

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CHLORELLA VULGARIS
EN DIFERENTES MEDIOS BAJO CONDICIONES
DE LABORATORIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

LILIA OLIVIA MUÑOZ BARRUETA

CIUDAD UNIVERSITARIA

1974



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres.

A mis hermanos.

A mi esposo.

Con el mayor respeto y admiración
hago presente mi agradecimiento

Al M. en C. Sergio Palacios Mayorga
por la acertada dirección de este trabajo

A la Dra. Martha Ortega González
por su colaboración en la clasificación
del material utilizado.

Al personal del Instituto de Geología
que me brindó las facilidades necesarias
para la realización del presente trabajo.

	Pags.
I.- INTRODUCCION.	1
II.- REVISION DE LITERATURA.	3
1) Morfología y clasificación.	3
2) Técnicas de cultivo.	6
3) Estudios de aplicabilidad.	12
III.- MATERIALES Y METODOS.	16
1) Colecta y aislamiento de las algas.	16
2) Purificación del cultivo.	17
3) Determinación del medio de cultivo óptimo.	18
A) Medios líquidos.	18
B) Placas de suelo.	22
C) Placas de roca molida.	23
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.	25
V.- CONCLUSIONES.	37
VI.- RESUMEN.	40
VII.- BIBLIOGRAFIA.	41

I.- INTRODUCCION

En los últimos años las investigaciones sobre las algas han ido cobrando un creciente interés, debido a las propiedades que se han encontrado en ellas. En la actualidad - al género Chlorella se le han encontrado entre otras aplicaciones, la de actuar como indicadora de elementos traza contaminantes del agua, en la descomposición de compuestos fenólicos, en estudios sobre el efecto de los herbicidas en el suelo, además de la importancia que está adquiriendo este género en la purificación de aguas de desecho, y en las investigaciones sobre su valor nutritivo.

El género Chlorella ocupa una posición especial entre los otros géneros del orden Chlorococcales. Sus especies poseen células esféricas o elipsoidales, variando su tamaño de 2 a 10 u, muestran un ciclo de vida muy simple, teniendo lugar su reproducción por autosporas. En cuanto a variedad de elementos nutricionales, requieren muy pocos y en cultivos - crecen más rápidamente que otros organismos sobrepasándolos fácilmente (Fott, 1969). Las especies pequeñas de Chlorella han sido consideradas muy similares a las bacterias, tanto - por su tamaño como por su facilidad para crecer en medios -- simples y obtener cultivos puros (Beijerinck 1930). Pero -- cuando son mantenidos bajo variadas condiciones, muestran diferentes formas de crecimiento como respuesta a nutrimentos, pH, vitaminas etc. En cuanto a la distribución del género, se le puede considerar cosmopolita, encontrándose tanto en - aguas dulces como en aguas marinas; algunas especies son - -

aéreas, creciendo en el suelo, cortezas, madera etc., otras especies son endozoicas (14).

El propósito del presente trabajo es el de tratar de contribuir al conocimiento del género Chlorella, mediante el ensayo de las técnicas de cultivo y aislamiento en condiciones de laboratorio, tratando de establecer su óptimo de crecimiento en medios de cultivo líquido y su adaptabilidad a dos suelos diferentes, en éste último caso mediante la estimación de la materia orgánica y el nitrógeno total incorporados.

Se pretende que el presente trabajo sirva como estímulo a futuras investigaciones que ayuden a incrementar el conocimiento y aplicabilidad de estos organismos.

II.- REVISION DE LITERATURA

1) Morfología y clasificación.- El género Chlorella esta colocado en el orden chlorococcales, en la familia - - Oocystaceae y en la sub familia Chlorellidae (Fott 1959). - El género más cercano es Sideroceli (Fott 1934) del cual difiere por presentar una pared celular verrugosa (en Fott - - 1969). En Chlorella vulgaris var. vulgaris Beijerinck, las células son elipsoidales o esféricas, la célula madre aproximadamente esférica, no se gelatiniza durante la formación de esporas. Los cloroplastos tienen forma de copas o de cinturón angosto con aperturas irregulares, poseen diferentes pirenoides que se encuentran cubiertos con gránulos de almidón; presenta vacuolas, algunas veces son numerosas y otras ausentes, conteniendo glóbulos de lípidos en su interior. Se reproduce por 2 a 16 autosporas. Los fragmentos de la pared de la célula madre, son alargados o irregulares según el medio de cultivo, el esporangio mide arriba de 9 u. Se encuentran en suelo, agua y aire.

Chlorella vulgaris fue descrita por Beijerinck en su artículo clásico de "Chlorella y su cultivo", cuya descripción es corta pero se acompaña de esquemas con los cuales puede facilmente ser reconocida según lo menciona Fott (14).

La mayoría de las cepas de Chlorella vulgaris estudiadas por Fott, corresponden a la variedad vulgaris, en la cual la célula muestra una gran diversidad en el tamaño, 2.5-10 u ; los cloroplastos siempre son parietales y sus --

aberturas pueden variar considerablemente, los pirenoides con gránulos de almidón visibles o sin estos, la producción de lípidos o aceites y almidón es también muy variable, así como el número de vacuolas, el de autosporas y el grosor de la pared de la célula. Como cultivo tipo se tiene la cepa original aislada por Beijerinck, mantenida en el Centro de Cultivos de Colecciones de Delft, la cual fue aislada por Beijerinck (No. 211-11b). En esta cepa tipo, la pared de la célula madre es evidentemente en forma de bolsa y las autosporas son liberadas sucesivamente por una apertura, la cual tiene a los lados unas incisiones; finalmente la pared de la célula se rompe en fragmentos, casualmente de cuatro, que pueden ser triangulares, en forma alargada o irregular; estos fragmentos de la pared celular tiene una coloración rojo-rutenio -- que puede ser de acuerdo con Soeder (14) una buena característica de Chlorella vulgaris y de Chlorella III de Kessler (21). El concepto de Chlorella vulgaris var. vulgaris difiere del de Shihira et Krauss. De hecho su C. vulgaris no es toda C. vulgaris como la descrita por Beijerinck, pero es idéntica a C. luteoviridis de Chodat.

Shihira y Krauss han considerado que las respuestas al crecimiento en ambas cepas investigadas, la descrita por Beijerinck y la descrita por Chodat son las mismas. Sin embargo el tipo de C. vulgaris y el tipo de C. luteoviridis -- han sido separados por Chodat en dos especies, esta descripción es válida y hecha de acuerdo con el código y en adición a esto son fisiológicamente diferentes. La concepción de Shihira y Krauss acerca de la taxonomía de C. vulgaris y su

variedad luteovirides, no está aún bien definida.

Kessler et al (22) han demostrado que algunas cepas - que Fott considera de la variedad vulgaris muestran una débil actividad de la hidrogenasa, lo cual es una característica de C. fusca, pero no de C. vulgaris. La actividad de la hidrogenasa es una característica muy importante en la taxonomía de Chlorella, pero como en la variedad vulgaris esto no está relacionado con alguna diferencia estructural, (ellos consideran a estas cepas con la capacidad de ser una forma bioquímica de la var. vulgaris y proponen que se designe en forma tertia, forma nova. Esta forma es idéntica a Chlorella III según Kessler et al. El mismo autor concluye, que la presencia de hidrogenasa en Chlorella es evidencia de su edad filogenética. Generalmente las algas y las plantas superiores han perdido la capacidad de usar la hidrogenasa para la reducción del CO₂. Algunas especies de Chlorella han perdido completamente la actividad de la hidrogenasa por ejemplo C. luteovirides. Sin embargo C. vulgaris con excepción de la variedad vulgaris forma tertia o forma nova, solo han perdido en parte esa capacidad.

El criterio fisiológico y bioquímico sobre la actividad de la hidrogenasa, formación de carotenos secundarios (astaxantina y cantaxantina) y la tolerancia a la acidez, han sido utilizadas también por E. Kessler (21), (22), (23) para su clasificación.

La otra forma fisiológica de la variedad vulgaris, pudo ser una cepa aislada por Chodat y nombrada por él C. vul-

garis var. viridis. Shihira et Krauss la consideran C. infusionum Beijerinck caracterizada por las siguientes respuestas de crecimiento: Con glucosa se estimula grandemente, con galactosa solamente en presencia de la luz, la manosa inhibe el crecimiento fuertemente en presencia de la luz, los acetatos promueven el crecimiento en presencia de la luz pero no en la obscuridad.

Sin embargo, hay algunos hechos morfológicos y estructurales que distinguen la cepa de Chodat 211 - 12, en el cultivo de la colección Cambridge, de la variedad vulgaris. La pared celular es insignificadamente más gruesa. En cultivo las células grandes son dos veces más grandes que las células vegetativas normales (arriba de 12 u.) y están llenas de una gran vacuola, la cual presiona el protoplasto hacia la pared de la célula. Estas células son capaces de reproducirse formando irregular número de autosporas algunas veces de tamaño desigual. El número de autosporas es mayor que en la variedad vulgaris forma vulgaris. Fott piensa que esta cepa sea colocada en una unidad taxonómica inferior en el rango de variedad y la llamarían var. vulgaris forma viridis - - (Chodat comb. nova (14).

Andreeva (3) considera que el tamaño de las células - para ser empleado en Taxonomía, depende de la composición y concentración de las sales en el medio de cultivo inorgánico, de las condiciones del cultivo, de la cepa a la que pertenece, de sus características individuales y de la edad del cultivo.

2) Técnicas de Cultivo.- Los primeros investigadores que cultivaron el género *Chlorella* fueron: Beijerinck 1890, Kruger 1894, Artari 1902 y Chodat 1909, estudiaron las especies aisladas por métodos fisiológicos, llegando a dar descripciones morfológicas. Consideraban que las características más seguras para la identificación de la especie, son observaciones tales como: que el azúcar fue la mejor fuente de carbono, o cuales compuestos nitrogenados estimulan el crecimiento heterotrófico; sus experimentos fueron acompañados por detalles sobre el color del cultivo y apariencia de la colonia en el agar. Beijerinck consideraba que el crecimiento de *C. vulgaris* se ve estimulado por la glucosa. Warburg se ocupó también de estudiar la taxonomía de *Chlorella* ya que esta alga desde entonces ha sido empleado en muchos experimentos de fisiología y bioquímica. En 1949 Bold preparó un medio para el cultivo de *Chlorella*, conocido como medio basal de Bold, el cual ha sido empleado comúnmente por Fott y sus seguidores en sus investigaciones taxonómicas (14).

Chlorella ha sido cultivada en muy diversos medios, incluso con una alta radioactividad, en una atmósfera de C^{14} , Karpov (20) reporta que hay un incremento en el peso del cultivo, cuando la mitad del CO_2 de la atmósfera es marcada con C^{14} .

Agse et al (2) emplea para su cultivo soluciones preparadas de aguas de desecho humanas mineralizadas, en estas soluciones libres de sustancias tóxicas y corregidas conve-

nientemente las sales minerales, las ha usado para cultivos intensivos de Chlorella. Otro medio de cultivo es preparado con agua mineral colectada en primavera en la "Roupit" localizada cerca de Petrich, (Bulgaria). El agua mineral contiene una gran cantidad de hidrocarburos que dan una acción amortiguadora que estabiliza el pH, mientras la densidad de la suspensión aumenta, Dilov et al (11).

Von Then Loung et al (48), reportó la obtención de células gigantes de C. vulgaris que fueron cultivadas en medios de glucosa, mantenidos en la obscuridad por un período de 10 a 14 días, con capacidad de división y de producción de pigmentos, pudiendo recuperar su actividad fotosintética.

Según Dilov et al (9) se pueden obtener muy buenos cultivos con temperaturas que pueden variar de los 20° a los 40° C.

Las condiciones más favorables para mantener un cultivo de Chlorella por varios meses, es almacenándola en tubos con medio agarizado a una temperatura de 4° a 6° C. y el medio cubierto con una capa de agua estéril, Pimenova et al, (35).

Los cultivos de Chlorella por lo general están acompañados de una flora bacteriana abundante, que en algunas ocasiones llega a producir un decremento en los cultivos de ésta.

Pimenova et al (35), (36), realizaron estudios para determinar toda la flora que se encuentra en un cultivo de Chlorella, encontrando que los organismos formadores de esporas

que acompañan a Chlorella, están representados por bacterias del género Bacillus, siete formas fueron aisladas pertenecientes a tres especies: B. mesentericus, B. megaterium y B. pseudotetanicus; mientras que las formas dominantes que no estaban en esporulación fueron: Pseudomonas, Mycobacterium, Flavobacterium y Micrococcus.

Lit Chfield et al (27) reporta también como microflora acompañante a los géneros Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium y Bacillus. Matusiak et al (30), reporta un grupo de bacterias gram-negativas pertenecientes al género Pseudomonas de los grupos II, III y IV.

Todos los autores que han hecho estudios sobre la flora bacteriana de Chlorella, están de acuerdo en que el género Pseudomonas es el más frecuente, por lo que se le puede considerar característico de los cultivos de Chlorella.

En la revisión bibliográfica se habla de experimentos realizados con cultivos puros, pero al no mencionarse las técnicas de aislamiento del cultivo y siendo este, uno de los puntos del trabajo, nos parece pertinente mencionar a continuación la técnica empleada por Acorinti (1) para el aislamiento de Senedemus obliquus y que fue la empleada por nosotros para Chlorella durante el presente trabajo.

Otro de los factores de primordial importancia en el cultivo de algas, es la proporción de los macro y micronutrientes en los medios de cultivo.

Desde los primeros cultivos puros de algas efectuados por Beijerinck (14) la mayoría de los investigadores han coinci-

dido en clasificar a los elementos nutricionales de las algas como sigue:

Macronutrientes : C, H, O, N, P, S, Ca, Mg, K y Fe.,
elementos menores imprescindibles: Fe, Cu, Zn, Mn, Co, y Mo.,
y elementos traza como por ejemplo: Li, Al, I, Ti, Sn, y V,
(38).

Otros autores consideran además la existencia de factores de crecimiento tales como vitaminas B₁, B₁₂ o Biotina y algunos aminoácidos específicos que estimulan de manera especial, el crecimiento de algunas especies (38).

Se ha estimado que el 70% de las especies de algas planctónicas requieren de vitamina B₁₂ (38).

Richardson (41) encontró, que cuando se hacen cultivos en los cuales se reduce el N, baja la producción de Oxígeno, el gasto de CO₂, la clorofila y la producción de tejidos son drásticamente reducidos, pero el contenido total de lípidos no es alterado en sus valores calóricos. El nitrógeno celular puede faltar en un 3% del peso seco, más sin embargo puede ocurrir un incremento en el sistema de lípidos. Pinevich (37) reporta que cuando es eliminado el Mg del medio de cultivo, disminuye el grado de heterogeneidad de la proteína total, incrementando el número de formas moleculares, de enzimas e induce a la formación de fosfatos alcalinos; estos síntomas pueden desaparecer después de diez días de cultivar el alga en medio nutritivo completo.

Variando la cantidad y la fuente de N, Salageanu (45) obtuvo un óptimo de producción en la biomasa, probando varios tipos de medio nutritivo para G. vulgaris y Scenedesmus acutiformis;

empleó medio de Knop y diferentes concentraciones de urea y de nitrato de amonio, determinando además de la biomasa la intensidad fotosintética, llegó a la conclusión de que el mejor medio era aquel en el que se empleó urea y nitrato de amonio a una concentración de 0.6 gr/l y de 0.15 gr/l respectivamente.

Kostlom et al (25) sostiene que las altas concentraciones de P en el medio, favorecen el contenido de vitaminas solubles en los cultivos de Protococcales.

Fogg (15) señala las características del crecimiento algal, en cultivos de volumen limitado, considerando que un medio conteniendo los elementos nutritivos necesarios, orgánicos o inorgánicos, puede ser inoculado con un relativamente pequeño número de células y puesto en buenas condiciones de luz, temperatura y aereación, nos dará un incremento en el número de células, siguiendo un patrón característico en el cual se reconocen las siguientes fases: (I) fase lag o -- de inducción, en la cual no incrementa el número de células. (II) fase exponencial, en la cual la multiplicación de las células es rápida y el número se incrementa en progresión -- geométrica. (III) fase de declinación con crecimiento relativo. (IV) fase estacionaria y (V) fase de muerte.

El hecho de que en volúmenes limitados cesen su crecimiento exponencial, se debe a varios factores: 1) agotamiento de nutrientes: por ejsm. las algas que tienen requerimientos orgánicos para su crecimiento tales como vitamina B₁₂, pueden tener un período de crecimiento limitado por su falta.

tores, 2) suministro de CO_2 u oxígeno, en cultivos estáticos en un medio mineral en el cual, la tasa de difusión del CO_2 dentro del cultivo es limitado, conduciendo a una relativamente baja densidad de población. 3) alteraciones del pH en el medio como resultado de la absorción preferencial de algunas partículas del medio. Comúnmente el nitrógeno es suministrado como una sal de amonio, la absorción preferencial del ion amonio, produce en el medio bastante acidez durante el crecimiento. La absorción del ion nitrato produce un incremento de pH, pero esto es amortiguado en el medio tomando más dióxido de carbono. 4) reducción de la intensidad de la luz por el cultivo mismo, debido a la densidad del del cultivo. 5) autoinhibición, hay claras evidencias de que ciertas algas, producen sustancias tóxicas para ellas mismas en el curso de su metabolismo, esto puede romper el crecimiento exponencial (15).

3) Estudios de aplicabilidad.- Sivko et al (47), (48) Polyanichka (39), Hermenik (17), han estudiado a Chlorella vulgaris como uno de los microorganismos, entre otros, que intervienen en la purificación de aguas de desecho, así como la simbiosis de algas y bacterias para remover y conservar los nutrimentos dentro de las aguas de desecho, lo cual se logra através de procesos fotosintéticos y de aireación en tanques biológicos de diferentes profundidades.

Entre los trabajos que reportan a Chlorella vulgaris como fuente alimenticia, tenemos al de Ogutu et al (32) que realizó estudios sobre una dieta de Chlorella fermentada en relación

la flora fecal de cuatro puercos y comparándola con una dieta comercial anterior; al cabo de 2 semanas habían disminuido en la flora bacteriana fecal los siguientes grupos de bacterias: Streptococci, Veillonellae, coliformes y Estafilococci. En la tercera y cuarta semana, se observó un incremento considerable en cuanto a Pediococci ocurriendo algunos cambios en el interior del tracto digestivo que permitieron a estas bacterias su supervivencia. La dieta con Chlorella fermentada, no ejerce influencia en cuanto a la cantidad de Lactibacilli, bacteriales y bifidobacteriales anaerobias y en particular a Paptostreptococcus elsdensi que fueron encontradas.

Krilenko (24) ha hecho estudios en Tilapia mosambica alimentándola con Chlorella vulgaris, encontrando que estos peces tienen un mejor desarrollo que el grupo testigo.

No solo ha sido empleada Chlorella en experimentos con animales, ya que en el Japón se ha suministrado, extracto de ésta, en cantidad de 30 mg. durante 100 días, a una población estudiantil, observándose el efecto en el grupo CGF (Factor de Chlorella promotor del crecimiento) en él vieron que la velocidad de crecimiento de los niños de 5o grado en relación con los testigos, fue más grande. Fujimoto et al (16). Camerón et al (8) reporta en suelos del antártico a C. vulgaris como la única alga verde encontrada en esa región; sus estudios con el microscopio electrónico son de valor en las investigaciones microbiológicas de asociaciones de algas y suelos.

Bailey et al (5) empleó Chlorella, Nostoc y Oscillatoria, -- para medir la estabilidad al agua de los agregados del suelo. Encontró que cada alga incrementa significativamente, el porcentaje de agregados del suelo después de seis semanas de incubación; los agregados formados por Nostoc y Oscillatoria, - de 1000 a 2000 u de diámetro son estables al agua, para -- Chlorella los agregados estables son de 500 a 100 u, mientras que en el suelo control los agregados estables son menores de 295 u.

En la detección de elementos traza en grados contaminantes, Chlorella se comporta de diferentes formas, Shiel (46) considera que el Hg interviene en la regulación del K, cuando se encuentra en niveles de 2 u molas de hg/l, estimula sin afectar el nivel interno de K, pero cuando se adiciona HgCl - en un nivel de 8 u molas de Hg/l., causa un rompimiento en la permeabilidad de la membrana de Chlorella, que se indica por influjo neto de K interno.

Nollendorff (31) encontró que a concentraciones de Cr arriba de 0.5 mg/l, el crecimiento del cultivo se ve inhibido y baja la productividad. Las dosis tóxicas de Cr en el medio -- nutritivo, dan como resultado un decremento considerable en las proteínas de las células, causando además la destrucción de la clorofila.

Con relación a la capacidad que tiene esta alga para la descomposición del fenol. se ha visto que se realiza en cultivos puros y mezclados. Los procesos biológicos de las algas pueden descomponer el fenol, pero sólo a ciertas concentraciones; alajo de 500 mg/l se pueden adaptar, lo pueden des--

componer a 1000 mg/l, en cambio en concentraciones de 1500 - mg/l en la mayoría de los casos son letales para las algas. Muchas veces los cultivos combinados de algas y bacterias -- con capaces de descomponer más eficazmente el fenol que en - cultivos puros, Sivko (47).

Los herbicidas desempeñan un papel muy importante en la eliminación de malezas, pero cuando son empleados en fuertes -- cantidades, no sólo afectan a estas sino a toda la comunidad; a este respecto ha sido observada la acción de algunos herbicidas tales como: Nitribuzin, Triazina y Cyclohexil sobre varias especies de algas del suelo en cultivos líquidos, agregándose 0.05, 0.10, 0.50 y 1.0 p.p.m. de los herbicidas; pudo observarse que Anabaena no fue afectada a 0.05 ppm, pero no creció en las siguientes concentraciones. Chlorella y - - Clamvdomonas no pudieron crecer en presencia de 0.5 ppm de Nitribuzin y Cyclohexil. Pero de ambas, las Clamvdomonas son más afectadas por los herbicidas, en tanto que Chlorella es más resistente, Arvik et al (4). •

III.- MATERIALES Y METODOS.

1) Colecta y aislamiento de las algas.- Sobre la carretera Cuernavaca-Cuantla a l.250 m.s.n.m., lugar que corresponde a la antigua falla del Cañón de Lobos del grupo de fallas post-cretácicas; dicha falla, tiene rumbo hacia el noroeste, por una distancia de cuando menos 12 km. a través del anticlinal de Tecumán (1) Fries.

Se colectaron en el km. 19.5 las muestras de roca caliza, que presentaron crecimiento algal visible, las muestras de roca se encontraban aflorando. Para la colecta se utilizaron frascos estériles.

Cultivo mixto o imperfecto.- Se tomó asépticamente una pequeña porción del raspado de las muestras de roca, como inóculo y se depositó en tubos con medio Detmer líquido (1), a pH de 8.5 previamente esterilizado. Los tubos se incubaron a temperatura de 22° a 25°C; utilizándose lámparas fluorescentes de 40 Watts, a una distancia de 15 cm. Aproximadamente cada 10 días se hicieron resiembras, utilizándose el método del centrifugado para eliminar la contaminación bacteriana (1).

Cultivos Sólidos.- A partir de los cultivos líquidos de la última transferencia, se prepararon diluciones 1:10 y 1:1000, de cada dilución se tomó 1 ml. como inóculo para cajas Petri con medio Detmer sólido a pH 7.0, el inóculo fue distribuido homogéneamente en la placa y se incubó en las mismas condiciones que los cultivos líquidos.

Cultivos Unialgales.- Estos cultivos se obtuvieron mediante resiembras sucesivas de medios sólidos a líquidos y de líquidos a sólidos, seleccionando como inóculos a las colonias más aisladas y características.

2) Purificación del cultivo.- Para tratar de eliminar las bacterias acompañantes del cultivo, se emplearon dos métodos, uno consistió de lavados y centrifugados sucesivos y en el otro se adicionó antibióticos directamente al medio de cultivo.

Tomando como referencia el método reportado por Acorinti (1) para la eliminación de bacterias en un cultivo de algas, se hicieron pruebas preliminares, en las cuales la muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 10, 15 y 20 min. en tres ocasiones, encontrándose que el cultivo centrifugado durante 15 min., fue el más adecuado para este fin, repitiéndose la operación como sigue:

Se centrifugaron 2 ml. de la muestra diluida en 6 ml. de agua destilada en condiciones estériles, se decanta el sobrenadante, y el conglomerado de células se resuspende en 8 ml. de agua destilada estéril, repitiéndose tres veces la operación. En el último lavado, la muestra se sembró por cuadruplicado en tubos de ensayo que contenían 10 ml. de medio Detmer original, inoculando con 1 ml cada tubo bajo condiciones estériles; de estos tubos se hicieron tres siembras en placas de gelosa simple por quintuplicado, colocando 1 ml por placa, la primera fue hecha inmediatamente después del tratamiento, la segunda a mediados de la edad del cultivo (9 días)

y la tercera a los 18 días de incubación, sembrando junto con estos un testigo.

En el segundo método se empleó estreptomycin agragada en dosis de 100, 80, 60, 45, 30 y 15 microgramos por ml. de medio de cultivo.

Los cultivos que contenía cada una de las diferentes dosis fueron inoculados de la misma forma que los anteriores, y también en este caso se hicieron tres siembras de la misma forma que para la muestra centrifugada.

3) Determinación del medio de cultivo óptimo. Para la obtención del medio óptimo (en el que se obtiene la máxima población) se utilizaron los medios de cultivo que a continuación se enumeran:

A) Medios Líquidos.- Se prepararon diferentes medios de cultivo, teniendo como base el medio de Detmer original y el Detmer modificado reportado por Acorinti (1) a los cuales se les hicieron algunas variaciones.

MEDIOS	PROCEDIMIENTOS
Detmer líquido original:	Nitrato de calcio 1.00 g/l de agua destilada
	Fosfato monopatásico 0.25 g/l " " "
	Sulfato de magnesio 0.25 g/l " " "
	Cloruro de potasio 0.25 g/l " " "
	Cloruro de fierro vestigios

Detmer líquido modificado con micronutrientes (1)

Detmer líquido original con urea:

En este caso, la fuente de nitrógeno fue urea en lugar de nitrato de calcio esterilizado en autoclave.

Detmer líquido modificado con urea:

Se substituyó el nitrato de calcio por urea.

Detmer líquido original con urea filtrada;

Se cambio la fuente de nitrógeno en igual forma, pero a diferencia del medio anterior, se esterilizó haciéndolo pasar por un filtro milipore, - Gelman Matricel con un poro de 0.020 u.

Detmer líquido original sin nitratos:

Se substituyó el nitrato de calcio por sulfato de calcio.

Detmer líquido original sin potasio:

Se substituyó el cloruro de potasio y el fosfato de potasio por cloruro de sodio y fosfato de sodio.

Detmer líquido original sin fósforo:

En el cual fue substituido el fosfato monopotásico por cloruro de potasio en la misma proporción.

Detmer líquido original sin magnesio:

Se prepararon dos medios, en uno de ellos se substituyó el sulfato de magnesio por el -- sulfato de calcio y en el otro por sulfato de amonio.

Detmer líquido original con sulfato de Amonio:

Se substituyó el nitrato de - calcio por el sulfato de amonio.

Detmer líquido modificado -- sin nitratos:

Se substituyó el nitrato de - calcio por sulfato de calcio.

Detmer líquido original con vitamina B1

Vitamina B₁ (Carnot) a una concentración de tres microgramos por litro.

Detmer líquido original con vitamina B12.

Se usó la misma concentración que la anterior (vitamina B12 Carnot). Fogg (15).

Medio basal Bold; usado por Foot (14) para el cultivo de Chlorella.

Detmer líquido original con períodos de luz y obscuridad de 8 horas.

Medio a base de extracto de roca.

Se preparó de la siguiente -- forma: De las rocas colectadas, una vez limpias y moli--

das se tomaron 50.0 gr. colocándoles en 250 ml. de agua destilada agitando por espacio de 5 min. cada 24 horas, durante 5 días; al cabo de los cuales se extrajo la solución mediante centrifugación hasta obtener el líquido totalmente transparente, lo cual se logró después de 4 centrifugadas consecutivas a 8000 rpm durante 5 minutos.

Para los cultivos de medios líquidos, se utilizaron tubos de ensayo de 200 X 25 mm., colocando, en todos los casos 20 ml. de medio. La esterilización se llevó a cabo en autoclave, a 15 libras de presión durante 20 minutos.

En todos los medios de cultivo, se ajustó el pH a la neutralidad, utilizando KOH o HCl según fuera necesario.

Las inoculaciones siempre se hicieron a partir de un cultivo madre de 10 días, crecido en medio Detmer original líquido, colocando en todos los casos, 2.0 ml. de inóculo.

Para la incubación de los cultivos, se utilizó una cámara con temperatura aproximada de 28° C, provista de una lámpara fluorescente de 40 watts y colocada a 15 cm. de distancia de los cultivos, con una iluminación equivalente a los 1200 lux.

En base a los resultados obtenidos en cada medio de cultivo, se elaboraron tablas de población y curvas de crecimiento; para

lo cual, se determinó por duplicado, el número de células algales/mm³ cada tercer día durante un período de 18 días utilizándose para la cuenta una cámara de Neubauer.

En cada uno de los cultivos anteriores, se determinó el tamaño de las algas, utilizando para ello el objetivo de 40x de un microscopio marca Wild, reportándose en cada caso el promedio de 100 células medidas.

B) Placas de suelo.- Con el fin de observar la adaptabilidad de Chlorella al suelo, fueron preparadas placas de dos suelos con propiedades diferentes:

Suelo 1 virgen, colectado en la carretera al Desierto de los Leones km. 29, a 0 - 30 cm. de profundidades.

Suelo 2 cultivado, colectado en las áreas circundantes al ex-Lago de Texcoco, Chapingo Méx.

A cada suelo, una vez sacados al aire y tamizados por la malla 18, se les determinó:

- a) Textura. Método de Bouyoucos (7) (43).
- b) Reacción del suelo por el método potencimétrico, con un potenciómetro Beckman Zeromatic, con una dilución de suelo de 1: 2.5 (19).
- c) Materia orgánica por el método de Walkley y Black (49) (17).
- d) Nitrógeno total por el método de Kjeldahl (40).
- e) Nitratos por el método del ácido fenol disulfónico - - (40) (44).
- f) Sodio y Potasio por flamometría. Flamómetro.
EVANS.
- g) Magnesio. Por absorción atómica espectro fotometro de absorción atómica Perkin-Elmer Mod. 403.

h) Fosforo. Poerel método del color azul molibdo fosfórico
(33).

Una porción de cada suelo fue esterilizada en autoclave, durante una hora a 120 ° C. Se prepararon placas tanto de suelo estéril como de no estéril, colocando 10 gr. de suelo en cada caja de petri (por duplicado). A cada placa se le fue adicionando 1 ml. de inóculo procedente de un cultivo de 10 días en medio de Detmer urea.

Se les ajustó la humedad a un 50-60% de capacidad de campo y se incubaron en la misma forma que los cultivos líquidos, cada tres días se les reajustó la humedad utilizando agua destilada estéril.

El crecimiento de las algas en las placas se estimó como sigue:

- a) En forma directa o visual.
- b) Cuantificando la materia orgánica y el nitrógeno total incorporados, tanto en las placas inoculadas como en las placas testigo, después del período de incubación (20 días).
- c) Placas de roca molida.- Rocas calizas procedentes del mismo sitio de donde fue aislada la cepa, una vez libres de residuos orgánicos y superficies intemperizadas, fueron molidas y pasadas por tamices de mallas: 120, 80, 60 y 35. De cada fracción se prepararon placas en forma idéntica a como fueren preparadas las -- placas de suelo.

NOTA: En los experimentos con vitaminas y fotoperiodicidad, los cultivos se hicieron en tubos de ensaye - de 15 X 150 mm. a diferencia de los demás experimentos en los cuales se emplearon tubos de 25 X - 200 mm.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.

Con el método del lavado y centrifugado que se empleó para tratar de aislar los cultivos de algas de la flora bacteriana, se obtuvieron los siguientes resultados: (cuadro 1).

La población bacteriana de los cultivos de Chlorella -- en las placas de Gelosa durante el punto inicial del experimento, fue ligeramente menor a la del cultivo testigo. A los 9 y 18 días de incubación no se observó ninguna disminución en la población bacteriana, es decir, el desarrollo bacteriano resultó ser en estos dos períodos de incubación, igual tanto en los medios lavados y centrifugados como en los testigos no lavados ni centrifugados.

Es evidente que aunque este método disminuye ligera o momentáneamente la flora bacteriana, produce en forma bastante apreciable, un incremento de la población de Chlorella en comparación con los medios testigos no tratados, esto nos hace suponer que quizá los lavados y movimientos recibidos, hayan estimulado su crecimiento.

Las pruebas que se efectuaron con antibióticos, nos llevan a considerar que las dosis aplicadas de 30 a 60 ugr. por ml, son eficaces para eliminar en gran parte la flora bacteriana que acompaña a los cultivos de Chlorella, sin embargo las algas se vieron notablemente afectadas con todas las dosis de antibióticos aplicados, como se pueden ver en el cuadro 2. En la dosis de 80 ugr. por ml. el incremento en la población de Chlorella fue muy poco significativo y resultó nulo en la de 100.

Según los resultados obtenidos, se puede apreciar que aunque este método es efectivo para la eliminación de una gran parte de la flora bacteriana, también afecta notablemente a Chlorella, disminuyendo su población.

Otro experimento que se realizó fué el de eliminar en algunos medios de cultivo, algunos nutrimentos o bien cambiar la fuente de estos, con el fin de conocer la respuesta de Chlorella a diversas condiciones.

En relación a las variaciones que se hicieron al medio Detmer original, obtuvimos como óptimo para su crecimiento en cuanto a población, al medio Detmer modificado, como se puede apreciar en el cuadro 3 y gráfica 1, ya que fue el medio en el que se encontró el más alto número de células por mm³.

El Detmer urea esterilizado por medio de filtración, junto con el Detmer original con sulfato de amonio en lugar de nitrato de calcio, fueron los medios con los cuales se obtuvo el tamaño promedio de células más grande que fue de 8.7 y 8.4 u respectivamente. Probablemente debido a que estas fuentes de nitrógeno, sean más fácilmente aprovechables por las células. Tanto el tamaño promedio como la población, fueron ligeramente menores en el medio Detmer urea esterilizado en autoclave, cuadros 3 y 4 y gráfica 5, lo cual nos hace pensar en que existe una ligera descomposición de la urea por este método de esterilización.

En el cuadro 3 y gráficas 2y5, se aprecia como varía la población de Chlorella de acuerdo a la ausencia de ciertos nutrimentos en el medio de cultivo.

La población más baja se encontró en los medios carentes de Mg, los cuales tenían sulfato de calcio y sulfato de amonio en lugar de sulfato de magnesio; esto lo podemos observar en la gráfica 2 y cuadro 3. Se sabe que el Mg juega un papel muy importante en todos los vegetales, y el hecho de eliminarlo en el medio, no solo afectó su fotosíntesis sino que el crecimiento de la población se vio muy limitada.

La eliminación del nitrógeno en el medio, da por resultado una notable baja en la población, como se observa en las gráficas 1 y 2; esto nos demuestra que Chlorella es capaz de crecer en medios carentes de nitrógeno y aprovecharlo en cualquier forma en la cual se encuentre, ya sea como amonio, urea o nitratos; de estas fuentes de nitrógeno la urea estimuló más el crecimiento de la población (cuadro 3).

La ausencia de potasio produjo un efecto muy similar al que produjo la carencia del magnesio en el cultivo.

La eliminación de este elemento se refleja en un bajísimo crecimiento de la población, como se puede observar en la gráfica 2 y cuadro 3, en donde la población no llega ni a la mitad de la obtenida en el testigo.

La carencia de Fósforo produjo un efecto menos drástico que la carencia de magnesio, potasio y nitrógeno, sin embargo la población fue casi un 50 % menor que la del Detmer original (testigo).

Con el extracto de roca se obtuvo una población ligeramente superior al 50 % de la obtenida en el medio Detmer original (tes-

tigo), esto quizá pudo haberse debido a la poca cantidad de potasio y a la carencia de nitratos, como se aprecia en la gráfica 3 y cuadro No. 5. Sin embargo el alga tubo buen crecimiento, con lo cual se confirma que Chlorella tiene un gran poder de adaptación a cualquier tipo de medio, aún con carencia de nitrógeno disponible. Las curvas que se realizaron con carencia total de nitrógeno, nos dan la idea de que quizá el alga puede asimilar en parte, el nitrógeno atmosférico, ya que su crecimiento en estas condiciones no fue ciertamente el más bajo.

El medio Detmer modificado, constituyó el óptimo para el desarrollo de la población, sin embargo las células tuvieron un promedio de tamaño de 4.1 u en relación al Detmer original que fue de 6 u; tal vez la elevada población establezca una especie de competencia por espacio, oxígeno y nutrimentos que conduzcan a una disminución en el tamaño de las células.

En el medio Detmer modificado y los medios carentes de nitrógeno, se obtuvieron las células de menor tamaño promedio, 4.1, 3.9 y 3.4 u (tabla 4).

La carencia de fósforo y potasio no fue significativa en cuanto a disminución en el tamaño de las células.

Por lo que al magnesio se refiere, su carencia no disminuyó en lo absoluto el tamaño de la célula, pues como se reporta en la tabla 4, el tamaño promedio de los más elevados, 8.4 u, se obtuvo en un medio carente de magnesio.

Con el experimento de fotoperiodicidad cuadro 3 y gráfica 4, se pudo comprobar que la luz continua durante todo el período de incubación, lejos de afectar a los cultivos en

Detmer original, los estimula grandemente. La población obtenida con períodos de luz y obscuridad alternados, escasamente llegó a un 50 % de la obtenida con luz continua.

Se hicieron también pequeñas pruebas para ver que influencia tiene el estímulo vitamínico sobre el crecimiento de Chlorella, encontrándose la mejor respuesta, a la presencia de la vitamina B₁, habiendo producido en este caso, el mayor incremento en la población, en relación al testigo. Por otra parte la vitamina B₁₂ casi no ejerció ningún efecto en la población con respecto al testigo, como se vé en el cuadro 3 y gráfica 6.

En el medio Bold encontramos que el período de duración del cultivo es inferior al de Detmer y el tamaño promedio de las células es menor al de éste, aparentemente el medio Bold estimula en un principio a las células, pero la curva decae más rápidamente (gráfica 7 y cuadro 3).

Durante el experimento de cultivo de Chlorella en placas de suelo, se encontró que el incremento en la materia orgánica co responde en todos los casos, a un aumento en el crecimiento de Chlorella, tanto en placas de suelo estéril como no estéril, pero siendo mayor en este último (cuadro 6). Lo mismo pudo apreciarse al determinar el de nitrógeno total, aunque en forma menos significativa.

De los análisis practicados a los suelos utilizados, se vió una marcada diferencia en sus propiedades (cuadro 5), los nutrientes se encontraron en mayor proporción en el suelo de Texcoco. Esto nos explica el hecho de que se haya encontrado

una mejor adaptación de las algas a éste suelo, que al suelo de la Carretera al Desierto de los Leones, como pudo observarse a simple vista. Podemos considerar que Chlorella tiende a crecer mejor a pH alcalino y que la elevada concentración del sodio no limita su crecimiento (cuadro 6).

En las placas de roca molida, de donde fue originalmente aislada el alga, se observaron los siguientes resultados: fue posible ver el crecimiento a simple vista en la roca tamizada 120 y 80 mallas, apreciándose áreas totalmente verdes, mientras -- que en las de partículas más gruesas, el desarrollo fue decreciendo. Se encontró, por tanto, que el tamaño óptimo de partícula para su crecimiento se encuentra entre 0.190 y 0.125 mm., lo cual puede confirmar el hecho de que también se haya obtenido el máximo crecimiento en el suelo de textura arcillosa.

CUADRO 1 Efecto de la técnica del lavado y centrifugado sobre la flora bacteriana acompañante de Chlorella, expresado en No. de células/ml de medio.

Medio de cultivo	D í a s d e i n c u b a c i ó n					
	0		9		18	
	Bacterias	Algas	Bacterias	Algas	Bacterias	Algas
Detmer modificado centrifugado	1700	8000	#	43500	#	36000
Detmer urea centrifugado	1700	7000	#	28000	#	17500
Detmer modificado no centrifugado	1840	8000	#	18000	#	12000
Detmer urea no centrifugado	1938	11000	#	16000	#	9600

Arriba de 700 000

CUADRO 2 Efecto de la estreptomycin sobre la flora bacteriana acompañante de Chlorella en medio Detmer original, expresado en números de células por ml de medio.

Concentración del antibiótico ugs/ml de medio	D í a s d e i n c u b a c i ó n					
	0		9		18	
	Bacterias	Algas	Bacterias	Algas	Bacterias	Algas
100	0	9000	0	9000	0	5000
80	1	7000	0	8000	0	6000
60	4	11000	0	16000	0	9500
45	4	7000	0	1300	0	8000
30	6	8000	35	12000	0	7000
15	6	8000	30	13000	25	8000
Testigo	90	9000	300	138 000	800	63000

CUADRO 3 Cuadro comparativo del crecimiento de Chlorella en diferentes medios de cultivo, número de células por mm³.

Medio de cultivo	Días de incubación.								
	1	2	5	7	9	11	13	15	17
Detmer urea filtrado	21000	65000	105000	180000	300000	630000	395000	250000	240000
Detmer urea	40000	60000	115000	380000	590000	400000	225000	1750000	140000
Detmer modificado urea	22000	45000	610000	113000	395000	290000	260000	240000	195000
Detmer modificado.	34000	54000	130000	395000	775000	740000	710000	660000	510000
Detmer modificado s/N	23000	48000	52000	60000	73000	66000	61000	39000	28000
Detmer original s/ N	19000	34000	48000	53000	58000	83000	118000	78000	63000
Detmer original s/ K	9000	10000	11000	17000	22000	49000	36000	32000	28000
Detmer original s/ P	9000	15000	32000	47000	92000	210000	10000	102000	94000
Detmar s/Mg (NH ₄) ₂ SO ₄	8000	17000	19000	21000	29000	35000	30000	17000	14000
Detmer s/Mg c/ CaSO ₄	8000	9000	95000	12000	27000	27000	25000	18000	13000
Detmer c/(NH ₄) ₂ SO ₄	8500	12000	37000	56500	91000	180000	145000	110000	80000
Extracto de roca	8000	12500	35000	55000	108000	220000	345000	235000	132000
Detmer ori-	8000	11500	46000	135000	138000	260000	190000	160000	130000

Detmer modificado s/N	23000	48000	52000	60000	73000	66000	61000	39000	28000
Detmer original s/ N	19000	34000	48000	53000	58000	83000	118000	78000	63000
Detmer original s/ K	9000	10000	11000	17000	22000	49000	35000	32000	28000
Detmer original s/ P	9000	15000	32000	47000	92000	210000	10000	102000	94000
Detmar s/Mg (NH ₄) ₂ SO ₄	8000	17000	19000	21000	29000	35000	30000	17000	14000
Detmer s/Mg c/ CaSO ₄	8000	9000	95000	12000	27000	27000	25000	18000	13000
Detmer c/(NH ₄) ₂ SO ₄	8500	12000	37000	56500	91000	180000	145000	110000	80000
Extracto - de roca	8000	12500	35000	55000	108000	220000	345000	235000	132000
Detmer original #	8000	11500	46000	135000	138000	260000	190000	160000	130000
Detmer original	26000	62000	141000	375000	555000	340000	290000	200000	180000
Medio Bold	28000	55000	110000	150000	273000	312000	162000	90000	50000

Curva hecha con períodos de luz y obscuridad.

CUADRO 4 Tamaño de las células de Chlorella en diferentes medios de cultivo líquidos a los 10 días de incubación

Medio de cultivo	Tamaño de las células en u		
	Mínimo	Máximo	Promedio #
Detmer modificado urea	4	8	5.7
Detmer urea filtrado	5	13	8.7
Detmer urea	5	12	7.7
Detmer original	3	10	6.0
Detmer modificado	2	6	4.0
Detmer modificado sin nitratos	2	6	4.0
Detmer original sin - nitratos	2	7	3.4
Detmer original sin - potasio	3	11	6.2
Detmer con sulfato de amonio sin magnesio	5	14	8.4
Detmer original sin - fósforo	4	9	5.6
Detmer con sulfato de calcio sin magnesio	5	14	9.5
Detmer con sulfato de amonio	5	11	7.8
Extracto de roca	4	11	5.3
Medio basal Bold	3	11	4.9

Promedio de 100 células medidas

u micras.

CUADRO 5. Algunas propiedades físicas y químicas de los suelos y extracto de rocas, utilizadas en el cultivo de - - Chlorella en placa y tubos respectivamente.

Muestra	miligramos por litro											
	Arena	Limo	Arcilla	Textura	pH	Na	K	Mg	P	H-NO ₃	M.O.	N.T.
	%	%	%								%	%
Taxcoco	36	3	61	arcilla	9.2	0.36	0.11	0.01	2.33	0.00	0.276	0.242
C. al D. de los Leones	40	39	21	franco	6.6	0.01	0.00	0.00	0.16	0.00	0.104	0.038
Extracto de roca					8.0	0.05	0.00	0.00	0.20	0.00		

M.O. Materia Orgánica.

N.T. Nitrógeno Total.

CUADRO 6 Estimación del crecimiento de Chlorella en placas de suelo y roca, mediante la cuantificación de la materia orgánica y el nitrógeno total incorporados.

Muestra	No. de malla.	Tamaño de partícula en mm.	Condiciones del suelo	Condiciones iniciales		Después de 20 días de incubación.		Testigos (muestras no inoculadas.)	
				% N.T.	% M.O.	% N.T.	% M.O.	% N.T.	% M.O.
Roca	120	0.125	estéril	0.023	0.690	0.029	2.07	0.024	0.580
Roca	80	0.190	estéril	0.023	0.621	0.029	1.78	0.024	0.517
Roca	60	0.250	estéril	0.023	0.276	0.025	1.78	0.024	0.207
Roca	35	0.500	estéril	0.023	0.345	0.024	1.78	0.024	0.104
Texcoco	18	1.000	estéril	0.243	0.276	0.259	2.62	0.242	0.207
Texcoco	18	1.000	no estéril	0.256	0.276	0.268	3.15	0.242	0.276
C. al D. de los Leones	18	1.000	estéril	0.050	0.607	0.050	1.59	0.038	0.104
C. al D. de los Leones	18	1.000	no estéril	0.050	0.449	0.050	2.07	0.038	0.104

Miles de células / mm.³

700

600

500

400

300

200

100

D.M. Detmer modificado
D.M.U. " " urea
D.O. " Original (testigo)
D.M.s/n " modificado
sin nitrógeno

D.M.

D.M.U.

D.O.

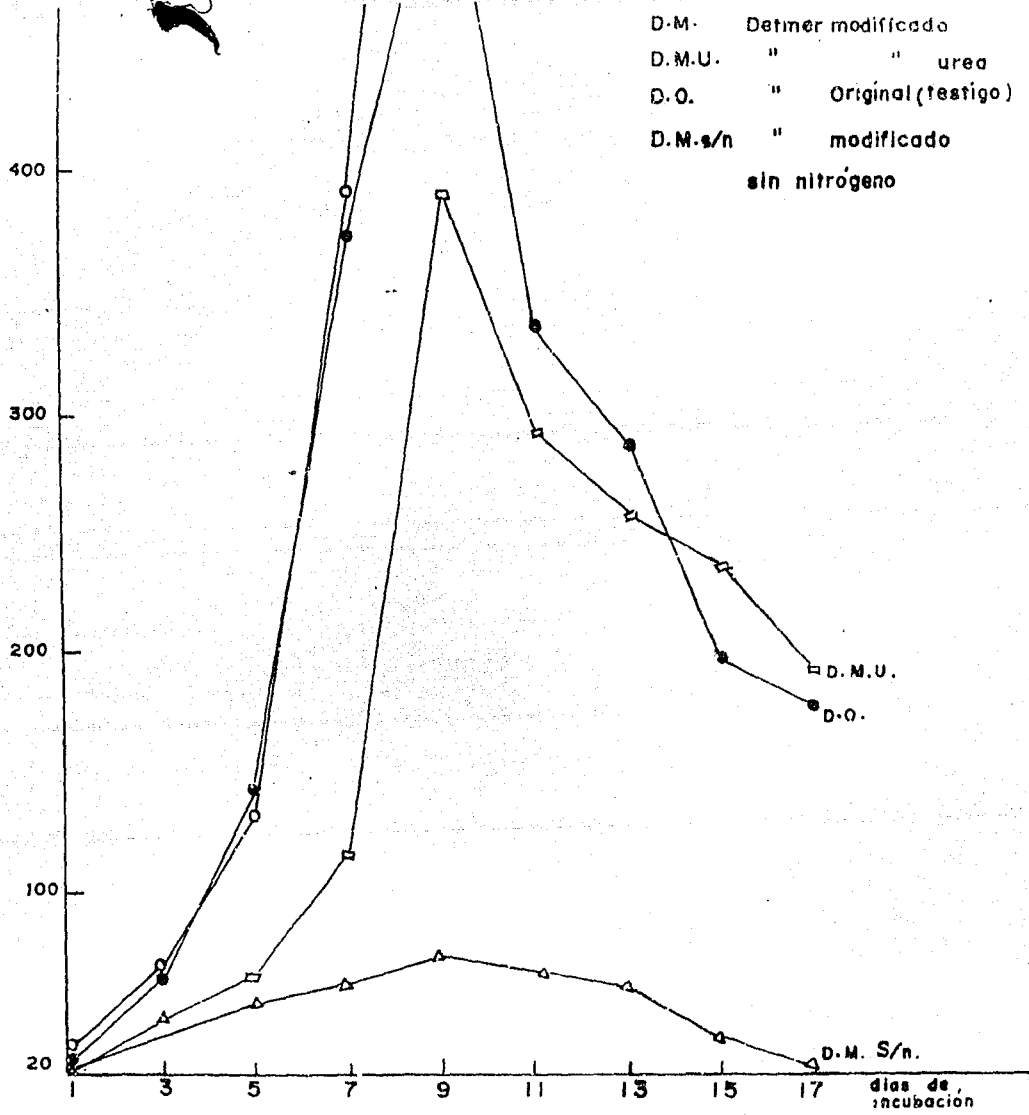


Fig. 1 Respuestas de *Chlorella vulgaris* al medio Detmer modificado con algunas variaciones.

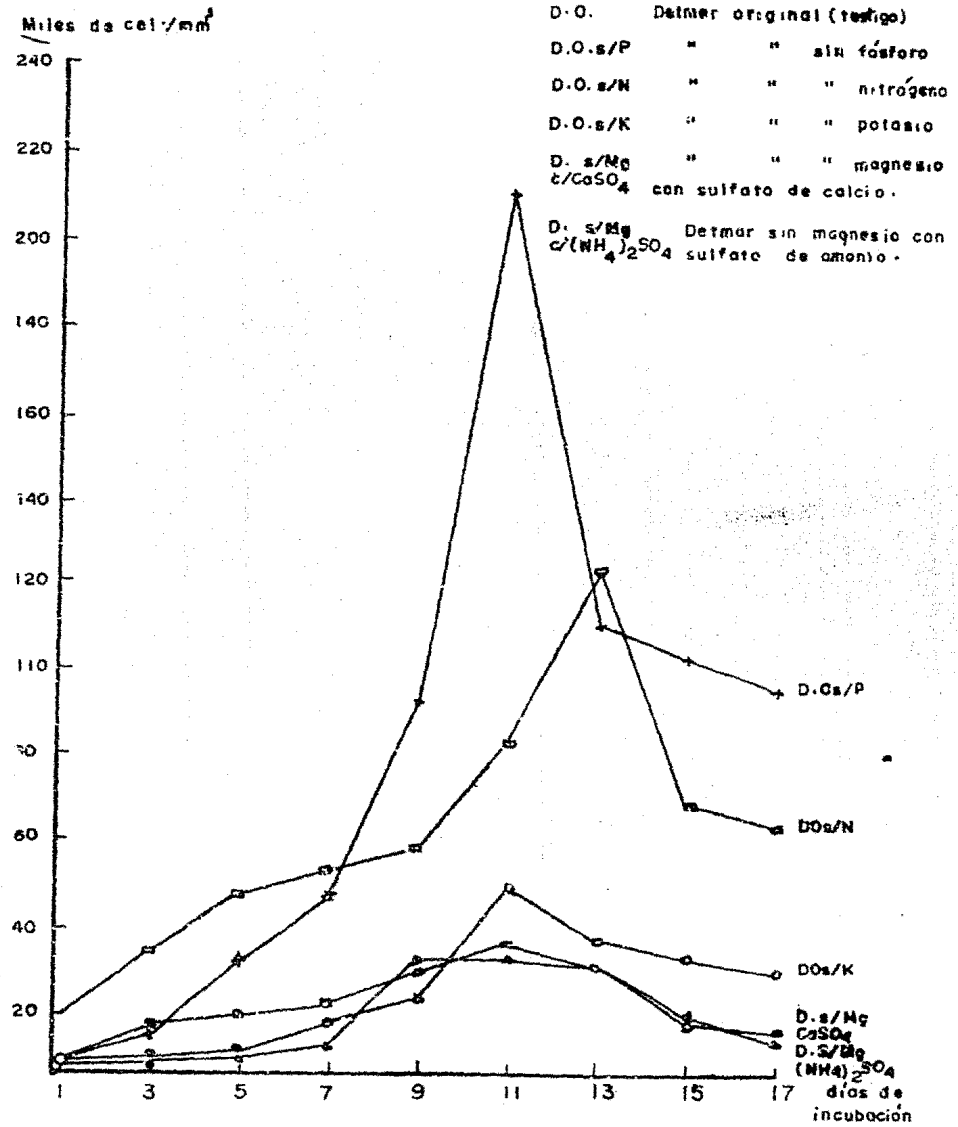


Figura 2 Comportamiento de *Chlorella vulgaris* en ausencia de algunos nutrimentos.

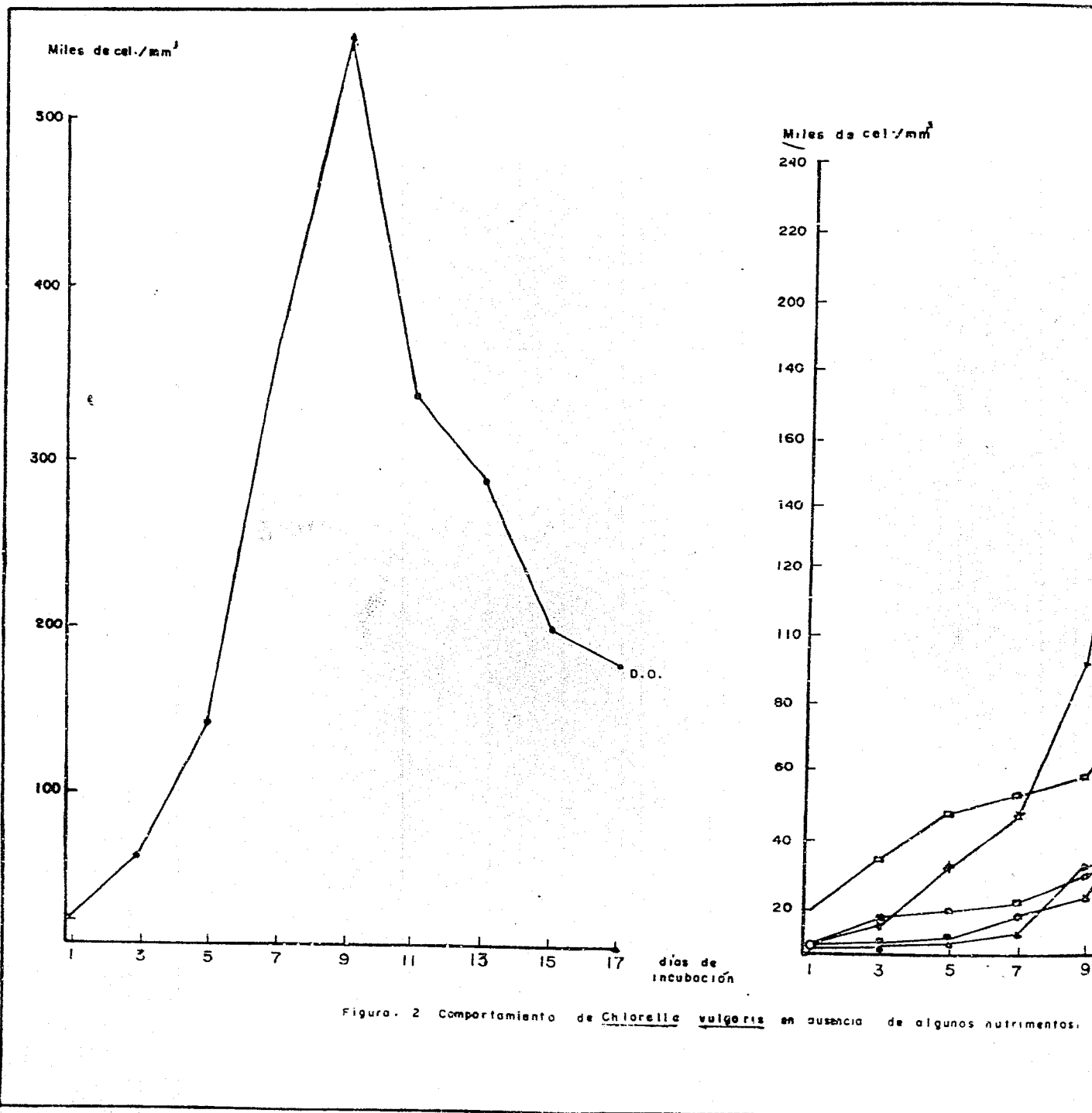
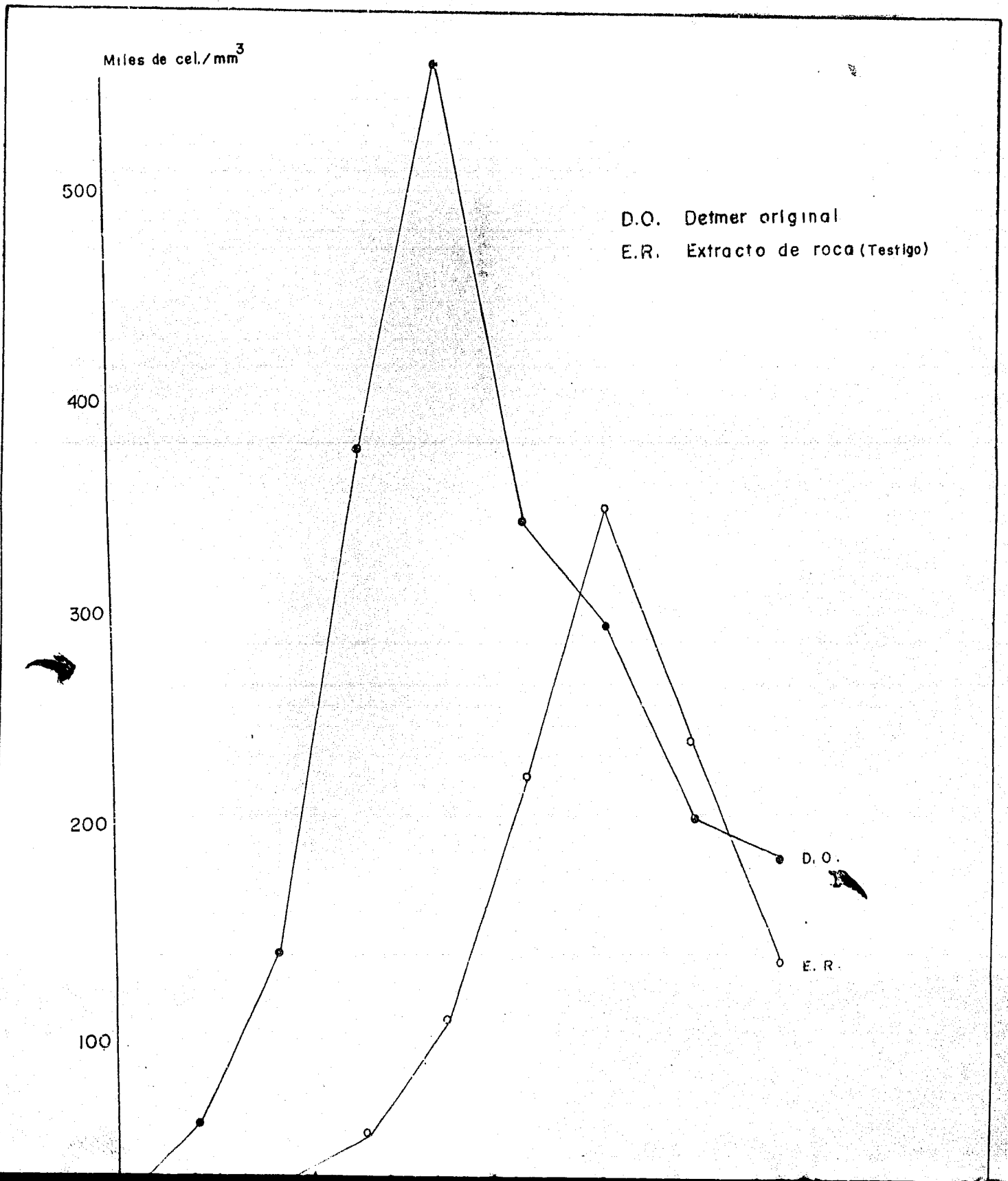


Figura. 2 Comportamiento de *Chlorella vulgaris* en ausencia de algunos nutrientes.



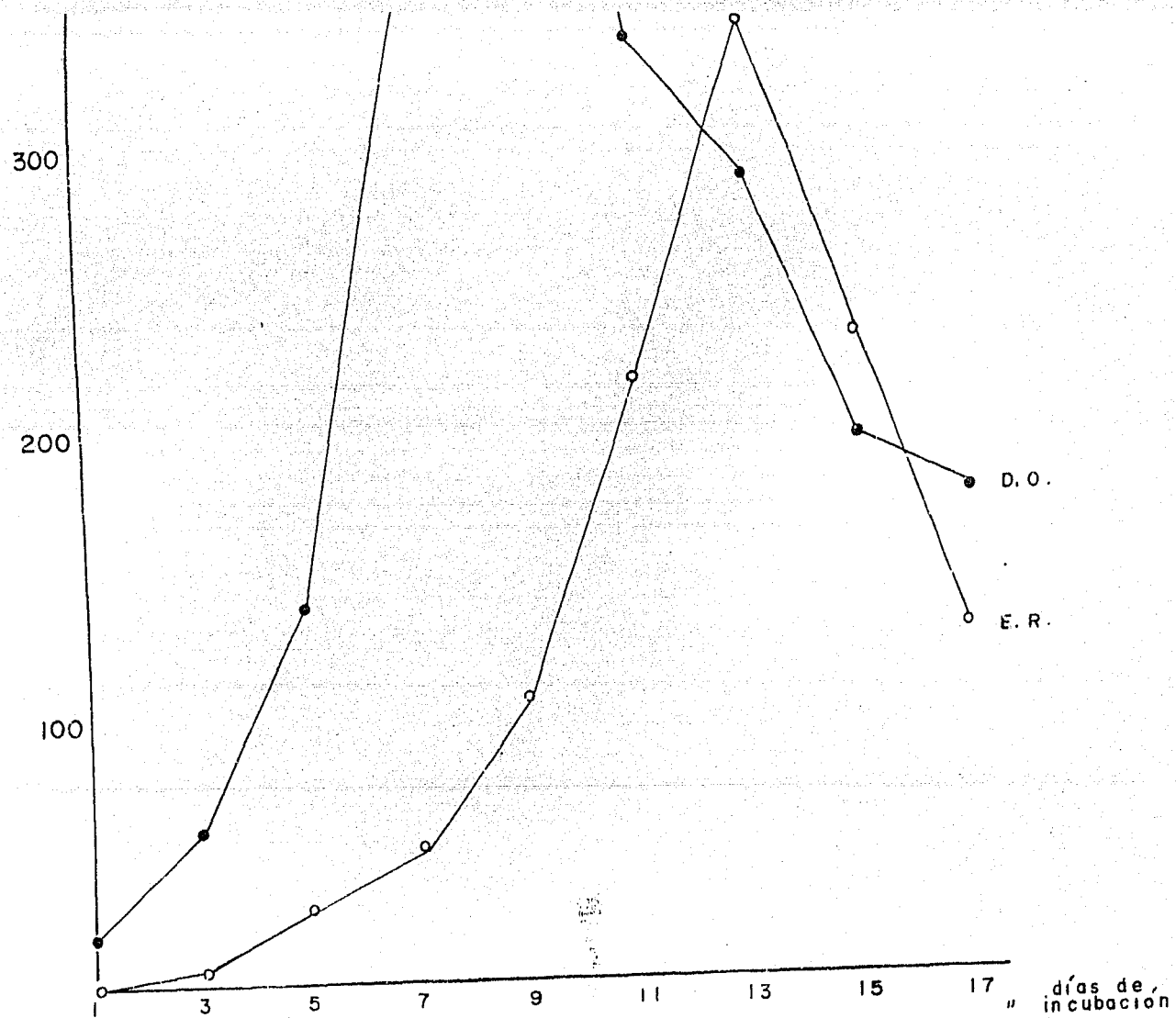
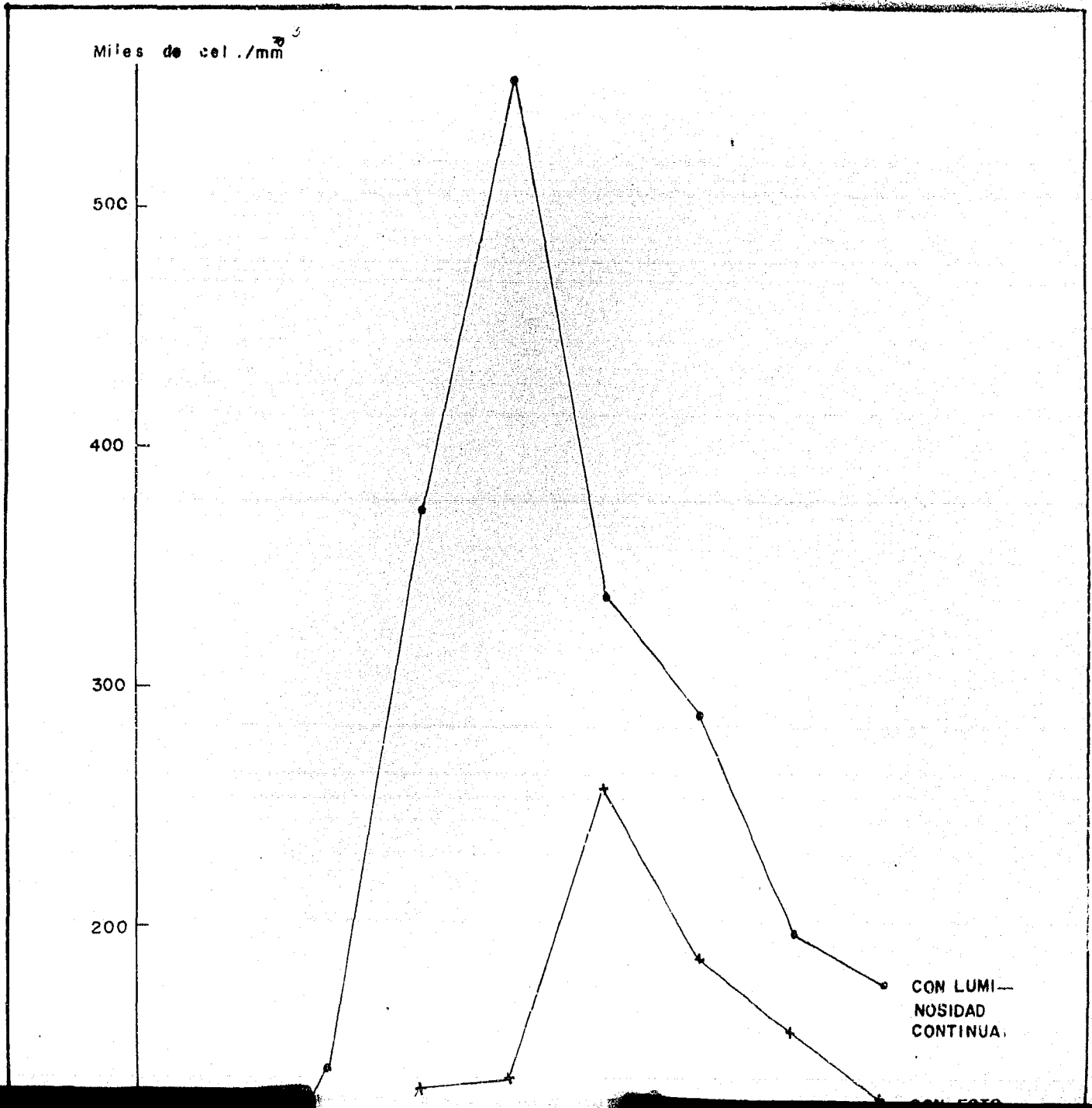


Fig. 3 Crecimiento comparativo de *Chleralla vulgaris* en medio Detmer original y el extracto de roca.



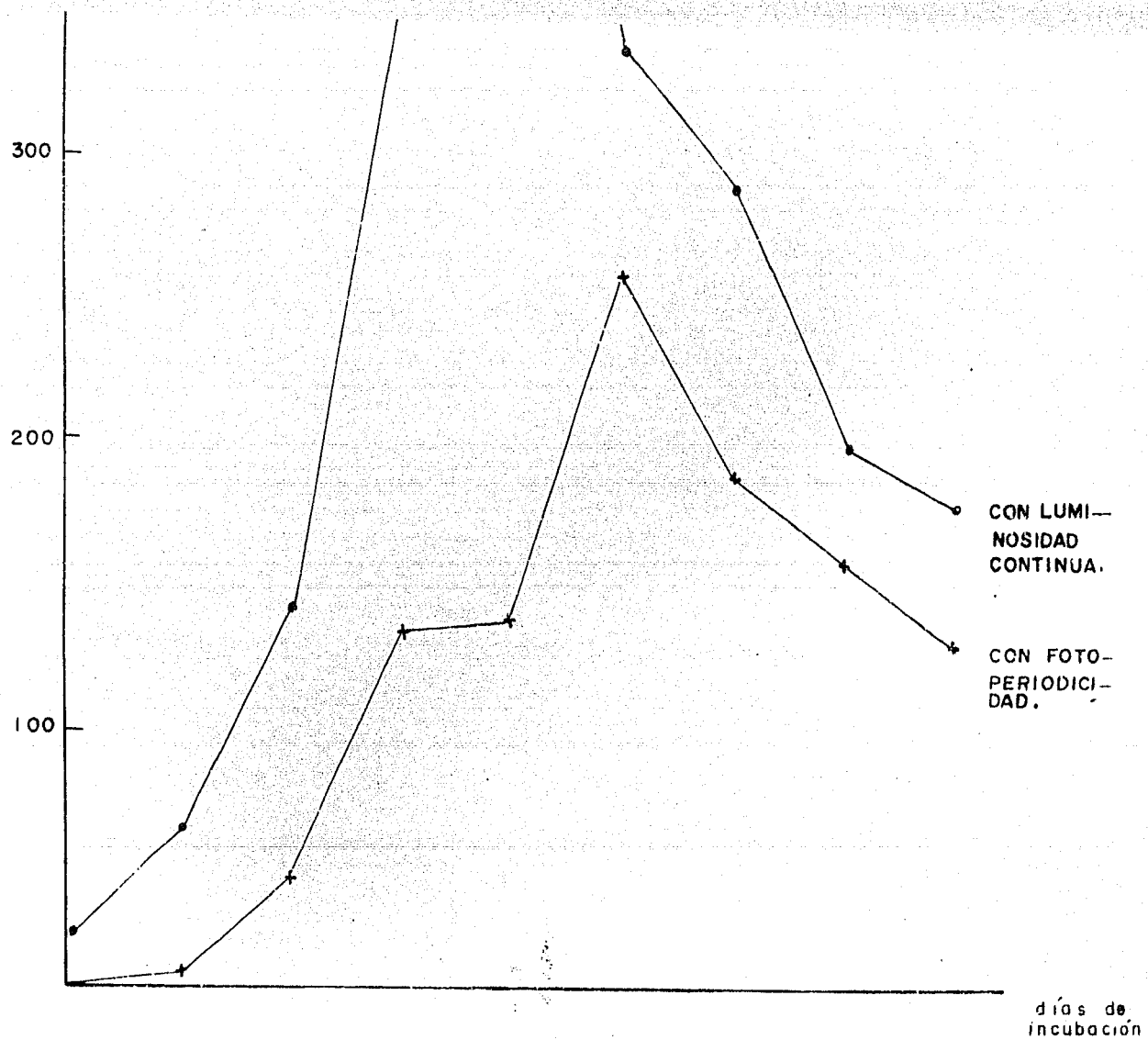


Fig. 4 Efecto de la Fotoperiodicidad en la población de Chlorella vulgaris.

Miles de cel. / cm^3

600

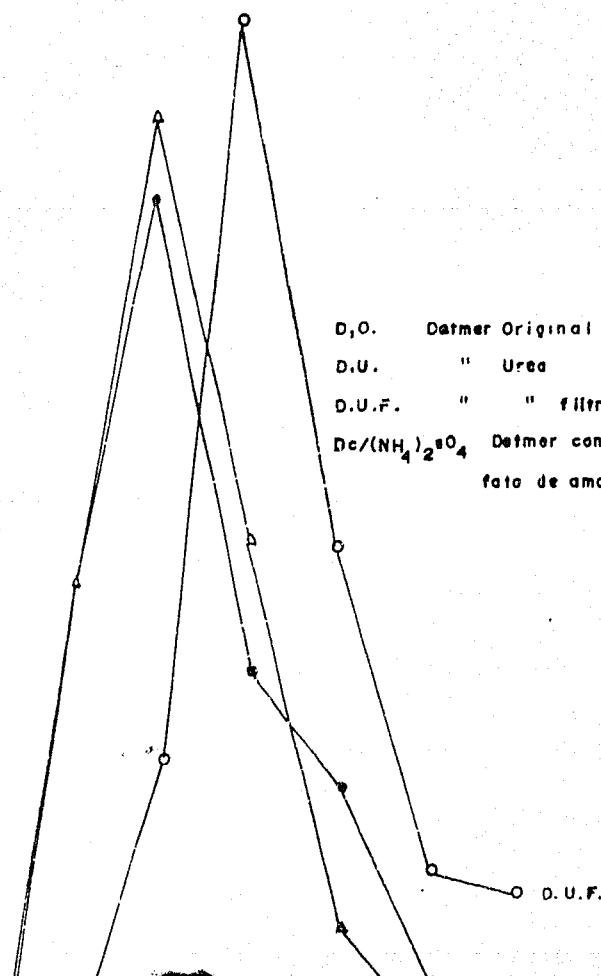
500

400

300

D.O. Detmer Original (testigo)
D.U. " Urea
D.U.F. " " filtrado
 $\text{Dc}/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Detmer con sul
fata de amonio

D. U. F.



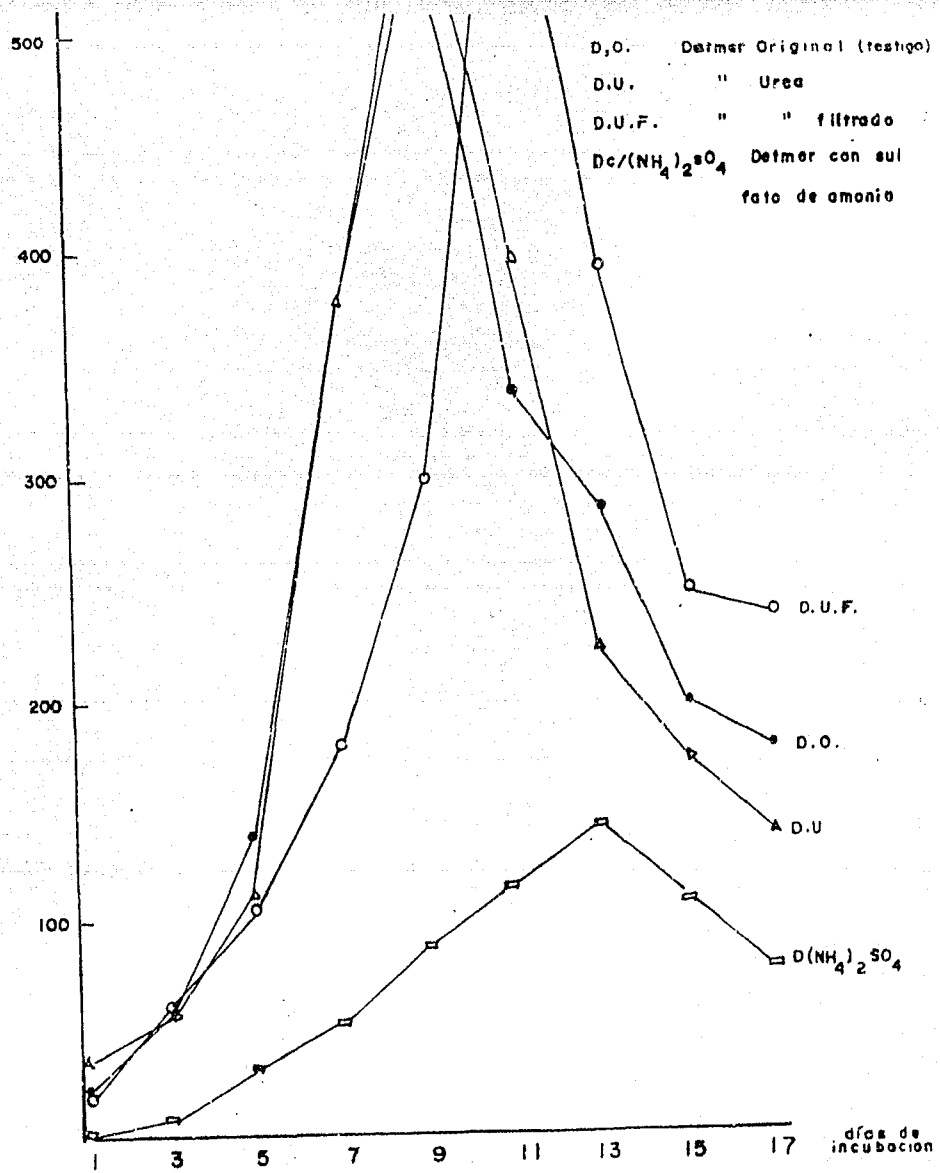
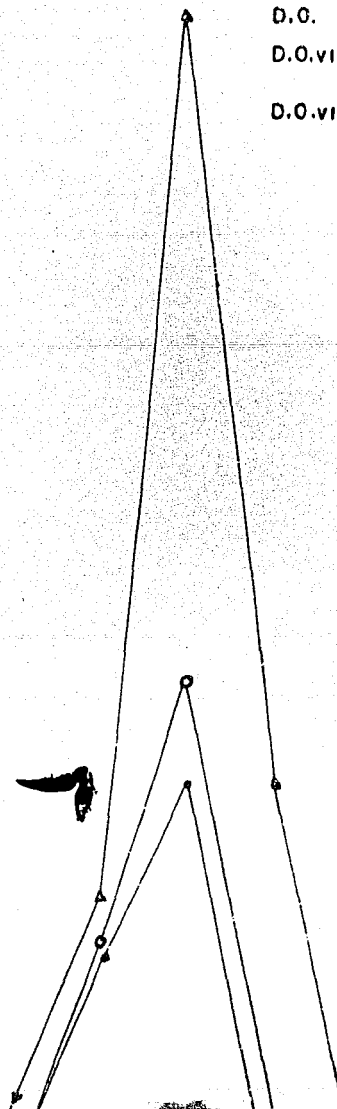


Fig. 5 Respuesta de *Chlorella vulgaris* ante diferentes fuentes de nitrógeno

Miles de células / mm³

360
340
320
300
280
260
240
220
200
180
160
140
120

D.O. Detmer original (testigo)
D.O.vit. B₁ Detmer original
con vitamina B₁
D.O.vit. B₁₂ Detmer original
con vitamina B₁₂



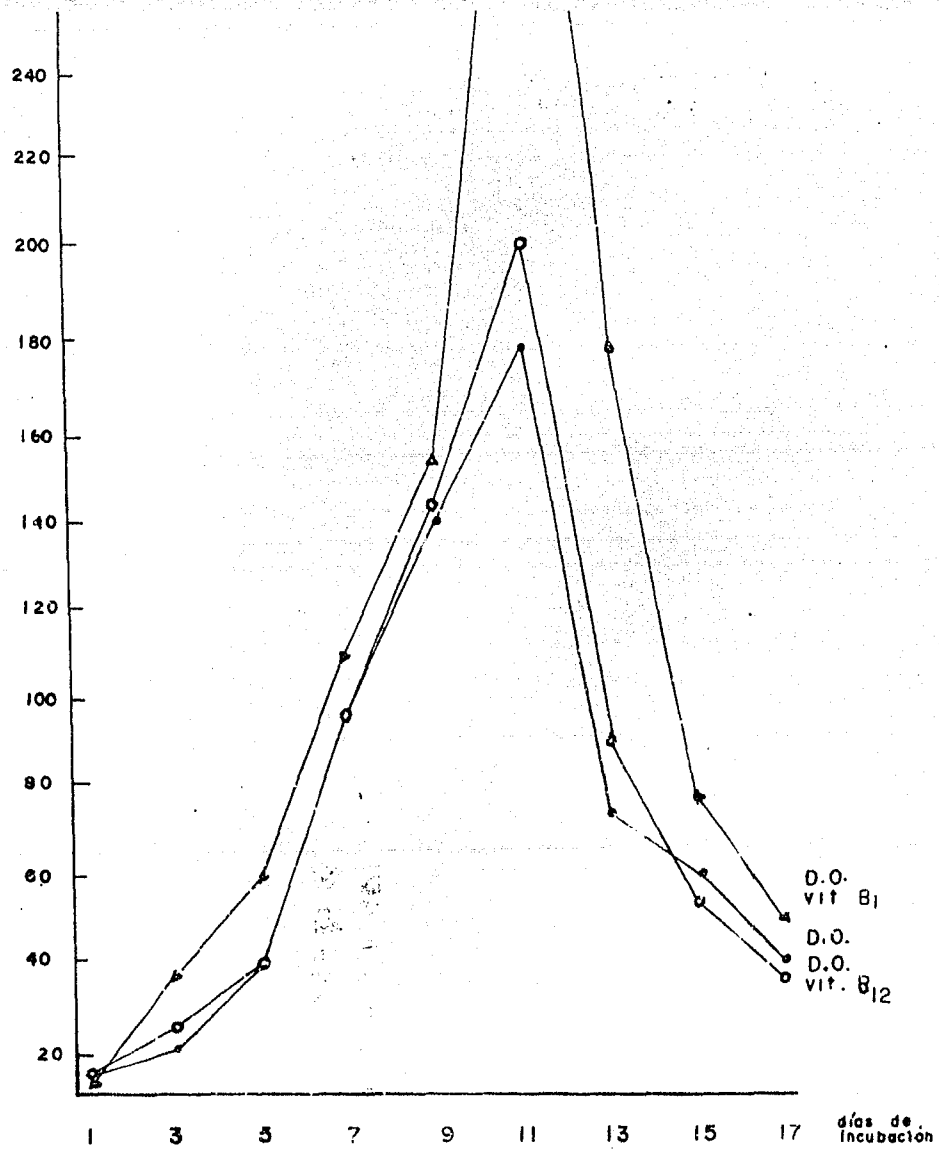


Fig. 6 Respuesta de *Chorea vulgaris* a la presencia de vitaminas en el medio Detmer original

miles de cel. / mm³

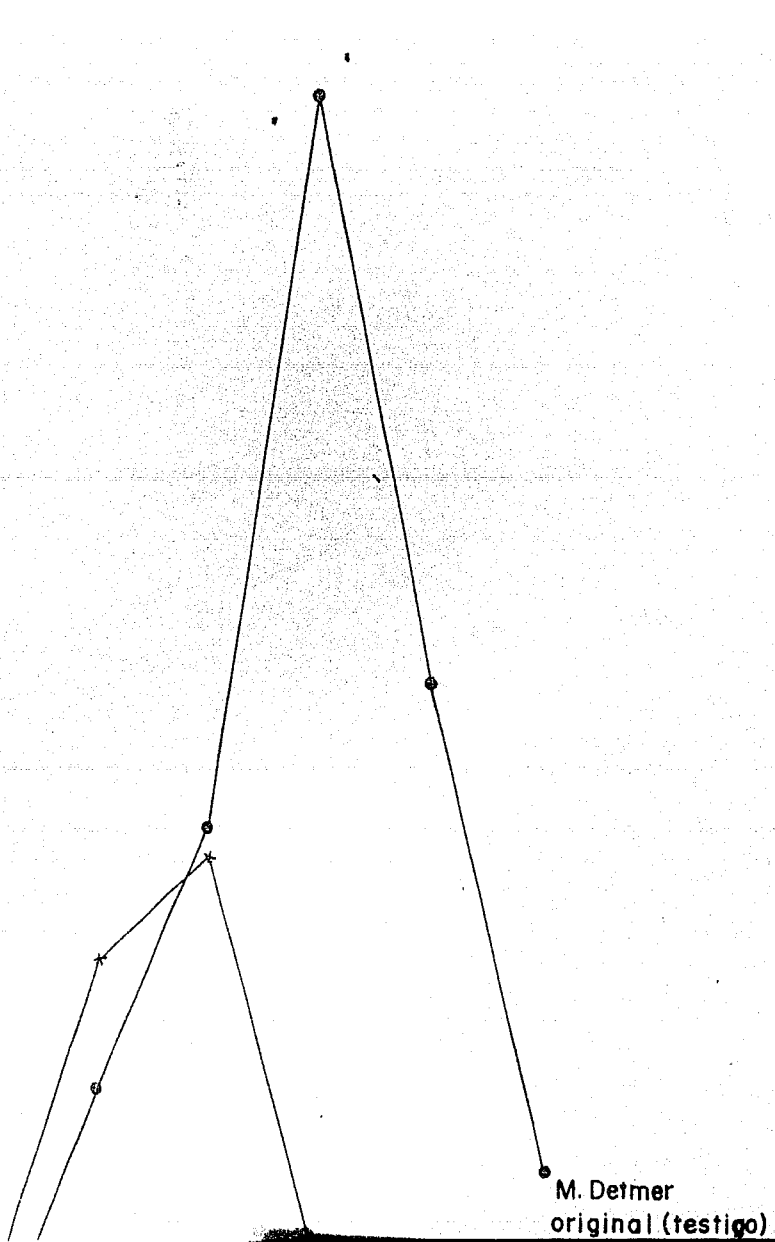
600

500

400

300

200



M. Detmer
original (testigo)

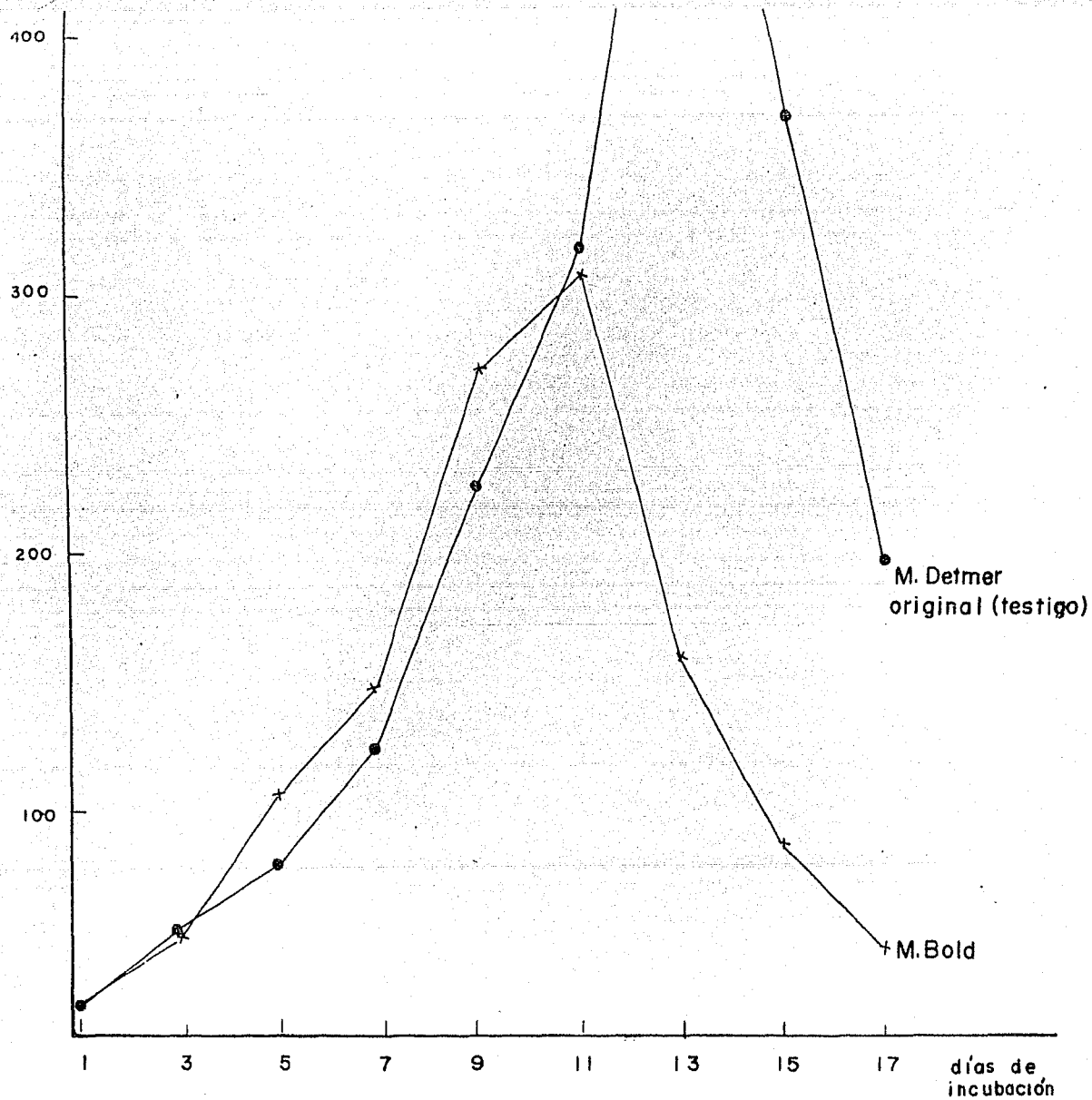


Fig. 7 Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en dos medios de cultivo diferentes

V.- CONCLUSIONES .

La obtención de cultivos de Chlorella Vulgaris absolutamente libres de bacterias, no pudieron ser logrados, como lo reporta la bibliografía, tal parece como si existiera para ciertas algas una estrecha relación fisiológica entre bacteria-alga. Se pudo observar que aparentemente la población bacteriana no constituye un impedimento para el crecimiento del alga.

El medio de cultivo óptimo para el desarrollo de la población, en base a los resultados obtenidos, fue el Detmer modificado, el óptimo para el mejor tamaño de las células fué el -- Detmer urea esterilizado por filtración a temperatura ambiente. Los medios anteriores junto con el Detmar urea esterilizado a 120°C en autoclave, representan los mejores medios para el crecimiento de Chlorella Vulgaris.

Las respuestas de adaptación de C. vulgaris a la variación de nutrimentos en el medio de cultivo, indican que esta alga tiene la capacidad de adaptarse a varias fuentes de nitrógeno. El nitrógeno en forma de amonio y especialmente en forma de urea, produjo un claro aumento en el tamaño y número de las algas.

La carencia total de nitrógeno en el medio de cultivo afectó a Chlorella tanto en el tamaño como en la población, pero aún sin este elemento es capaz de crecer y reproducirse, usando tal vez, mecanismos que le permitan fijar posiblemente, una --

cantidad mínima de nitrógeno del aire.

La ausencia del magnesio en el medio de cultivo, es un -- factor determinante en el aumento de la población, pues los medios que fueron preparados en ausencia de este elemento, dieron el menor número de células/mm³; por lo anterior se puede concluir que el magnesio es un factor limitante para el desarrollo de la población, pero no para el tamaño de la célula.


Las variaciones de las algas respecto al medio de cultivo, se observaron no solo en el comportamiento de la población, sino también en el tamaño y pigmentación de los individuos.

Encontramos un mejor crecimiento en presencia de vitamina B₁, lo que demuestra que posiblemente la tiamina actúa como -- un factor de crecimiento, no así la vitamina B₁₂.

Al comparar el medio Bold con el medio Detmer, se encontró que hay un mayor período de viabilidad de las células en este último, por lo que se concluye que el Detmer es un medio bastante apropiado para el cultivo de Chlorella.

La incorporación de materiales orgánicos al suelo por -- parte de Chlorella vulgaris, es mayor mientras más fina sea su textura. De donde se puede concluir que esta alga encontrará -- su óptimo en suelos arcillosos y de pH alcalino, con adecuados aprovisionamientos de elementos nutritivos, especialmente Mg, K, P y N.

Los cultivos jóvenes y con fuente de nitrógeno, presentaron siempre en color verde intenso, mientras que aquellos desarrollados en medio carentes de N y Mg., tendieron a una coloración verde amarillenta; en los cultivos con una edad mayor de 20 días, se pudo observar la misma tendencia.



VI.- RESUMEN .

En este trabajo se trató de conocer algunas de las características fisiológicas de Chlorella vulgaris, aislada a partir de rocas calizas del Cañon de Lobos Edo. de Morelos.

Obteniéndose primeramente un cultivo mixto o imperfecto, para -- posteriormente lograr un cultivo unialgal. Se trató de eliminar la flora bacteriana del cultivo por dos métodos: mediante la adición de antibiótico al medio de cultivo y por medio de lavados y centrifugación.

Se determinó su medio óptimo de crecimiento estudiando además, su comportamiento ante la carencia de N, P, K, y Mg; así como la respuesta del alga ante el estímulo de las vitaminas B₁ y -- B₁₂ en el medio de cultivo.

Pudo apreciarse que el tamaño de las partículas y el pH del suelo, tienen relación con la adaptabilidad y crecimiento del alga en el mismo.

Mediante la estimación de la materia orgánica y el nitrógeno total incorporados al suelo, se determinó la adaptación y crecimiento de Chlorella vulgaris en dos suelos de propiedades físicas y químicas diferentes.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Acorinti, J. 1970, Cultivo unialgal y masivo de "Scenedesmus obliquus". Turo. Ktz. Técnicas de obtención. Comun. Mus. Argent. C. Nat. "Bernardino Rivadavia", Bot.1(9): 21-29
- 2.- Agse, A.L., I.V. Alexandrova, G.V. Ilgoch, V.V. Kraanoshche kos I.P. Ivanova, E.K. Lebedeba and U.I. Yozdovkil. 1967. - Study of Chlorella cultivation on solutions with mineralized human wastes. Kosm Biol. Med. 1 (6) 56-59
- 3.- Andreeva, V.M. 1970 The variability of taxonomic characteristics in unicelular green algae under culture conditions. III The concentration of the medium components and the cell size in certain species of the genus Chlorella Beyer. Bot. -- Z.H. 75 (11):1919 - 1929..
- 4.- Arvik, J.H., D.L. Hyzok and R.L. Zimdahl 1973. Effect of nifltribuzin and two analogs, on five species of algae. Weed - S.C.I. 21 (3) 173 - 175.
- 5.- Bailey, Bon, Andrew P. Masurak and James R. Rosowsky 1973. Agregation of soils particles by algae. J. Phycol 9 (1): - 99 - 101.
- 6.- Bryon, H.A., Ch G Bryon, Ch.A. Bryon 1968 Bacteriology principles and practice sex ed. Ed. Barner & Noble Inc. New - - York p. 69.
- 7.- Bouyoucos, C.J. 1951 A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soils. Agronomy Jour

- nal Vol: 43 (9): 434-437.
- 8.- Cameron, R.E. and J.R. Devaney., 1970. Antarctic soil algal crusts Scanning electron and optical microscop study. - - Trans. Amer Micros S.O.C. 89 (2) 264-263.
 - 9.- Dilov C. and S. Yordanova., 1971. A research on the growth of bulgarian strains of algae at various temperatures. Rasteniavad Nauki 8 (7) 35-45.
 - 10.- Dilov, C., M. Bozhkova, V. Georgieva and N. Bakordjieva. - - 1971. Use of cheap mineral fertilizers in micro-algae cultivation. (Inst. Genet. Plant. Bruding, ofia Bulg.) Rostnievad Nauki 8 (6): 83-90.
 - 11.- Dilov, H.P. et al. 1968. Intensive culture of unicellular algae in media prepared with mineral wather of spring on the "Roupite" localized near of the Petrich. C.R. Acad SCI.AGR. BULG 1 (2): 153-161.
 - 12.- Droop, M. 1954 Condition governing hematochrome formation - and loss in the algae Haematococcus pluvialis Plotow. Arch. Mikro-biol. 20; 391-397.
 - 13.- Fries, C. 1960. Geología del Edo. de Mor. y partes adyacentes de México y Gro. Región Central Meridional de Méx. Boletín No. 60 Instituto de Geología.
 - 14.- Fott, B. 1969. Studies in Phycology. Prage, Academia. 304. P.
 - 15.- Fogg, G.E. 1965. Algal cultures and Phytoplankton Ecology.

The University of Wisconsin Press. 126 p.

- 16.- Fujimoto, Shegeki, Masashi et al. 1969. Effect of Chlorella extract on growth and development of school children Nagasaki Igakkai Zasshi 49 (9 -10).
- 17.- Hermenick, F. 1971. Algal-bacterial symbiosis for removal and conservation of wastes wather nutrients. J. Wather Pollut. control. Fedd. 43 (4) p. 580-594.
- 18.- Hope, H. P., Esperon, M.E. y Cranados CH.F. 1953. Estudio Físico-químico y microbiológico de los suelos de Xochimilco D.F. Memorias del Congreso Científico Mexicano II Ciencias Físicas y Matemáticas U.N.A.M. p. 241-249.
- 19.- Jackon, S.L. 1964. Análisis químico de suelos. Ediciones -- Omega, S.A. Barcelona, España. pp. 67-89, 282-309.
- 20.- Karpov, V.L. et al. 1969. A technique for cultivating Chlorella in a $C^{14}O_2$ at atmosphere of high specific radiativiting. Fisiol. Rast. 16 (1) 169-174.
- 21.- Kessler, E. and C. J. Saedrer. 1962. Biochemical contributions to the taxonomy of the genus Chlorella. Nature. 194:- 1096-1097.
- 22.- ----- 1966. Physiologische and biochemische Beiträge zur -- Taxonomi der Gettung Chlorella. II Untersuchungen an Mutanten 54 :37-45.
- 23.- ----- 1966. Physiologische und biochemische Beiträge zur --

Taxonomi der Gattung Chlorella. III Merkmale von 8 autotrophen Arten. 55 :346-357.

- 24.- Krilenko. N.S. and G.B. Mel'Nikov. 1969. Comparasion of the weight, fotness, and biochemical composition of Chlorella - fedd Tilapia mossambica. Peters basin and Acuarria cultures. Hidro. Biol. Z.H. 5 (4) 121-124.
- 25.- Kostlom, N.V., Tupik V.N. and E. Nesterova. 1971. Content - of some wather soluble vitamin in the Protococales depen- - ding on age and conditions of phosphorus nutritions. U.K.R. Bact. Z.H. 28 (5) 664-669.
- 26.- Ledeva. E.K., G.I. Meleshko et al. 1968. Stabilitation of -- the concentration of mineral nutrition elements durign pro- longed Chlor. cultivation with recovery of the medium. Kosm. Biol. Med. 2 (3) :16-23.
- 27.- Lit Chiefild C. et al. 1969. Minim Taxonomic of the hetero- trofic bacterial growth in asociation with cultures of - -- Chlorella sorokiniana. A.P.P.L. Microbiol. 18 (6) p. 1044-1049.
- 28.- Malaseja, Zevanca et al. 1972. Biological descomposition of phenol by mixed and pure culture of algae. Acta Bot. Croat. 31 :129-138.
- 29.- Maksimova, I.V. and M.N. Pimenova. 1969. Effect of the mi- croflora acompaning and acumulation of organic substances on media during Chlorella culture not stable. Mikrobiologiya.

- 38 (4) p. 609-615.
- 30.- Matusiak, Kazimiers., Kyzard et al. 1971. Bacterial microflora in Chlorella vulgaris culture. Acta Microbial. Pal Ser. Microbial. A.P.P.L. 3 (4) p. 189-193.
- 31.- Nollendorf, A.F., Pakalane. S. and opetis. V. 1972. Little Know trace elements in Chlorella culture cromiun. Latv. PSR. Zinat Akod. Vestes 7 : 33-43.
- 32.- Ogutu, Manabu, Yoshiyuki et al. 1968. Studies on the alimentary flora of pig:III Influence of fermented - Chlorella -- diel on the fecal flora. Jap. J. Vet. SCT 30 (5) p. 281- 287.
- 33.- Orozco F.D. 1967., Análisis químicos cuantitativos. Porrúa, S.A. México.
- 34.- Palmer, M.C., 1962., Algas de abastecimientos de agua. Editorial Interamericana. pp.-91.
- 35.- Pimenova, M.N., I.V. Maksimova E.N. Zhdanmikova. 1969. Survival of green algae in relation to condition and duration of storage. Trans. Mikrobiol. 38 (3) p. 538-543.
- 36.- ----- and I.V. Maksimova et al. 1970. Microflora in a culture of Chlorella K with prolonged cultivation in a rotation-type apparatus with direct medium return. Trans. Mikrobiol. 39 (4) : 645-650.
- 37.- Pinevich U.V. and E.P. Burs. 1973. Magnesium effect on - -

- complej proteinic in some isozyme of Ch. vulgaris Biol. ---
Nauk 15 (5) p. 85-90.
- 38.- Polyanichka L.F. and V. Kusmin. 1969. Use of a green algae culture for sewage purification. Gig. Saint. 34 (9).
- 39.- Prince, Al.L 1945. Determination of total nitrogen, ammonia, nitric and nitrates in soils. Soil. Sci. 59 p. 47-52.
- 40.- Pringshein, E.G 1961. Pure cultures of algae Cambridge and -
Weiss ner, W.
- 41.- Provasoli L. 1963 Organic regulation of Phytoplankton fertility in the sea.. 2. ed. M.M. Hill; New York. P. 165-219.
- 42.- Richardson, B.D.M. et al. 1969. Effect on nitrogen limita---
tion on the growth and composition of unicellular algae in -
continuous culture. A.P.P.L. Mikrobiol. 18 (2).
- 43.- Russell J. 1959. The world of the soil. 2a ed. Collins, Lon--
don. p. 82-86.
- 44.- Sánchez M.A. 1964. Microbiología agrícola. Colegio de Post--
graduados de la ENA. Chapingo, México. serie de Apuntes - -
No. 3 P. 1-18, 45-100, 271-280.
- 45.- Salageanu, N. and L. Ionasescu. 1970. Some physiological -
processes in the green algae Chlorella vulgaris and Scene-
desmus acutiformis cultivated in the laboratory conditions -
and on various nutritive media. An. Univ. Bucur. Biol. Veg.
19 :117 - 126.

- 46.- Shieh, Y.J. Uptake of Mercury by Chlorella and effect on regulation of potasio. 1973. Planta (Birl) 109 (1) 49-60.
- 47.- Sivko, T.L. Asipehik and Kandratyk U.V. 1971 Experiment - - using biological ponds for additional purification of sewage wather. Gindro Biol. Z.H. 7 (6) 103-106.
- 48.- ----- and U.G. Kodraty. 1967. Cultivation on Chlorella vulgaris in the sewage from on oil processing factory. - Dalk. Akad. Nauk. Belourus. SSSR 11 (12) p. 117-119.
- 49.- Van Thenh L. and N.J. Delevy Griffth 1970. Physiological -- changes accompaning the recovery of cell division in giant cell of Chlorella vulgaris. Plant Cell Physiol. 11 (4) - - 621-629.
- 50.- Waikler, A.I. and A. Black. 1935-1947. Rapid determination of soil organic wather. J. Agr. Sci. 25: 598; Soil Sci. - - 63-257.