporcionadas al inicio del cultivo, aún cuando pueden realizarse ajustes de luz en las primeras fases del cultivo.

Cultivo Continuo.- Es aquel en que se mantiene la fase exponencial durante largo período de tiempo, así como las características químicas del medio, la temperatura y la luz, son sostenidas en un valor constante. La ventaja de estos cultivos es que muestras tomadas a distintos tiempos son idénticas. Para ello hay que añadir continuamente nutrientes en la misma medida en que son retirados del medio, para mantener los parámetros de crecimiento y población celular a nivel constante.

Para mantener cultivos continuos, todos los factores de crecimiento deben mantenerse constantes. La densidad del cultivo se controla, manteniéndola a concentración constante.

Cultivo Semicontinuo.- Es la combinación de los dos métodos anteriores, en este tipo de cultivo, parte del volumen se recoge para su utilización, generalmente al final de la fase exponencial, y la cantidad que se retira se reemplaza con medio de

cultivo fresco. Se pueden mantener sistemas interiores para la producción de microalgas durante varias semanas utilizando métodos semicontinuos, los cultivos pueden ser cuidadosamente controlados. En sistemas de energía lumínica eficiente se puede recoger 3 veces por semana hasta el 90% del volumen de cultivo a altas concentraciones celulares (Laing, 1991).

Según la pureza del cultivo se clasifican en:

Cultivo Axénicos.- Son cultivos donde la población se mantiene libre de bacteria. Es un tipo de cultivo delicado que requiere de un manejo cuidadoso.

Cultivo Monoespecífico.- Son cultivos en que la población de microalga se encuentra con una pequeña carga bacteriana. Estos son los que más se utilizan industrialmente, debido a que es muy difícil mantener cultivos sin bacteria. En los cultivos unialgales las microalgas crecen mejor que en los axénicos, ya que se produce una interacción beneficiosa entre la bacteria y las microalgas, pues la bacteria excreta vitaminas y otras sustancias al medio que pueden ser utilizadas por las microalgas. No obstante si la carga bacteriana es excesiva puede inhibir el crecimiento algal o bien hacer el cultivo no apto para su utilización.

1.2.3.- AISLAMIENTO DE LAS MICROALGAS

La aplicación de los siguientes métodos para una colecta natural de algas microscópicas producen cultivos monoespecíficos o axénicos (Trujillo, 1997).

Aunque tales métodos son sencillos, la preparación de cultivos axénicos requiere de paciencia y perseverancia.

En el aislamiento existen varias técnicas y modificaciones a éstas, pero en general se dividen en tres grandes categorías:

- 1.- Técnica de diluciones seriadas
- 2.- Técnica de la micropipeta
- 3.- Técnica de aislamiento en agar

1) Técnica de diluciones seriadas (Velasco, 1995).- Esta técnica es selectiva y se emplea para obtener a las especies predominantes y/o más competitivas de una muestra de agua, a su vez, por la misma razón se eliminan fácilmente las menos abundantes, que podrían ser consideradas de escaso interés debido a su crecimiento aparentemente inferior.

La técnica consiste en hacer diluciones progresivamente decrecientes de orden 1:10 a partir de la muestra original. Para este fin, se evalúa primeramente por conteo directo el número de cel/ml de la muestra de agua, haciendo diluciones sucesivas hasta lograr concentraciones teóricas de fracciones de célula en la última dilución.

El procedimiento para diluir la muestra es el siguiente: en el cuarto de inoculaciones se homogeniza la muestra de agua y de aquí se toma 1 ml para inocularlo en uno de los tubos que contiene 9 ml de medio, obteniendo así la dilución 1:10. Utilizar esta dilución y traspasar 1 ml a otro tubo para obtener la dilución 1:100. Repetir sucesivamente la misma técnica para obtener diluciones 1:1.000 y 1:10.000. Este último tubo subdividirlo en 10 tubos finales, inoculando 1 ml en cada tubo, en este caso se obtendrían 10 tubos con una dilución de orden 1:100.000 (fig. # 5).

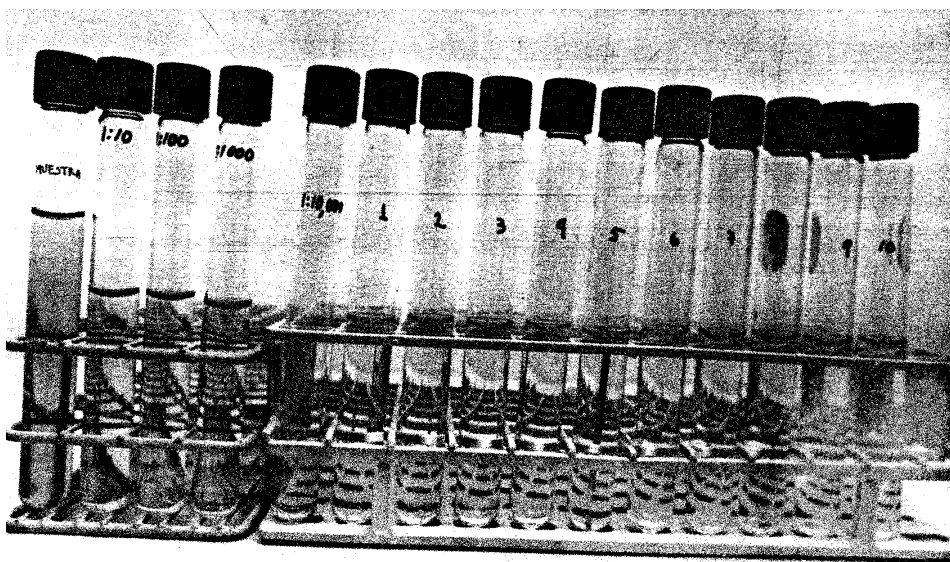


Figura # 5.- Técnica de diluciones seriadas.

2) Técnica de la micropipeta (Trujillo, 1997).- El uso de la micropipeta permite ser selectivo en cuanto a que se aíslan las especies que uno mismo elige. Es la técnica más directa para obtener una cepa monoespecífica. Es la técnica que se utiliza para obtener cultivos clonales, o sea cultivos iniciadores con una sola célula o entidad microalgal.

Cuando no se cuenta con pipetas capilares, una manera de preparar micropipetas es la siguiente: se coloca en la flama de un mechero la parte final de la pipeta Pasteur y con la ayuda de una pinza, ésta se alarga hasta obtener una fina pipeta capilar.

Una vez obtenido un número suficiente de micropipetas, se coloca sobre un porta objeto una gota de medio estéril a la cual se le agrega, con una micropipeta, una pequeña gota de la muestra de agua original. Es recomendable usar la micropipeta una sola vez para cada traspaso, esto es con el objeto de evitar cualquier tipo de contaminación.

Por observación al microscopio se localiza la zona con la menor cantidad de células y se aspira con la micropipeta una pequeña cantidad del líquido para traspasarlo a una nueva gota de medio estéril, “lavando” de esta forma el cultivo y haciéndolo menos denso. Repetir esta misma operación hasta que en toda la gota se vea que existe solo una célula, aspirarla totalmente del portaobjeto y transferirla a un tubo de ensayo con 3 ml de medio de cultivo estéril y colocarlo en condiciones favorables para el cultivo.

La probabilidad de sobrevivencia de esta célula es muy baja, porque las células con pared celular muy frágil pueden dañarse al ser lavadas repetidamente, además de que la célula puede quedar dentro de la micropipeta y no ser inoculada dentro del tubo, de modo que se recomienda romper cuidadosamente la punta de la micropipeta e inocularla también dentro del mismo tubo.(fig. # 6)

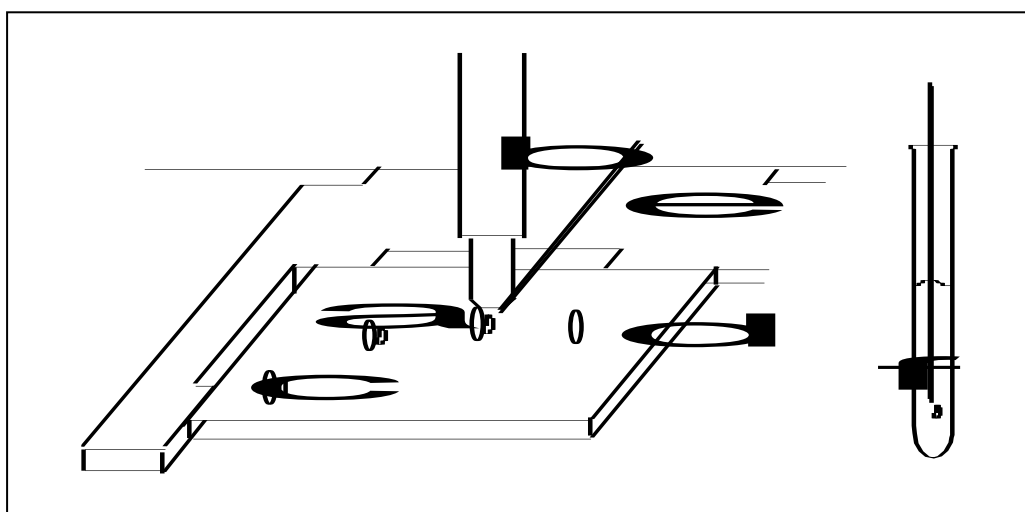


Figura #6.- Aislamiento de microalgas (técnica de la micropipeta). a: portaobjetos; b: objetivo; c: cultivo; d: medio fresco y estéril; e: micropipeta; f: microalga aislada en medio fresco y estéril..

3) Técnica del agar (Trujillo, 1997).- Algunas microalgas se aíslan más fácilmente de otro contaminantes en agar, ya que sólo se promueve el crecimiento de las especies que son capaces de crecer en este tipo de medios. Al utilizar modificaciones con esta técnica (rayado o rociado), se podrán obtener cultivos monoespecíficos sobre todo en las partes finales (rayado) o en las zonas donde las gotitas de agua sean más pequeñas y se encuentren más dispersas (rociado).

El agar debe dispersarse uniformemente sobre la superficie del agua y dejarse embeber unos minutos para facilitar que entre en solución. Se recomienda usar agar al 2% (20 g de agar por cada litro de agua de mar).

Se esteriliza en autoclave, se retira y se deja enfriar hasta aproximadamente 50°C. Dentro del cuarto de inoculación, se mezcla perfectamente antes de verterlo en el caso de placa debe cubrir aproximadamente 2/3 del alto de éstas. Cerrar parcialmente las cajas para dejar salir el exceso de vapor de agua. Tapar las cajas una vez que el agar solidifique a temperatura ambiente. Estas deben conservarse invertidas en refrigeración.

En el caso de tubos traspasar 10 ó 20 ml de la solución de agar ya mezclada (según la capacidad del tubo), para esterilizarlos dejar la rosca sin ajustar por lo menos media vuelta para permitir un adecuado ajuste de presiones en la autoclave. Cerrar herméticamente las roscas después de la esterilización. Colocar los tubos sobre una superficie inclinada y permitir que solidifique el agar en esa posición. Mantener posteriormente los tubos en refrigeración.

a) **Rayado paralelo en placas de agar** (Trujillo, 1997).- Esta técnica se usa cuando la muestra de agua contiene gran variedad de especies. Esterilizar el asa al rojo y esperar a que enfríe. Homogeneizar la muestra de agua original y tomar una asada. Levantar parcialmente la tapa de la caja petri y empezar por descargar el asa en uno de sus extremos para hacer rayados paralelos sobre la superficie del agar, diluyendo de esta forma la muestra (fig. # 7). Los puntos negros son los lugares de donde se toma muestra para hacer los siguientes rayados. Cubrir, invertir, e inocular las cajas en condiciones favorables para su crecimiento.

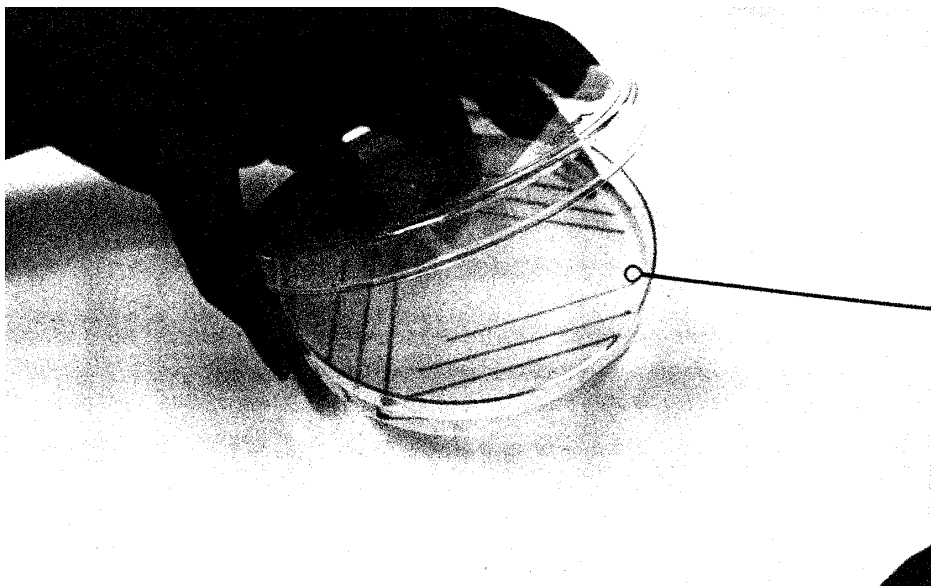


Figura # 7.- Rayado paralelo.

- b) **Rayado en zig-zag** (Trujillo, 1997).- Puede usarse esta técnica cuando la muestra de agua cuente con pocas especies mezcladas. Esterilizar el asa al rojo y homogeneizar la muestra. Levantar parcialmente la tapa de la caja petri, el punto negro en la figura 8, indica el lugar en donde se descarga el asa e inicia la serie de zig-zag por toda la superficie del agar. Las cajas se cubren, invierten e incuban en condiciones favorables para su cultivo.



Figura # 8.- Rayado en zig-zag.

c) **Rayado en agar inclinado** (Trujillo, 1997).- En la práctica se ha visto que, a diferencia de una caja petri, el uso de agares en tubo garantiza trabajar en condiciones asépticas. Esto es debido a que existe un mayor control sobre un cultivo inoculado en un tubo con tapa rosca, puesto que éste puede mantenerse totalmente cerrado, evitando de esta forma tanto el paso de otros contaminantes como que el agar se reseque a medida que pasa el tiempo. Esterilizar el asa y homogeneizar la muestra de agua. Descargar el asa en el fondo del tubo donde inicia la superficie del agar y trazar un zig-zag a todo lo largo de la superficie como se muestra en la figura # 9. Flamear la boquilla del tubo antes de cerrarlo. Los tubos se colocan en una gradilla e incuban en condiciones favorables para su cultivo.

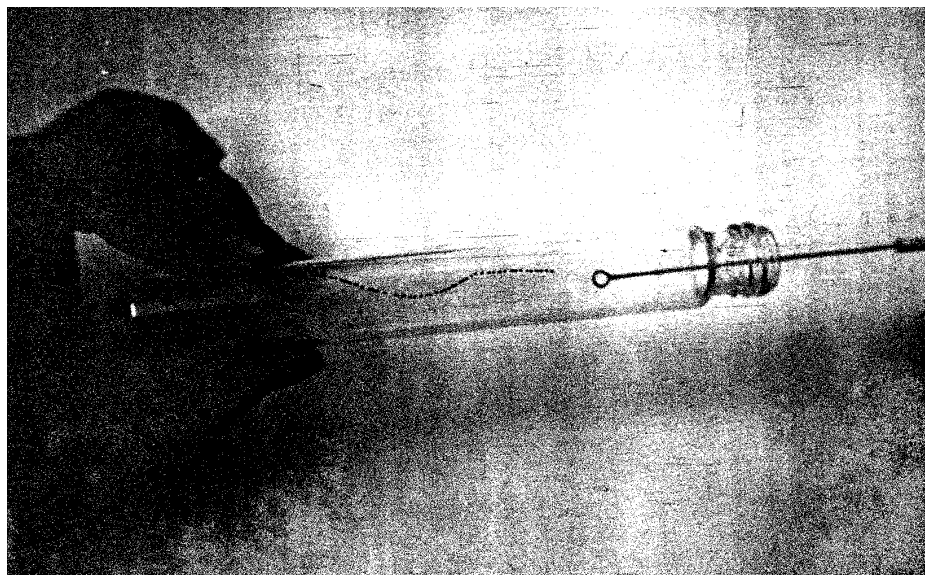


Figura # 9.- Rayado en agar invertido.

d) Rociado en placas (Trujillo, 1997).- Es similar a las anteriores, solo que en este caso la muestra de agua se rocía sobre la superficie del agar. Se prepara al mechero una micropipeta y se adhiere a una mesa. La parte final de ésta no debe de quedar en contacto con la mesa (fig. #10). Se hace pasar a través de la micropipeta una fuente de aire filtrado. Colocar la superficie de una placa de agar perpendicular a la micropipeta y con una pipeta pasteur, se deja caer la gota de la muestra de agua original sobre la fuente de aire para que ésta pueda esparcirse sobre la superficie del agar. Para separar aún más las gotitas de agua puede variarse el diámetro de la micropipeta y la velocidad del aire que pasa a través de ella. Cubrir, invertir e inocular en condiciones favorables de cultivo.

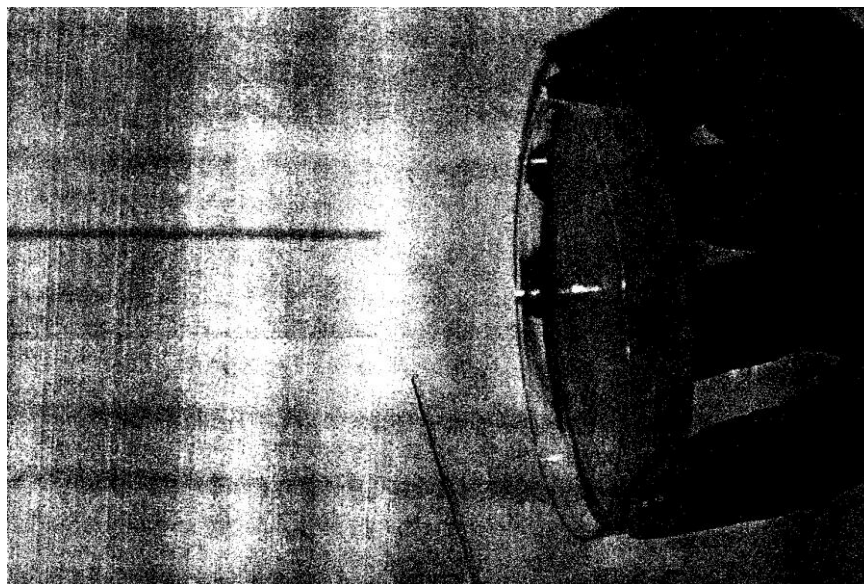


Figura # 10.- Rociado en placas.

1.3.- CRECIMIENTO DE LAS ALGAS

1.3.1.- Fases de Crecimiento.

Son cinco las fases de crecimiento en un cultivo típico de microalgas. En las que se definen por el número de células presentes a un tiempo (edad) determinado y por las condiciones generales del cultivo (Hoff & Snell, 1989 en: Uribe, 1994; fig. # 11).

- a) **Fase de latencia o fase inicial.**- En esta fase es poco el incremento o densidad celular, es una fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones de medio. Muchas enzima metabólicas llegan ser inactivas y las concentraciones de materiales celulares caen a niveles que afectan la división de la célula, antes de reanudar el crecimiento a las algas les toma un corto período de tiempo aclimatarse a su medio acuático. Otro factor que contribuye a la fase inicial, es el requerimiento de alcanzar los niveles máximos de compuestos específicos antes de que la fase exponencial comience. Altas concentraciones de calcio, magnesio o fósforo pueden extender la fase de latencia. Esta fase se puede dilatar entre 1 a 3 días, dependiendo del tamaño y del estado del inóculo.
- b) **Fase exponencial o desarrollo logarítmico.**- En esta fase la división celular se incrementa en función del tiempo. El incremento de la población existente es debido a que las células están asimilando los nutrientes en el medio y su proceso de reproducción asexual es activo. La fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta 4 días. Si se controla la dilución del cultivo ésta etapa puede prolongarse por semanas.

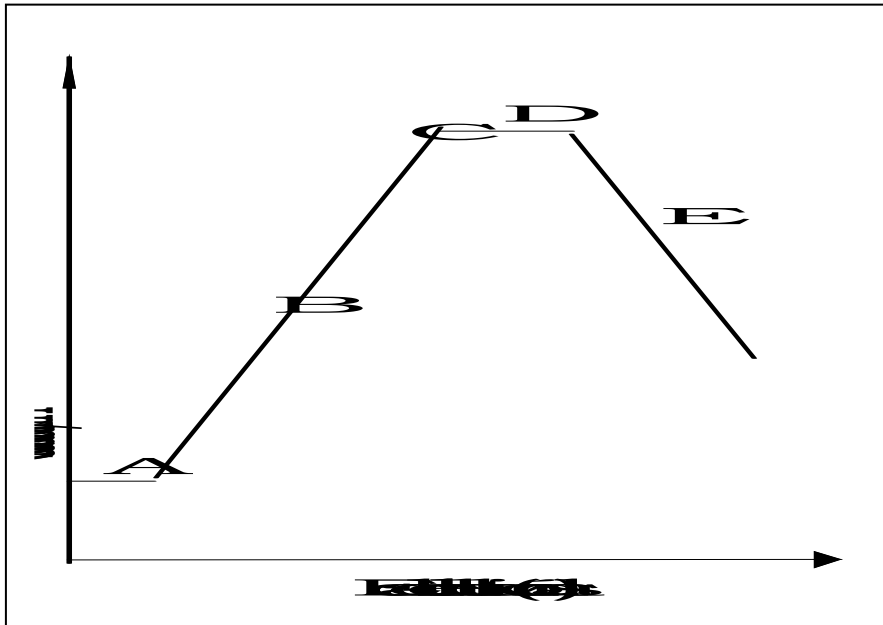


Figura # 11.- Fases de crecimiento en cultivo de microalgas. A: fase de inducción o retraso del crecimiento; B: fase exponencial; C: fase de declinación relativo del crecimiento; D: fase estacionaria; E: fase de muerte.

- c) **Fase de declinación de la fase exponencial.**- La división celular es lenta cuando los nutrientes han sido consumidos y su carencia limita el crecimiento. Puede durar de uno a dos días en que la edad del cultivo alcanza su valor máximo.
- d) **Fase estacionaria.**- En esta fase el factor limitante (carencia de nutrientes) y tasa de crecimiento está balanceados, es decir que las densidades celulares se mantienen relativamente constantes por un período relativamente prolongados. Esta fase es muy corta en grupos de cultivos donde los nutrientes son consumidos y no reemplazados.

- e) **Fase de declinación o muerte.**- Durante esta fase las células sufren la completa limitación por escasez de nutrientes, la densidad celular comienza a fenecer rápidamente liberando azúcares, proteínas, lípidos los cuales son aprovechados en algunos casos por bacteria oportunistas que se alimentan de ella desplazando a la población que aun se mantiene viva, pero que rápidamente colapsa.

1.3.2. - Factores que influyen sobre el cultivo

Luz.- La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalga, tanto para sí misma como por sus interrelaciones con otros parámetros. Representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperíodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgales (Lips y Avissar, 1986 en: Abalde et al.,1995).

- a) **Intensidad.**- Se necesita de una cierta intensidad de luz para que se realice la fotosíntesis. La tasa de fotosíntesis aumenta con la intensidad luminosa, alcanzándose el nivel de saturación a intensidades variables en función de la especie, después de lo cual la intensidad se hace limitante, provoca la disminución de la tasa fotosintética y, por tanto, del crecimiento. Una célula que se encuentre en condiciones limitadas de luz crecerá lentamente, pero hará que la mayor parte de la energía luminosa sea asequible al producir un sistema más eficiente de captura de luz. La adaptación a bajas intensidades implica un incremento de dos a diez veces el contenido de clorofila por célula, a una intensidad de saturación menor y una pendiente inicial más pronunciada. Aunque las células adaptadas a intensidades son

más eficientes para absorber la energía luminosa, el rendimiento del quantum permanece constante, lo cual sugiere que no pueden utilizar la luz absorbida con mayor eficiencia. Si la intensidad de la luz es alta, existe suficiente luz, el crecimiento celular es limitado más bien por la tasa de fijación de carbono, que a su vez depende del metabolismo de la célula. Así las células expuestas a intensidades altas de luz utilizan menos recursos propios para la síntesis de clorofila y más para la carboxilasa y quizás otra enzima de las reacciones oscuras.

- b) Fotoinhibición.-** Las intensidades de luz muy elevadas con frecuencia son inhibitorias para el crecimiento microalgal, produciendo fotoinhibición. La fotoinhibición o fotoinactivación puede definirse como el descenso de la capacidad fotosintética a elevadas intensidades de luz, implicando la fotodestrucción de pigmentos fotosintéticos. Esto se, manifiesta como un "bleaching" de pigmentos dependiente del oxígeno y de la luz, definido por Powles (1984 en: Abalde et al,1995) como fotooxidación, la que a intensidades elevadas de luz tiene efectos letales sobre las células y puede producir la pérdida total de un cultivo. La fotoinhibición depende de la intensidad y calidad (longitud de onda) de la luz, así como el tiempo de exposición, siendo más pronunciada con exposiciones prolongadas a intensidades altas de luz. Los efectos dañinos de la iluminación pueden ser intensificados por otros factores, como deficiencia de nutrientes o temperaturas extremas.
- c) Fotoperíodo.-** En condiciones normales las microalgas están sometidas a períodos de luz/oscuridad y esta alternativa generalmente se utiliza en su cultivo.

Muchos aspectos de la fisiología microalgal fluctúan en un ciclo de 24 horas, esta periodicidad según Sournia, 1974 en: Abalde et al., 1995) se observa en:

División celular: en muchas especies la mayoría de las células se dividen en un momento determinado del día o de la noche, lo que favorece su sincronización; al parecer la división nocturna ocurre en muchas especies.

Capacidad fotosintética: con frecuencia se observa que las tasas máximas de fotosíntesis se producen en la mañana y las mínimas en las noches.

Absorción de nutrientes: las tasas de absorción de N y P son mayores durante el día que durante la noche, lo que refleja la influencia de la luz sobre la absorción.

Bioluminiscencia: generalmente se detecta un pico nocturno de bioluminiscencia en las especies que la poseen (dinoflagelados).

Estos ritmos circadianos diarios persisten bajo condiciones ambientales constantes. La adaptación de las microalgas a variaciones extremas en la intensidad de luz, es decir, a la luz y sombra, es un fenómeno muy conocido y caracterizado por cambios en el contenido intracelular de pigmentos, generalmente acompañados en cambios en la respuesta fotosintética y en la composición bioquímica.

Los periodos de luz/oscuridad se ajustan para el cultivo de cada especie en particular. La introducción de un ciclo celular es un importante adelanto ya que el ciclo día-noche es quizás el factor cíclico ambiental más importante en la mayoría de los sistemas.

d) Longitud de onda.- En cuanto a la calidad de luz (longitud de onda) se sabe que tiene efectos marcados sobre el crecimiento y varios procesos metabólicos, y puede afectar también a la composición bioquímica. Así, la luz azul es un disparador para ciertos procesos metabólicos (Senver, 1987 en: Abalde et al., 1995). La luz azul estimula un aumento de la respiración acompañado por la síntesis de novo de enzima y la producción de especies enzimáticas de mayor afinidad por el sustrato.

En microalgas se ha establecido que varias enzimas relacionadas con la fotosíntesis están bajo el control de la luz azul (Ruyters, 1984 en: Abalde et al., 1995). La actividad de la fosfatasa alcalina en *Dunaliella tertiolecta*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Prymnesium parvum* varía con la intensidad y calidad de luz de forma característica para cada especie (Wynne y Rhee, 1988 en: Abalde et al., 1995). La composición espectral de la luz también afecta a la incorporación de fósforo e induce asimismo cambios en la relación N:P óptima también de forma característica en cada especie (Wynne y Rhee, 1986, 1988 en: Abalde et al., 1995). La luz roja también afecta a ciertos aspectos del metabolismo microalgal.

e) Fuentes de Luz.- Cuando los demás factores están dentro de límites razonables, la disponibilidad de luz es un factor que influye en la productividad de los cultivos microalgales masivos, de ahí la importancia de la fuente de luz para el cultivo.

La luz utilizada para el cultivo de microalgas puede ser luz artificial o luz natural.

Natural.- Tiene la ventaja de no suponer un gasto energético, pero tiene los inconvenientes de que no se puede controlar ni el fotoperiodo ni la intensidad: asimismo, se producen variaciones diarias, estacionales, en función del tiempo atmosférico, etc.

Artificial.- La luz artificial tiene espectro de emisión que no son necesariamente idéntica a la luz del sol y la calidad de luz puede afectar al crecimiento, metabolismo, reproducción y morfología de una clase de microalga, por lo que hay que estudiar el espectro más favorable para cada tipo a cultivar.

Las lámparas fluorescentes tubular son la fuente de luz preferida para la iluminación de cultivos interiores. Estas dan menor calor que otros tipos de luz artificial y son igualmente eficientes en promover tasas de división y crecimiento máximos. Los tipos usados comúnmente son "Daylight", "Coll-White" y "Grolux".

Temperatura.- Es otro factor fundamental para el crecimiento de las microalgas. La biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura ambiental. La temperatura celular se iguala a la temperatura del medio de cultivo, en contraste con otros parámetros del medio como el pH. Además de afectar a las reacciones celulares, la temperatura también afecta a la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, si bien dentro de los rangos óptimos tiene poca influencia sobre la concentración final de biomasa, así como la producción y la composición bioquímica de las microalgas.

Existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica, aumentando la tasa de crecimiento cuando aumenta la temperatura, dentro de un rango determinado, por encima del cual el crecimiento disminuye, a veces bruscamente, hasta llegar a cero si continúa el aumento de la temperatura. La mayoría de las microalgas tienen una curva de respuesta del crecimiento a la temperatura con una amplia meseta, y un rápido descenso después del óptimo con pronunciados efectos inhibitorios para temperaturas que superan el óptimo en sólo a 2 o 3 °C (Richmond, 1986 en: Abalde et al., 1995). El descenso de crecimiento a temperaturas altas puede ser debido a la interrupción de la regulación metabólica o a la muerte celular. El rango óptimo para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 y 25 °C. La tolerancia varía según la especie.

pH.- El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo microalgal. Las membranas plasmáticas no son libremente permeables a los iones hidrógeno e hidroxilo, por lo tanto las concentraciones de hidrogeniones intracelular y extracelular no están necesariamente equilibradas y existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana.

Las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Independientemente cada microalga presenta un pH óptimo para su crecimiento. (7 - 8), un descenso del pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH, hasta cierto límite (Richmond, 1986 en: Abalde et al., 1995).

El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO₂ y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono (CO₂, H₂CO₃, HCO₃,

CO_3^{2-}), e influyen directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Bentrup, 1971 en: Abalde et al., 1995). El pH tiene un efecto marcado en la solubilidad de varios compuestos metabólicos, de modo que, un aumento de pH puede llegar a ocasionar una deficiencia en algunos elementos traza. El pH del medio de cultivo, a causa de su efecto en la disociación de varias sales y complejos, puede potenciar la toxicidad o efecto inhibitorio de éstos.

A su vez, el pH se ve afectado por la capacidad tampón y composición del medio de cultivo, cantidad de dióxido de carbono disuelto, temperatura que a su vez controla la solubilidad del CO_2 y actividad metabólica de las células microalgas; la fuente de nitrógeno suministrada para el crecimiento juega un papel interactivo muy importante (Raven, 1988 en: Abalde et al., 1995).

La asimilación de nitrato y amonio está estrechamente relacionada con el pH del medio, dado que la absorción de nitrógeno cambia el pH. La asimilación de nitrato tiende a aumentar el pH (Brewer y Goldman, 1976 en: Abalde et al., 1995). Cuando se utiliza amonio como única fuente de nitrógeno, el pH del medio puede disminuir rápidamente hasta niveles de pH de 3.0 usando efectos colaterales.

Salinidad.- La concentración de sales inorgánicas disueltas, tanto en las aguas dulces como marinas, puede potencialmente afectar el crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica. La tolerancia a la sal varía según las especies, algunas sólo pueden tolerar concentraciones milimolares de sal mientras que otras sobreviven en soluciones saturadas. Lo que supone un estrés salino letal para un grupo es fácilmente tolerado por otro grupo.

Sin embargo, el efecto de la salinidad adquiere mas influencia cuando se relaciona con otras variables, como temperatura, luz, fuente de nitrógeno y concentración de nutrientes (Terlizzi y Karlander, 1980; Fábregas et al., 1984, 1985, 1986 en: Abalde et al., 1995).

La osmoregulación no es el único efecto por la salinidad. La respuesta a salinidades elevadas implica algunos cambios fisiológicos en las células microalgales, tales como la pérdida de la actividad fotosintética (Gimmler et al., 1981 en: Abalde et al., 1995). Un hecho importante la respuesta adaptativa de las células algales al estrés salino es que éste proporciona resistencia a otras condiciones de estrés, como calor, temperatura bajo cero o baja actividad del agua.

La salinidad es un factor a tener en cuenta, sobre todo en sitios cerrados como bahías, rías, estuarios, a la hora de tomar agua, y que puede verse alterada en mayor o menor grado por la evaporación en el verano y el efecto de dilución durante la época de lluvias.

Agitación.- Una suficiente agitación del medio de cultivo es necesaria e incide directamente en el cultivo de microalgas. Cuando los requerientes están satisfechos y las condiciones ambientales son satisfactorias, la agitación constituye el requisito más importante para la obtención de altos rendimientos de biomasa microalgal (Richmond y Becker, 1986 en: Abalde et al., 1995).

La agitación produce el movimiento del agua, lo que implica una serie de efectos positivos tales como (Richmond, 1986; 1990; Raven, 1988; Laing y Ayala 1990; Beker, 1994 en: Abalde et al., 1995).

1.- Asegura una distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo. La necesidad de una distribución uniforme de los minerales en el medio implica la prevención de gradientes nutricionales alrededor de las células microalgales que se forman durante el periodo de metabolismo activo. Tales gradientes imponen restricciones en el crecimiento y se evitan con una turbulencia suficiente.

2.- Mejora la distribución de la luz a las células asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas.

Una agitación adecuada del cultivo permite un movimiento rápido de las células desde la zona iluminada (zona fótica) a la zona profunda oscura del tanque de cultivo, y la vuelta a la zona iluminada, lo que produce un patrón dinámico de luz-oscuridad para las células individuales. El fenómeno del ensombrecimiento mutuo, el continuo cambio entre las fases de oscuridad y luz, representa uno de los requerimientos más básicos para una elevada productividad de biomasa.

3.- Evitar que las células sedimenten en el fondo del recipiente de cultivo, produciendo una estimulación general del metabolismo celular.

4.- Otra razón para mantener la agitación se relaciona con los gradientes gaseosos que se forman alrededor de las células microalgales en el curso de su actividad metabólica. Estos gradientes imponen restricciones a la tasa de crecimiento de un cultivo. Una alta densidad de células fotosintéticamente activas provoca concentraciones extremadamente altas de oxígeno disuelto; durante las horas de fotosíntesis máxima y en condiciones de estancamiento, es muy común que se produzca una supersaturación de oxígeno por encima del 400 %.

5.- Prevenir una estratificación termal. En los tanques de cultivo sin agitación puede llegar a haber diferencias de 8°C entre la superficie y el fondo del cultivo.

Si la velocidad de mezclado es demasiado lenta, las algas muertas y otras formas de materia orgánica se depositan en el fondo, preferentemente en las áreas donde la turbulencia es pequeña. La formación de estas zonas de estancamiento conducirá a la formación de condiciones anaerobias, que tienen como efecto el deterioro celular y la reducción del rendimiento y calidad de la biomasa microalgal. En determinadas circunstancias se puede formar compuestos tóxicos a partir de la descomposición del material orgánico, causando la pérdida de todo el cultivo.

Evaporación y Precipitación.- El cultivo de micralgas en áreas tropicales, en la época seca, tiene un importante problema que es el de la evaporación, superior a $10 \text{ lt.m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, lo que aumenta la concentración de sales en el medio y hace necesaria la adición de suficiente agua para contrarrestar la pérdida, con los consiguientes problemas que estos suponen. En las zonas tropicales, en la época lluviosa donde son frecuentes las lluvias, éstas provocan fuertes diluciones en el cultivo, pérdida de nutrientes e incluso de la biomasa microalgal. Además de las pérdidas por evaporación, las condiciones climáticas también afectan a la temperatura del medio de cultivo. A baja humedad relativa del aire, las tasas de evaporación son mayores, lo cual provoca un enfriamiento del medio. Cuando la humedad relativa del aire es alta y no hay viento, el medio puede llegar a alcanzar los 40°C, temperatura letal para la mayoría de las microalgas.

Tamaño de inóculo y densidad de población óptima.- La concentración óptima o tamaño del inóculo, juega un papel importante en posterior desarrollo del cultivo.

Concentraciones demasiado bajas pueden perderse por fotooxidación u otras causa, mientras que si son demasiados altas se producen pérdidas debido a la respiración o a una ineficiente utilización de la energía lumínica. El inóculo inicial debe estar constituido por células de una sola especie en buen estado. La calidad del inóculo debe comprobarse en cada paso de las distintas escalas de cultivo.

Nutrientes.- Para un crecimiento óptimo, debe suministrarse al cultivo nutrientes en cantidades adecuadas. Hay muchas variaciones en los requerimientos nutritivos (cantidad) entre las distintas especies y dentro de cada especie varían en función de distintas condiciones ambientales, como luz, temperatura, pH. Si las condiciones permiten una tasa de crecimiento alta los requerimientos nutritivos son mayores. El crecimiento microalgal y la incorporación de nutrientes no siguen una relación simple, siendo dependiente de factores tales como las concentraciones internas y externas, tasas de difusión, especies etc. A causa de la importante variabilidad de estos factores, las concentraciones de nutrientes aportadas para el crecimiento y desarrollo microalgal han variado considerablemente. Como la concentración de un nutriente afecta la tasa de producción fotosintética, la tasa de división celular y composición celular, el crecimiento de una población se hace dependiente no sólo de los factores físicos ya señalados, sino que además de la presencia de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos, tanto a nivel traza como macroelementos.

Medios de cultivo.- Unos de los obstáculos en la producción industrial de microalgas es la formulación y preparación de un medio de cultivo, química y económicamente apropiado.

Los medios de cultivo utilizados para algas se pueden agrupar en tres categorías: medios completamente sintéticos, medios basados en aguas naturales enriquecidas con suplemento mineral y utilización de residuos o aguas residuales.

Los medios de cultivos sintéticos pueden ser comerciales o prepararse en cada laboratorio o planta a partir de sus componentes. Es conveniente que sean fáciles de hacer o reconstituir en el laboratorio y fáciles de conservar.

El enriquecimiento del agua dulce o el agua de mar natural con diferentes nutrientes químicos aumenta enormemente el crecimiento y las tasas de división celular en los cultivos microalgales.

Un medio definido usualmente contiene cantidades conocidas de fuente de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otras sales inorgánicas, además algún elemento adicional, particularmente metales en óptimas cantidades que son requeridas en cantidades trazas. Estos tipos de medio pueden ser reproducidos exactamente en cualquier momento a causa de que las fórmulas químicas de sus constituyentes son conocidas exactamente, siendo adecuadas para el crecimiento específico de ciertos microorganismos (Taub, 1970).

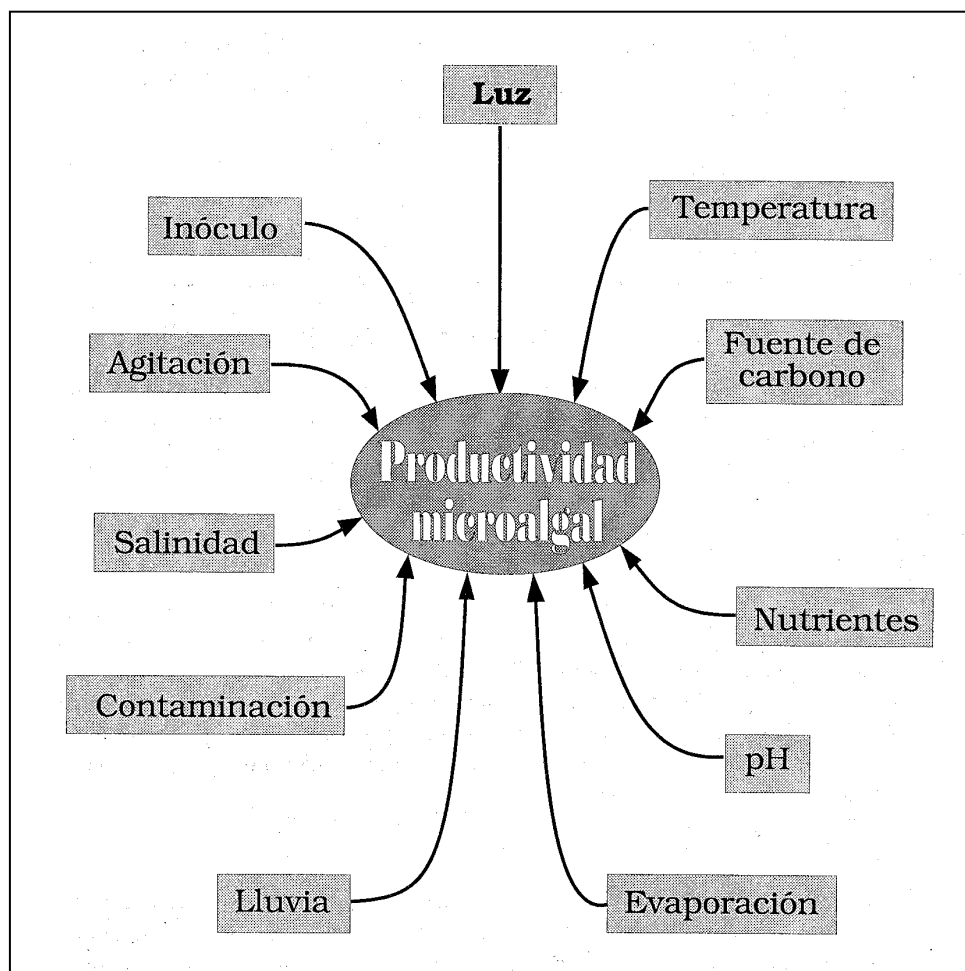


Figura # 12.- Factores que inciden en el cultivo de algas

CAPITULO II .- AGENTE ANTIMICROBIANO

2.1.- DESINFECTANTES

Un desinfectante es un agente físico o químico capaz de matar las formas de desarrollo, pero no necesariamente las esporas persistentes de microorganismos patógenos.

Un desinfectante es una solución muy fuerte que actúa destruyendo la célula y se utiliza para esterilizar objetos, lugares o superficies que contienen organismos patógenos.

El poder y la actividad de un desinfectante es tal que podría matar cualquier célula viva, incluyendo la de un pez o una persona cuando la piel esta en contacto con ésta por largo tiempo. Por lo tanto los desinfectantes nunca deben ser usados sobre el cuerpo de especies vivas o en situaciones en que éstos retornarán inmediatamente al agua.

Los desinfectantes son también conocidos como germicidas y se caracterizan por sus fuertes concentraciones. La actividad del químico se debe a su grado de ionización, la temperatura de la solución y la longitud del tiempo que esta en contacto con el tejido o materiales en las que tiene que actuar el químico.

La desinfección puede realizarse por varios métodos, incluyendo el uso de radiación ultravioleta (UV) calor o métodos químicos. De los métodos químicos utilizados, los más ampliamente empleados son los de cloro y de ozono, aunque también pueden ser utilizados otros.

En segunda categoría, se encuentran ciertos iones metálicos tales como la plata, ciertos álcalis ácidos, algunos compuestos químicos como el yodo, bromo, permanganato de potasio y peróxido de hidrógeno.

2.1.1.- Dinámica de la desinfección

Kronig y Paul 1897 (en: Campaña, 1991) parecen, haber sido los primeros que señalaron que el proceso de desinfección no es repentino, sino gradual, y que el número de microorganismos destruidos en la unidad de tiempo es mayor al principio y disminuye paulatinamente al avanzar el período de exposición.

2.2.- CARACTERISTICAS DE UN DESINFECTANTE IDEAL

2.2.1.- Actividad microbiana.- La capacidad de una sustancia química para destruir los microorganismos presentes es un primer requisito, ya que los germicidas a una baja concentración deberán tener un amplio espectro de actividad antimicrobial.

2.2.2.- Solubilidad.- La sustancia deberá ser soluble en agua u otros solventes en la cantidad necesaria para su uso efectivo.

2.2.3.- Estabilidad.- Los cambios en las sustancias al inicio deberán ser mínimos y no tener pérdidas significantes de su acción germicida.

2.2.4.- Toxicidad.- No deberán ser tóxicos a humanos ni animales, sino más bien letal para los microorganismos.

2.2.5.- Homogeneidad.- La proporción debe ser uniforme en su composición de manera tal que los ingredientes activos estén presentes en cada aplicación.

2.2.6.- Compatibilidad.- Que no se combine con material orgánico extraño, muchos desinfectantes tiene afinidad por proteínas y otros materiales orgánicos.

2.2.7.- Efectividad.- Frente a los microorganismos a temperatura ambiente sin que sea necesario bajar o elevar la temperatura durante el tratamiento.

2.2.8.- Disponibilidad.- Los compuestos deben estar disponibles en grandes cantidades y a precios razonables.

2.3.- CONDICIONES QUE INFLUYEN EN LA ACCION ANTIMICROBIAL

2.3.1.- Concentración o intensidad de los agentes microbiales.- La probabilidad de destrucción de la bacteria es proporcional no solamente al número de bacteria presentes sino también al número de agentes existentes, esto es, la concentración de agentes químicos o intensidad de agentes físicos. La acción depende del tiempo. Si la bacteria es sometida a rayos x o luz ultravioleta, la acción de destrucción de las células es más rápida mientras la intensidad de la radiación aumente. Si se utiliza algún agente químico, las células podrían ser destruidas más rápidamente mientras la concentración del agente aumente.

2.3.2.- Temperatura.- Pequeños incrementos de temperatura pueden aumentar o disminuir grandemente la eficiencia de un desinfectante u otro agente químico antimicrobial.

2.3.3.- Especies de microorganismos.- Las diferentes especies de microorganismos difieren en su susceptibilidad a agentes físicos y químicos. Las células de crecimiento vegetativo son mucho más fáciles de destruir que las formadoras de esporas. Las bacterias que forman esporas son las más resistentes de todos los organismos vivos debido a su habilidad para sobrevivir bajo condiciones físicas o químicas adversas.

2.3.4.- Presencia de materia orgánica.- La presencia de materia orgánica extraña puede reducir significativamente la eficiencia de un agente químico antimicrobial por inactivación o protección de los microorganismos por:

1.- Combinación del desinfectante con la materia orgánica formando un producto que no es microbicida.

2.- Combinación del desinfectante con la materia orgánica formando un precipitado, de este modo se elimina el desinfectante de la posible combinación con microorganismos.

3.- Acumulación de la materia orgánica sobre la superficie celular de la bacteria, produciendo un efecto, una cubierta o revestimiento que podría perjudicar el contacto entre desinfectante y célula.

2.3.5.- Acidez o alcalinidad.- Los microorganismos presentes en materiales pueden ser destruidos con un pH ácido en temperaturas bajas y en exposiciones cortas en un ambiente alcalino.

2.4.- EL CLORO

Es de color amarillo verdoso, es un gas tóxico. Es un agente oxidante fuerte que reacciona con muchos elementos y componentes. La humedad generada por éste es extremadamente corrosiva el vapor es irritante respiratorio que puede causar serios daños y serias heridas si se expone a altas temperaturas.

Los hipocloritos de calcio son comercialmente disponibles en polvos, granular o en forma de tabletas que se disuelven rápidamente en agua y contienen alrededor del 70% de cloro disponible. El hipoclorito de sodio esta comercialmente disponible en forma líquida en concentraciones entre 5 - 15%.

El cloro es un potente germicida que a concentraciones de 0.10 y 0.2 ppm es capaz de destruir la mayoría de los microorganismos en pocos segundos.

Produce un efecto antibacteriano en estado de ácido hipocloroso no disociado, que se transforma rápidamente en solución acuosa.

El poder desinfectante del cloro depende del tiempo de contacto, la temperatura, y el pH. Si el pH es menor a 8 un cloro residual libre de 0.2 mg/l destruye una buena parte de las bacterias en un periodo de 10 minutos a cualquier temperatura.

Entre los diversos usos del cloro se encuentran esterilización del agua potable, desinfección del agua para laboratorios de larvas y para la desinfección de sus materiales inanimados.

2.5. - ACIDO CLORHIDRICO

Antiguamente se lo llamaba ácido marino o ácido muriático. En la actualidad de acuerdo con la nomenclatura moderna se lo conoce como cloruro de hidrógeno.

Es un gas incoloro y tóxico de olor penetrante, se caracteriza por su alta solubilidad en el agua. El llamado ácido concentrado comercial es del 37%.

Es un gas irritante (irrita la pituitaria) corroe la piel, es muy venenoso, ingerido en dosis mayor puede producir la muerte, para evitar esta un método que consiste en beber leche de magnesia.

La razón de que sea más enérgico que el fluorhídrico se debe a su mayor grado de disociación, y este hecho radica a su vez en la mayor debilidad del enlace H-Cl respecto al H-F. De ello se deduce que el anión cloruro, Cl^- , apenas tiene tendencia a hidrolizarse en solución acuosa, y de aquí que las disoluciones de los cloruros (sales del ácido clorhídrico) sean neutras.

La acción desinfectante del ácido es proporcional al número de iones por unidad de volumen.

Es un buen desinfectante pero poco utilizado por su acción destructiva. Se emplea en concentraciones de 25% para desinfección de retretes, en la industria se lo utiliza para quitar los óxidos, en los laboratorios de larvas para la desinfección de la vidriera en una solución al 10%, así como para tratar el agua de mar.

CAPITULO III.- METODOLOGIA

3.1. - SELECCION DE EQUIPOS A UTILIZAR

Entre el material biológico, químicos, materiales y equipos empleados en el experimento se detallan los siguientes:

Material biológico

- *Chaetoceros gracilis* procedente de México
- *Isochrysis galbana* procedente de Chile
- *Tetraselmis maculata* procedente de Chile

Reactivos y Químicos

- Nitrato de Sodio (NaNO_3): químicamente puro y técnico
- Fosfato de Sodio (NaH_2PO_4): químicamente puro y técnico
- Metasilicato de sodio ($\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$): químicamente puro y técnico
- Cloruro Férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): químicamente puro
- Edta di Sódico (Na_2 EDTA): químicamente puro
- Ferric sequestrene: grado técnico
- Sulfato de Cobre: ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): químicamente puro

- Sulfato de Zinc: ($ZnSO_3 \cdot 7H_2O$): químicamente puro
- Cloruro de Cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$): químicamente puro
- Cloruro de Manganeso ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$): químicamente puro
- Molibdato de Sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$): químicamente puro
- Tiamina (B1): químicamente puro
- Cianocobalamina (B12): químicamente puro
- Biotina (H): químicamente puro
- Hipoclorito de Sodio ($NaClO$): grado técnico
- Acido Clorhídrico (HCL): grado técnico
- Soda Caústica ($NaOH$): grado técnico
- Jabón neutro
- Alcohol industrial
- Nitrato de Amonio (NO_3NH_3): fertilizante inórganico
- Triple Super fodfato (PO_4H_2Na): fertilizante inórganico
- Blaukorn: fertilizante foliar
- Buffer de 4, 7 y 10
- Agar TCBS
- Agar Marino

Materiales y Equipos

- Microscopio compuesto Olympus BH-2
- Cámaras Neubauer
- Micropipetas Pasteur
- Termómetro mercurio
- PHmetro digital
- Salinometro
- Luxometro
- Autoclave
- Esterilizador
- Contador
- Fiolas de vidrio de 125, 500 y 2000 ml
- Carboys de 20 l
- Mangueras plásticas

- Varillas de vidrio
- Tapones de algodón
- Mechero Bunsen
- Pipetas de 1, 2, 10 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Cajas petri
- Rejillas de plásticos
- Probetas graduadas de 10 ml
- Balanza
- Lámparas fluorescente daylight
- Filtros de piola 1 μ m
- Estufa

3.1.1. - METODOLOGIA

Las especies de microalgas utilizadas en este ensayo fue la diatomea *Chaetoceros gracilis* y los flagelados *Tetraselmis maculata* e *Isochrysis galbana* del banco de cepas del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” (CENAIM), el ensayo consta de dos etapas: en la primera parte del ensayo se pretende determinar el mejor tratamiento químico del agua y en la segunda etapa se va a determinar en qué medio enriquecedor crecen mejor las microalgas, estas etapas se describen a continuación:

a).- Primera Etapa del Ensayo.- Se tomaron tres réplicas por cada tratamiento siendo seis unidades experimentales en total por cada volumen de 20l, las mismas fueron enumeradas y colocadas aleatoriamente en series (fig. # 13).

El agua de mar a utilizarse fue filtrada por filtros de arena con porosidad de aproximadamente $100\mu\text{m}$ antes de pasar por el reservorio, luego baja por gravedad hasta el cuarto de algas donde es filtrada por dos cartuchos de filtros de piola de $1\mu\text{m}$ cada uno, para después pasar por el sistema de luz ultravioleta, donde pasan por otros dos cartuchos de piola de $1\mu\text{m}$ cada uno.

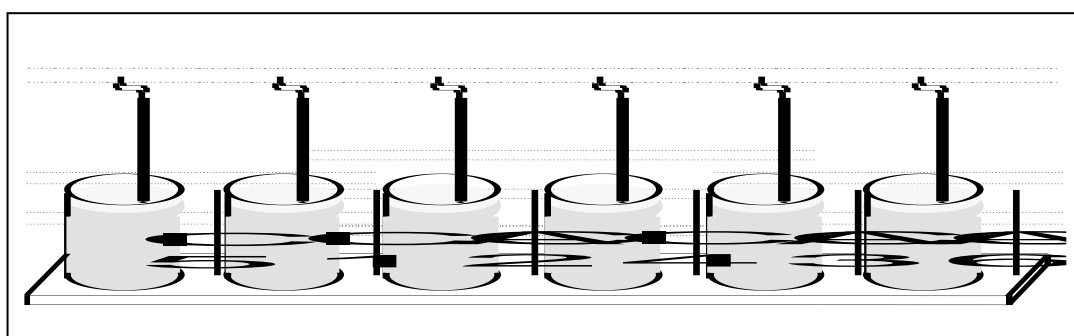


Figura # 13.- Diseño experimental de la primera parte del ensayo. Cl: cloro; AC: Acido clorhídrico

El agua se trató de dos formas químicas: por cloración con cloro líquido (Hipoclorito de Sodio) en una solución de 100mg/l al 10% activo comercialmente el mismo que se neutralizó luego con Thiosulfato de Sodio en una relación 1:1 (Hemerick, 1973), la otra técnica utilizada es por acidificación en la cual los microorganismos son eliminados a un pH 3 con ácido muriático en una solución de 250 mg/l al 34% activo comercialmente neutralizado con Soda Cáustica en una relación 5:1.5 (Le Borgae, 1989).

Una vez determinado qué tratamiento del agua es el mejor microbiológicamente por la disminución de bacterias sembradas en agar TCBS (específico para Vibrios) y agar Marino (colonias totales). Las muestras de agua antes y después del tratamiento fueron sembradas directamente a las placas en número de dos por cada tratamiento y unidad

experimental. Así mismo durante el cultivo se sembraron muestras en en los dos tipos de agar haciendo diluciones (1:10 a 10^3).

Para la inoculación de las muestras las cajas petri fueron colocadas en forma invertida en la incubadora a una temperatura de 32 – 37°C por un periodo de 24 horas cuando se realizó el conteo que es expresado en UFC/ml. Anova de una vía se utilizó para determinar la diferencia entre los tratamientos, luego de lo cuál se pasó a la segunda parte del ensayo.

b.- Segunda Etapa del Ensayo.- Qué comienza a los 20 l en donde se determina en que medios de nutrientes se obtiene un mejor crecimiento de las microalgas, empleando uno de los dos tratamientos del agua de mar. Se partió con un inóculo de 10 ml aumentando progresivamente el volumen a 125, 500 y 2000 ml, empleando la forma de cosecha del sistema Bacth que consiste en la cosecha total del cultivo.(fig. 14).

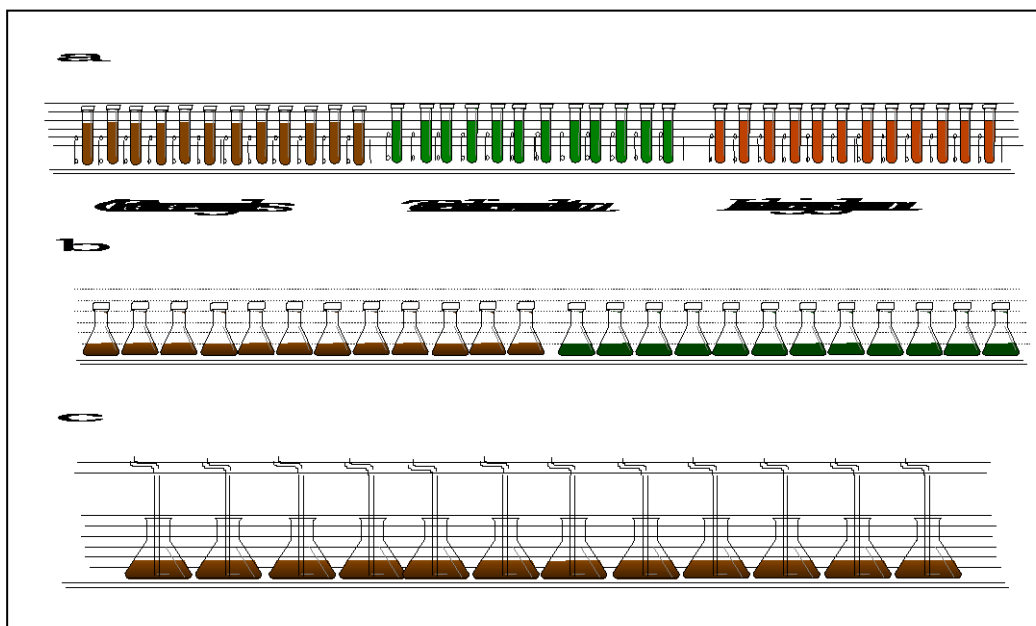


Figura # 14.- Modelo de distribución de la tres especies de microalgas para la segunda etapa del ensayo (cuarto de cepas). a: tubos de producción de 10 ml, 12 unidades experimentales; b: fiolas de 125 ml, de 12 unidades experimentales; c: fiolas de 2 l, de 12 unidades experimentales.

El paso de un volumen a otro se lo hizo al tercer o cuatro día de edad del cultivo, cuando se encontraban en la fase exponencial, realizando los conteo de cuatro alícuotas por cada unidad experimental, empleando el hemocitómetro (cámara Neubauer). Por Anova se determinó si hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes réplicas para mezclar o no los cultivos en cada uno de las diferentes etapas (diferentes volúmenes), siendo obligatorio mezclar el cultivo en el volumen de 2 l, para que todas las condiciones sean iguales, puesto que el ensayo de las dos etapas empieza a los 20 l para las tres especies de microalgas.

Los medios de nutrientes a utilizarse fueron: inorgánicos como el Nitrato de amonio al 33.8 % N y Triple superfosfato al 46 % P_2O_5 y fertilizante foliar como el Blaukorn con el 12% N, 12% P_2O_5 y 17% K_2O . El medio de nutriente utilizado es el Medio F/2

(Guillard y Ryther's, 1962), para las tres especies a excepción de la solución # 2 para los flagelados, descrito más adelante (ver anexo 1).

Estos medios se formulan igualando la fórmula con el Medio F/2 que se toma como control y descrito mas adelante, (ver anexo 2).

Para cada especie se tomaron tres réplicas por cada tratamiento siendo en total 12 unidades experimentales por cada volumen, las mismas que fueron enumeradas y colocadas aleatoriamente en serie (Figura # 15).

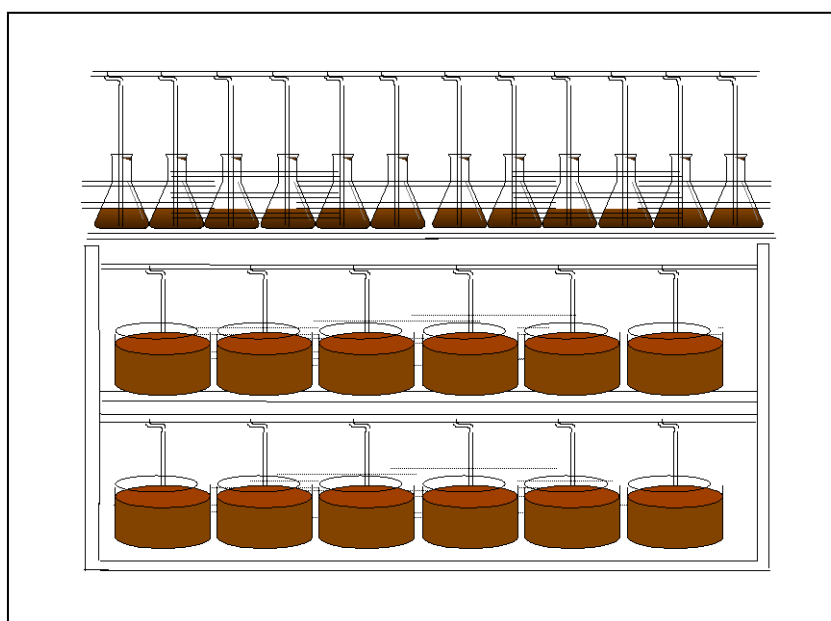


Figura #15.- Modelo de la segunda parte del ensayo (cultivo intermedio), para cada una de las especies de microalgas.

Se realizaron conteos diarios de 4 alícuotas de cada unidad experimental bajo el microscopio binocular utilizando la cámara Neubauer, para analizar crecimiento, forma, motilidad, etc.

Estadísticamente se aplicó análisis múltiple de medias (LSD; $p < 0,05$) para establecer comparaciones de crecimiento de cada una de las microalgas y tratamiento en los diferentes medios de fertilización y desinfección del agua.

Se utilizaron tubos de ensayo de 10 ml, erlenmeyers de vidrio de 200 y 500 ml y fiolas de 2 l previamente lavados con ácido muriático en solución al 10% y esterilizados, así como también recipientes circulares de fondo plano de policarbonatos, de 20 l de capacidad, para su lavado se empleó jabón neutro y posteriormente cloro en solución de 10 ppm. El mismo procedimiento se utilizó para desinfectar todo el material utilizado.

Los cultivos primarios hasta 500 ml se colocaron en el cuarto de cepas con temperatura controlada de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminación artificial con lámparas fluorescente de 40 W (luz del día, DAYLIGHT) General electric a 1.600 lux con fotoperiodo de 12 horas día/noche.

Los cultivos secundarios de 2 y 20 L se colocaron en una estantería de vidrio a temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminación artificial con lámparas fluorescente de 40 W (luz del día, DAYLIGHT,) General electric a 3.000 lux con fotoperiódodo de 12 horas día/noche.

3.2.- RUTINA DE CULTIVO

3.2.1.- Mantenimiento de las cepas

En esta etapa las cepas (stocks) de algas se mantienen en fiolas o matraces de 250 con 100 ml de medio de cultivo y/o placas de agar o tubos de ensayo de 10 ml, debe tener cuidado de no contaminarlas, de esta forma se trata de mantener una ramificación pura de una especie para poder proveer líneas de cultivo iniciadores de producción o para mantener los cultivos de varias especies durante largos períodos y evitar así su excesiva manipulación, de tal forma que éste cultivo stock tan solo sea necesario para proveer una línea de cultivo iniciador cada uno o dos veces por año.

El cultivo es mantenido en un incubador que opera a 18°C e iluminado por lámparas fluorescentes con fotoperiodo 12 horas día/noche, a 600 lux, para poder mantener este cultivo es necesario el realizar subcultivos a intervalos mensuales o inclusive hasta bimensuales.

Durante los inóculos hay que remover el tapón de algodón y flamear el cuello del recipiente con el mechero bunsen, así como limpiar la zona a trabajar con alcohol.

a.- Tubos de Cepas.- Se prepara de 2 a 3 tubos de cepas de cada especie a usarse (5, 10 y 20 ml cada uno), cada 4 a siete días. La inoculación de los tubos de cepas se los realiza por medio de transferencias de uno o dos colonias de la placa de agar. Estas cepas se las incuba entre 4 a 9 días, cada día se debe agitar lentamente los tubos para facilitar el intercambio gaseoso y para ayudar por medio del movimiento a la reproducción vegetativa de las células, esto debe hacerse tres veces al día. Después de

los cuatros primeros días, se observó cual de ellos presenta el mejor crecimiento, y si estaban contaminadas se usaron los tubos de respaldo de cepas o de los mismos tubos de producción para inocular los tubos de producción y para sacar otras cepas.

b.- Tubos de Producción.- Se prepararon de 3 a 7 tubos por especie, inoculándolos por medio de una transferencia de 1 ml de inóculo por cada tubo guardando la relación 1:10. Si se quiere sacar los tubos de producción más rápido se usa la relación 1:5 y se realiza dos diluciones para tener respaldo de los tubos de producción.

Los tubos se incuban por 3 a 7 días dependiendo de la cantidad de inóculo o de la dilución que prepare. Luego del período de incubación el contenido es pasado a un recipiente de 300 o 500 ml de medio de cultivo que puede ser una fiola o un balón con fondo plano. La intensidad de luz debe estar entre 500 y 1.000 lux y la temperatura de 15 °C constante. La cepa se mantiene en un incubador que brinda todas estas facilidades.

c.- Fiolas y Botellones (500, 1.000 , 2.000 ml y 10 l).- Se preparan de acuerdo a la cantidad de tubos de producción que se encuentran listos para ser inoculados las botellas en un determinado día, así como la planificación previa de las siembras que se deberán realizar en función de la producción total a requerirse. Es de hacer notar que se escogerán los mejores tubos, que no existe la necesidad de avanzar linealmente, ya que se pueden desechar los tubos malos, por experiencia sabemos que por sí en caso de caída del cultivo con una sola fiola sin aireación que se saque de cultivos asépticos uno cada dos o tres días se está trabajando sin ningún problema.

Luego de 3 a 4 días se procede a realizar la transferencia del cultivo menor con medios del 60 al 65% de la capacidad total, que se los mantiene a una intensidad de luz de 1.500 y 2.000 lux, con una temperatura entre los 18 – 21 °C a un volumen mayor junto con la adición de aireación. Para luego de 2 a 4 días pasarla a volúmenes mayores en un 70 a 80% del volumen total, que se ajusta la intensidad de luz entre 2.000 y 3000 lux, con la misma temperatura que el volumen anterior.

El agua de mar empleada es nutrida y esterilizada en un autoclave a 15 PSI por 20 minutos para volúmenes menores y para volúmenes de 10 l es de 30 minutos, al momento de utilizárselas se agrega las vitaminas.

d.- Carboys , Cilindros (50, 500, 2.000 l).- En estos volúmenes el agua se trata con cloración, método más empleado para desinfección en los Laboratorios comerciales. Estos se los prepara con un día de anticipación para que actúe el cloro, empleando la relación cloro:thiosulfato de acuerdo al criterio del técnico.

Se espera de dos a cuatro días para pasar el contenido de carboys de 50 l, los cuales son mantenidos bajo las mismas condiciones que los cultivos menores a cilindros de 2.000 l, pudiéndose sembrar 500 o 1.000 l y luego proceder a subir progresivamente hasta los 2.000 l. En los cultivos masivos el grado de contaminación bacteriana es mayor, la iluminación por lo general se coloca en la parte superior de los recipientes la que puede estar entre 4.000 y 5.000 lux. Los inóculos son obtenidos de la etapa anterior que presentan un crecimiento rápido y carecen de sedimento.

En los cultivos masivos la aireación no es filtrada y generalmente se desarrolla externamente, aprovechando la iluminación del sol, se utiliza soluciones preparadas con químicos grado técnico.

Todas las manipulaciones de material estéril se efectúan con el mechero a lado, y limpiar con alcohol el sitio a trabajar.

3.3.- FORMULAS

El objetivo de contar microalgas no es solamente establecer la población (densidad celular) expresado en cell/ml que hay en un recipiente, sino también determinar numéricamente el incremento de división celular en un determinado tiempo. Los resultados permiten determinar en cierto modo, la situación de un cultivo y relacionarlo con la curva de crecimiento de esa población de algas.

El método para contar algas, implica el uso de un dispositivo que permita el contaje. De todos los dispositivos conocidos el más usado en los laboratorios de larvas comerciales es el hemocitómetro (fig. 16).

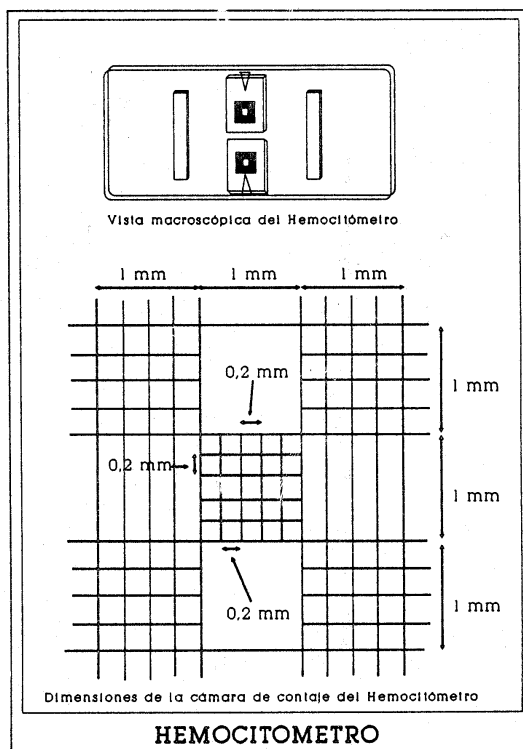


Figura # 16.- Hemocitómetro.

El Hemocitómetro de 0.1 mm de profundidad es recomendado para contar algas pequeñas (2 a 30 μ) y cultivos que lleguen a densidades de 5×10^4 a 10^6 cel/ml. El tipo más común es el de Neubauer de 2 cámaras, cada uno con un retículo de nueve cuadros de 1 mm por lado, los cuadros están a su vez sub-divididos (figura # 16). Se recomienda usar los objetivos 10 X , 20 X y 40 X.

Uso del Hemocitómetro

- Coloque el cubreobjeto bien limpio sobre los pilares de soporte de la cámara.
- Usando una pipeta pasteur que contiene la muestra de algas en ángulo de 45 grados, deposita una gota en cada ranura del hemocitómetro para llenar el espacio.

- Es conveniente esperar por tres minutos antes de proceder al conteo en el microscopio, para dejar que las unidades algales se asienten debidamente. Usar objetivos de 20X o 40X según sea más claro y cómodo para proceder.
- Mantener un orden en la secuencia del conteo para evitar errores de suma. No considerar las células que están asentadas justo en medio de cualquier línea de los cuadros, sean de la internas o de las laterales, aunque este criterio no se aplica cuando apenas es un 25% del cuerpo de la célula el que esté taponando la línea (fig. # 17).

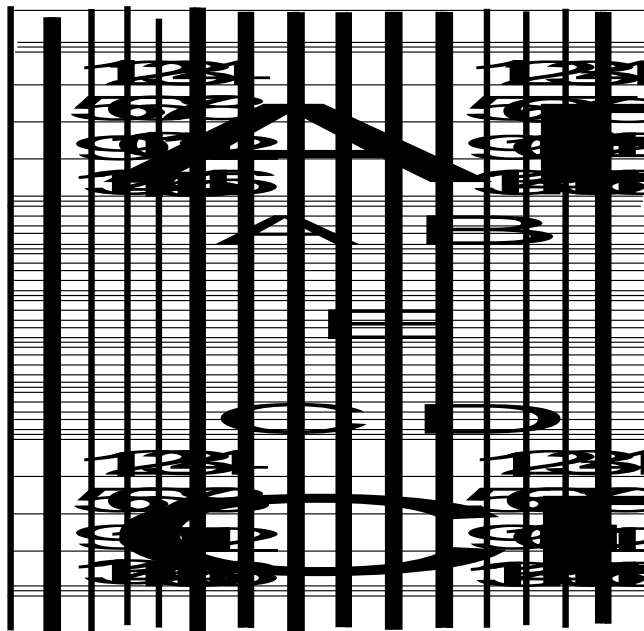


Figura # 17.- Patrón de conteo en el Hemocitómetro

Consideraciones:

Es necesario homogeneizar el cultivo y seleccionar el dispositivo indicado para el conteo, en el que las algas se distribuyan adecuadamente.

Cuando una célula se encuentra en proceso de división (fisión binaria), la unidad se cuenta como dos porque representa el material de dos células. Si las divisiones se presentan en un alto número entonces habrá que cambiar la hora del conteo.

La limpieza de la cámara es importante, incluyendo sus accesorios, para lograr una correcta distribución de las células en la cámara.

Es conveniente dejar que las células se asienten por unos tres minutos en la cámara y luego proceder a contar, luego de lo cual aplicamos la siguiente fórmula (Handbook SEAFDEC, 1984).

$$\text{Densidad (cel/ml)} = \frac{\text{Contaje total}}{\text{\# de bloques externos grandes}} \times 10.000$$

CAPITULO IV.- ANALISIS ESTADISTICO

4.1.- RESULTADOS

Para verificar el efecto del tratamiento químico en el agua se utilizó anova para determinar diferencias significativas entre tratamiento (gráf. # 1).

En el tratamiento químico del agua empleando ácido (ácido muriático) y cloro líquido (hipoclorito de sodio), no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) por anova para los dos tratamientos.

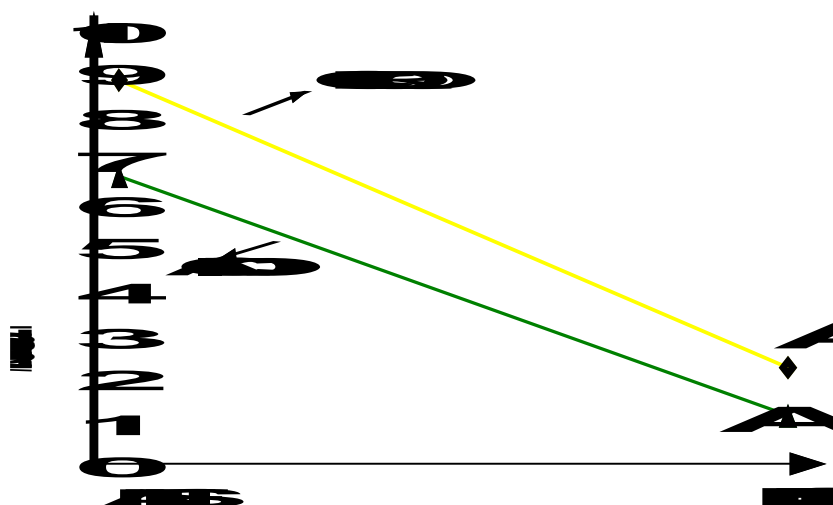


Gráfico # 1.- Efecto de los tratamientos. Letras iguales indican no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$)

Los resultados de las relaciones de crecimiento poblacional para cada una de las especies se analizó con Anova de una vía, para establecer si hay diferencias significativas entre los tratamientos (fertilizantes) y para determinar donde estaba esta diferencia se utilizó un análisis Múltiple de Medias (LSD, $p < 0.05$), (gráf. 2).

Para la especie *Chaetoceros gracilis*, hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias de crecimientos de los tratamientos.

El Nitrato de amonio fue el fertilizante en donde se obtuvo un crecimiento similar al control. No observándose microscópicamente variaciones en la morfología de las células.

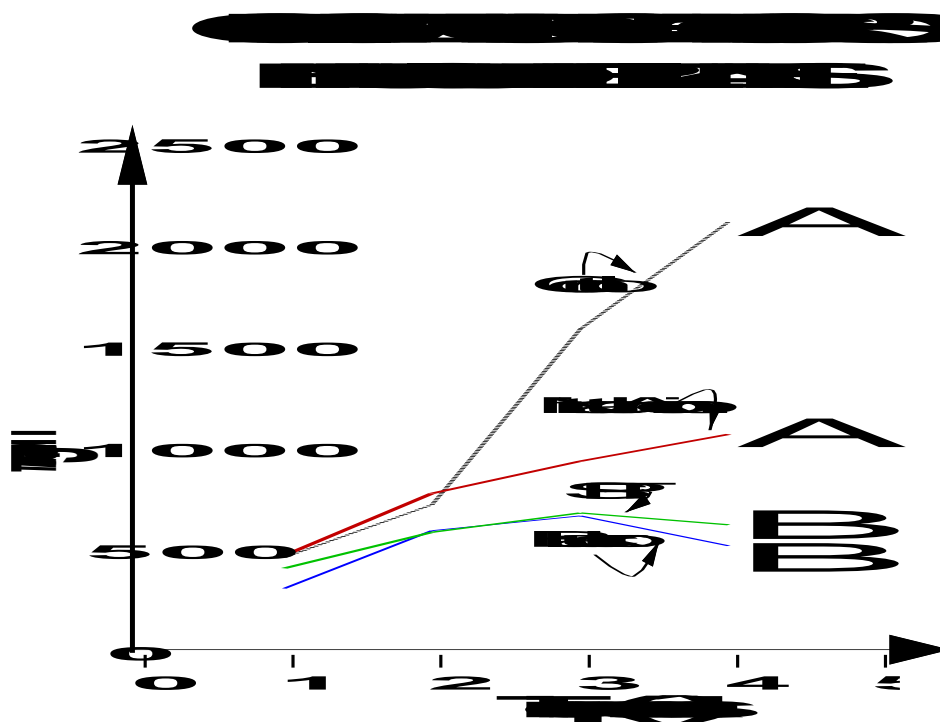


Gráfico #2.- Crecimiento de *Chaetóceros gracillis* en función de los fertilizantes: Nitrato de amonio, SPT Blauckorn. Letras diferente indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Para la especie *Isochrysis galbana*, hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias de crecimientos de los tratamientos. (graf # 3).

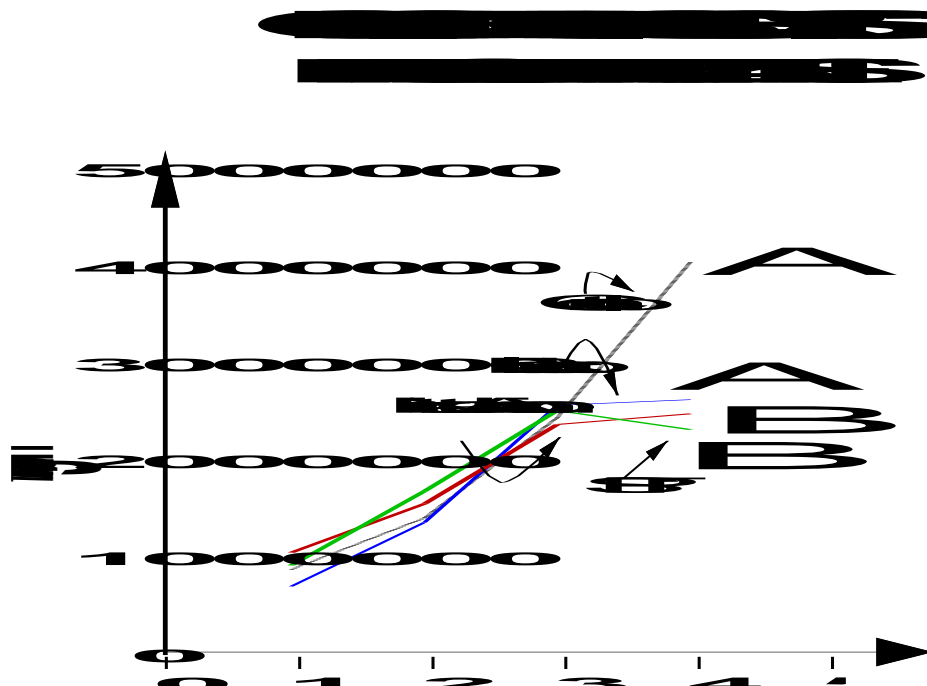


Gráfico #3.- Crecimiento de *Isochrysis galbana* en función de los fertilizantes: Nitrato de amonio, SPT Blauckorn. Letras diferente indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Los tres tratamientos se comportaron igual entre sí desde el comienzo en comparación con el control, pero según análisis estadístico, el tratamiento con Blauckorn tuvo un comportamiento estadísticamente hablando similar al control ($p > 0.05$). Con esta alga se presentó variaciones en la morfología de las células y motilidad en las observaciones microscópicas realizadas.

Para la especie *Tetraselmis maculata* hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias de crecimientos de los tratamientos, según análisis múltiple de medias se observó uno de los tratamientos similar al control ($p > 0.05$). (gráf # 4).

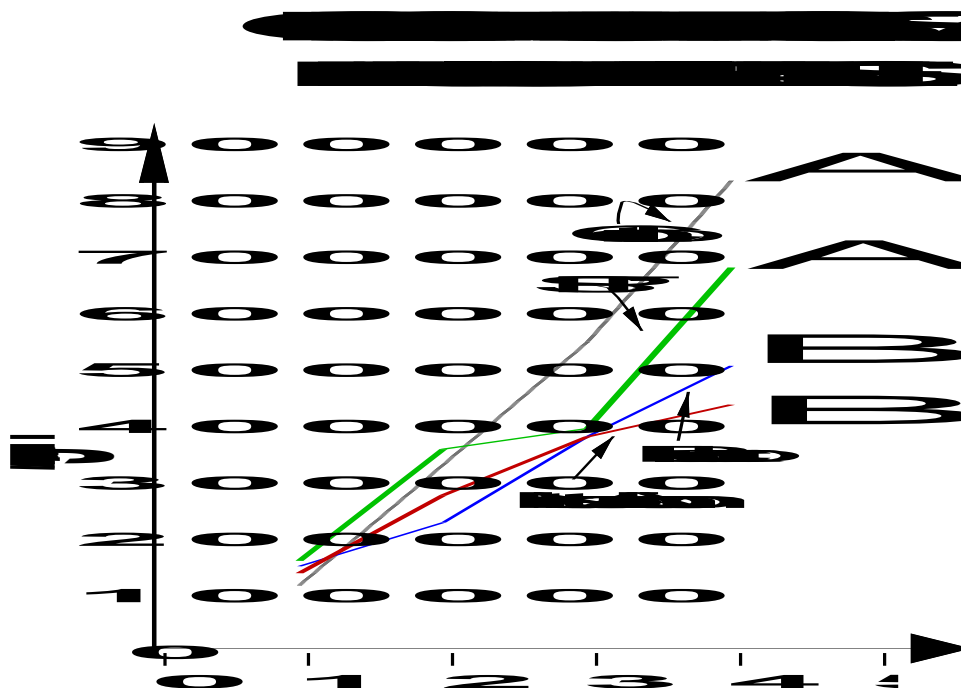


Gráfico #3.- Crecimiento de *Tetraselmis maculata* en función de los fertilizantes: Nitrato de amonio, SPT Blauckorn. Letras diferente indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Los tratamientos con el control presentaron igual crecimiento al comienzo, según análisis se observó diferencias a partir del tercer día entre los tratamientos, no habiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) el de Triple super fosfato con el control, notándose variaciones en la morfología de las células y y diferencia de la motilidad en las observaciones microscópicas realizadas

Se realizó un Análisis de varianza entre las medias de los contajes bacterianos de los tratamientos y el números de algas del último día para cada una de las especies de algas para verificar si el buen crecimiento algal se determinó por efecto del tratamiento o tuvo influencia el crecimiento bacterial.

Para la especie *Chaetoceros gracilis*, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los contajes bacterianos. (gráf. #5).

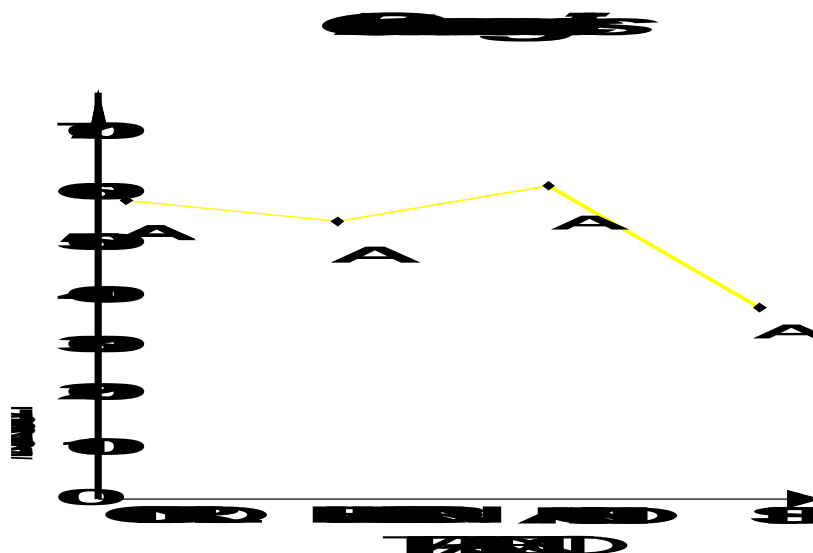


Gráfico # 5.- Número de bacterias en función de fertilizantes para *Chaetoceros gracilis*. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

Para la especie *Isochrysis galbana*, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con el control y entre los tratamientos. (gráf. 6).

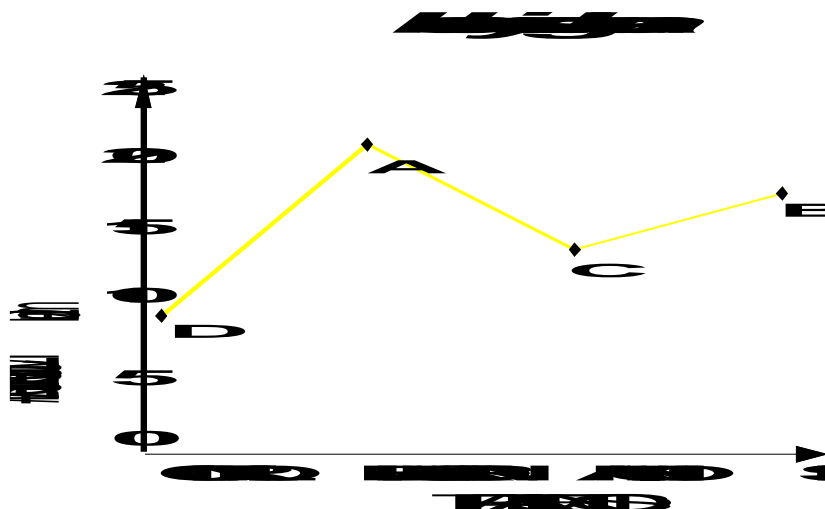


Gráfico # 6.- Número de bacterias en función de fertilizantes para *Isochrysis galbana*. Letras diferente indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Para la especie *Tetraselmis maculata*, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$), en el contaje bacteriano entre los diferentes tratamientos. (graf, # 7).

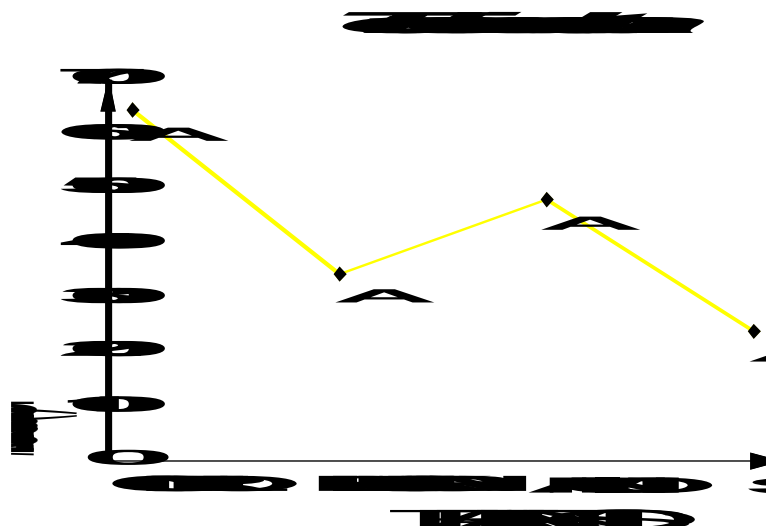


Gráfico # 7.- Número de bacterias en función de fertilizantes para *Tetraselmis maculata*. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

4.2.- ANALISIS ECONOMICO

Se realizó un breve análisis económico para comparar el costo de los diferentes fertilizantes que se emplearon para el crecimiento de las microalgas, analizando su costo en la preparación de 20 l, como también el tratamiento químico del agua.

En cuanto al análisis económico, los fertilizante inorgánicos (SPT y Nitrato de amonio) y foliar (Blauckorn) en comparación con el tradicional medio Guillard F/2, resultaron ser más económicos. (anexo # 3)

En lo que respecta al análisis económico del tratamiento químico del agua resulta más barato el empleo del hipoclorito de sodio puesto que resulta 5 veces menor su costo que el ácido, pero el ácido resultó ser mas eficiente en la destrucción de bacterias (anexo # 4).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al finalizar este trabajo experimental y bajo las condiciones que se desarrollaron los dos bioensayos, se concluyó:

- Con respecto al tratamiento químico ambos tratamientos son buenos desinfectantes. Económicamente resulta más barato utilizar el cloro, pero por eficiencia en destrucción de microorganismos (bacteria) concluyó en utilizar el ácido, aunque su costo sea elevado.
- En cuanto a los fertilizantes, para las tres especies el mejor crecimiento se mantuvo con el control (Medio Guillard F/2).
- Para la especie *Chaetoceros gracilis* el mejor crecimiento lo obtuvo con el fertilizante inorgánico Nitrato de amonio.
- En el buen crecimiento de la especie *Chaetoceros gracilis* no influenciaron las bacterias.
- Para la especie *Isochrysis galbana* se observó mejor crecimiento con el fertilizante foliar Blauckorn.
- En el crecimiento de la especie *Isochrysis galbana* no influyeron las bacterias en el crecimiento, la diferencias entre tratamientos fue por la muerte de las células lo que hizo que se incrementará las bacteria.

- Para la especie *Tetraselmis maculata* el mejor crecimiento lo obtuvo con el fertilizante inorgánico Triple superfosfato.
- En el crecimiento de la especie *Tetraselmis maculata* no influenciaron las bacterias.
- En cuanto al uso de fertilizantes inorgánicos (SPT y Nitrato de amonio) y Foliar (Blauckorn) en comparación al tradicional medio Guillar f/2, que es más caro, cualquiera de los tres resulta económico utilizar
- Como recomendación diría que en base a estos datos sería interesante realizar futuras investigaciones empleado la combinación de los fertilizantes inorgánicos para mejorar el crecimiento de las microalgas, porque cada especie nutricionalmente es diferente.
- Emplear siempre las normas de desinfección y asepsia en el manipuleo de las cepas que de allí depende el éxito del cultivo.

ANEXO # 1

Preparación del medio F/2. (Guillartd. 1978)

Soluciones	Cantidad g/l
A	
Nitrato de Sodio (NaNO ₃)	75
Fosfato de Sodio (NaH ₂ PO ₄)	5
Disolver primero los compuestos en 500 ml de agua destilada después enrasarlo a 1L, esterilizar la solución A por 20 minutos a 15 PSI, nutrir las fiolas 1 ml/l.	
B	
Metasilicato de Sodio (NaSiO ₃ .9H ₂ O)	30
Disolver en 500 ml y después enrasarlo a 1 L, esterilizar la solución B por 20 minutos a 15 PSI nutrir las fiolas 1 ml/l.	
C	
Cloruro Ferrico (FeCl ₃)	3.15
Edta di Sódico (Na ₂ EDTA)	4.36
Soluciones de Metales Trazas	g/100ml
Sulfato de Cobre (CuSO ₃ .5H ₂ O)	0.9
Sulfato de Zinc (ZnSO ₃ .7H ₂ O)	2.2
Cloruro de Cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	1
Cloruro de Manganeso (MnCl ₂ .4H ₂ O)	18
Molibdato de Sodio (NaMoO ₄ .2H ₂ O)	0.63
Los metales trazas son preparados en 100 ml de agua destilada independientemente en recipientes forrados con papel aluminio o recipientes ámbar, estos no deben ser esterilizados.	
La Solución C se prepara agregando 1 ml de cada uno de los metales trazas, junto con el cloruro férrico y el EDTA en 500 ml de agua destilada y luego enrasarlo a 1 L, el recipiente a utilizar debe ser ámbar, o forrarlo con papel aluminio, esterilizar la solución C por 20 minutos a 15 PSI, nutrir las fiolas 1 ml/l.	
D	
Tiamina (B1)	20
Cyanocobalamina (B12)	0.1
Biotina (H)	0.1
Estas vitaminas se preparan juntas en 1 l de agua de destilada previamente esterilizada a 20 °C y a 15 PSI, el agua debe estar fría y el recipiente a utilizarse es de tipo ámbar o se forra con papel aluminio, de esta solución stock se coge 10 ml para agregar en 1 l de agua destilada previamente esterilizada y fría también tiene que estar protegida de la luz, de esta solución se va a nutrir las fiolas a 1 ml/l.	
Las cuatro soluciones van a servir para nutrir los cultivos primarios de <i>chaetoceros gracillis</i> , a excepción de la solución C que no se utiliza en los cultivos de los flagelados porque estos no requieren de silicatos para su crecimiento.	
Para los cultivos de 10 l y cultivos externos se utilizan soluciones preparadas con químicos grado técnico, en la solución C se cambia el Cloruro Férrico por Férric Sequestrene.	
Todas estas soluciones una vez preparadas deben estar refrigeradas.	

ANEXO # 2

Preparación de las soluciones de los fertilizantes Inorgánicos y Foliar

Composición Química Elemento (%)	Nitrato de amonio	Triple Superfosfato	Blauckorn
N	33.8	0	12
P ₂ O ₅	0	46	12
K ₂ O	0	0	17
B	0	0	0.05
Cu	0	0	0.04
Mn	0	0	0.01
Zn	0	0	0.02
Mo	0	0	0.05
Preparación (g/l)	36.566	12.85	51.5
Cada solución se prepara en 1 l de agua destilada, nutriendo los carboys a razón de 1 ml/l.			

ANEXO # 3**ANALISIS DE COSTOS DE LOS DIFERENTES FERTILIZANTES****UTILIZADOS**

MEDIO	Costo/litro \$
Guillard F/2	18,98
Blauckorn	0,1023
SPT	0,0019
Nitrato de amonio	0,0082

ANEXO # 4
COSTOS DE DESINFECCION
(20 LITROS)

DESINFECTANTES	Mililitros a usar	Sucres/ml	Sucres/día	Dólares/día
COLORO	2	1.625	3.25	0.000787
THIOSULFATO DE SODIO	2	0.65	1.3	0.0003149
COSTO DESINFECCIÓN 1			4.55	0.0011019
AC. MURIATICO	5	4.25	21.25	0.005149
SODA CAUSTICA	1.5	1.25	1.875	0.000454
COSTO DESIFECCION 2			23.125	0.005603

BIBLIOGRAFIA

Abalde A. & Cid A. & Fidalgo P. & Torres E. & Herrero C. 1995. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Universidad de Da Coruña. 1- 210.

Alexopoulos, C. & Bold H. 1967. Algae and fungi. 368 - 392

Campaña N. 1991. Tópico de desinfección . Apuntes varios.

Clyde M. Simón. 1978. The Cultive of the Diatom of the Diatom *Chaetoceros gracillis* and its use es a food for Penaeid Protozoae Larvae. Aquaculture Vol 14. 105-113.

Flassch, J.P. 1978. Production d'algues unicellulaires a des fins d' aquaculture. Oceanis, 4, fasc. 1, 1-2.

Fritsch F. 1952. The Structure and reproduction of the algae.

Guillard, RRL . & Ryther J. 1962. Studies on marine planktonic diatoms 8:229-239.

Guillar. R. 1978. Cultive of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. En: Culture of Marine Invertebrate Animals. Biology Department, Woods Hole Oceanographie Institution. Massachuselts.29-60.

Hemerick, G. 1973. Mass culture, 255-273, en: Handbook of phycological methods (J:R: Stein, ed). Cambridge University press, London, 448.

Laing I. 1991. Cultivation of Marine Unicellular algae. Lab. Leaflet N° 67. 1-31.

Krueger, R. & Gillman, J. & Coggin. 1973. Introduction to microbiology. 102-175.

Le Borgae Ives. 1989. Culture of micro-algae. Bernabé G. Aquaculture Vol 1. 197-206.

Paniagua J. & Granados M. et al. 1989. Manual de Metodología y Alternativas para el Cultivo de Microalgas. Cicese. Baja California México. 1-60.

Schanz F. & Zahler U. 1981. Prediction of algal growth in batch cultures. Schweiz z. Hydrobiol 43: 103-113.

Trujillo, V. M. 1997. Manual de Técnicas de Aislamiento de cepas de microalgas. Informe Técnico. Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, 29. CTACT9701.

Taub F. 1968. Algae culture as a source of feed.

Uribe, E. 1994. Tecnología de Cultivo de microalga En: 7° Curso Internacional, Cultivo de Moluscos,. Coquimbo, Chile, 16-56.

Velasco, M. 1995. Manual de Cultivo de Fitoplancton, Guayaquil-Ecuador, 1-45.