

25



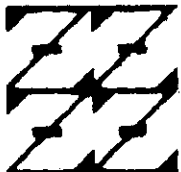
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"UTILIZACION DE MATERIA ORGANICA DE DESECHO PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ABEL GARCIA CRUZ

FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F.

OCTUBRE DE 1999

TESIS CON
PLATA DE ORIGEN

27 1037



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA
DIRECCION DE LA QBP M^a. DEL CARMEN
GARCIA RAMOS, EN EL LABORATORIO DE
ECOLOGIA, DPTO. DE ZOOLOGIA, DE LA
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOL-
GICAS, I. P. N.

AGRADECIMIENTOS :

- A la QBP Ma Del Carmen García Ramos por su gentileza y profesionalismo en la dirección del presente trabajo ya que su apoyo fue determinante para su realización.
- A la Biol. Alicia Pérez Chi, por las sugerencias realizadas.
- A Abel Cordova, por todo el apoyo incondicional y su don de sencillez.
- A la profesora Alicia Ramírez S. por haberme permitido realizar los análisis bromatológicos en el Laboratorio de alimentos.
- A la Biol. Silvia Mille Pagaza, por haberme dado las facilidades para la realización del proyecto.
- Deseo manifestar mi especial gratitud a todos mis profesores, amigos y compañeros que compartieron sus experiencias y sus útiles comentarios.

A LA MEMORIA DE MIS PADRES

DE MANERA ESPECIAL DEDICO ESTE TRABAJO

CON MUCHO AMOR

A MI ESPOSA CAROLINA

Y

A MI HIJO JAVIER

CON CARIÑO:

A mi tía Esther, Justina, Clara, Tere,
Lupita, Rocío, Ana Lilia, y Karina.

A mis sobrinos: Areli, Nico, Jorge y
Ulises

INDICE

I.- RESUMEN	07
II.- INTRODUCCION	08
III.- ANTECEDENTES	12
3.1.- Generalidades	12
3.2.- Efecto de factores ambientales en el crecimiento de <i>Dunaliella</i>	13
3.2.1.-Luz	13
3.2.2.-Temperatura	14
3.2.3.-pH	15
3.2.4.-Salinidad	16
3.3.- Efecto de los nutrientes en el crecimiento de <i>Dunaliella</i>	16
3.3.1.- Macronutrientes	16
3.3.1.1.- Carbono C	17
3.3.1.2.- Nitrógeno N	17
3.3.1.3.- Fósforo P	18
3.3.1.4.- Azufre S	18
3.3.1.5.- Potasio K	19
3.3.1.6.- Magnesio Mg	19
3.3.2.- Micronutrientes	20
3.3.3.- Vitaminas	22
3.4.- Distribución Ecológica	22
3.5.- Taxonomía	24
3.6.- Morfología	25
3.7.- Reproducción	27
IV.-OBJETIVOS	28

V.- MATERIALES Y METODOS	29
5.1.- Lavado y secado de materiales	29
5.2.- Esterilización	29
5.3.- Cepas	30
5.4.- Medios de cultivo	30
5.5.- Sustratos orgánicos	32
5.6.- Cultivo por lote	33
5.7.- Cultivos masivos	35
5.8.- Condiciones de cultivo	36
5.9.- Determinación de proteínas por la técnica de Lowry	37
5.10.-Análisis bromatológico	39
5.10.1.- Contenido de humedad	39
5.10.2.- Extracto etéreo	40
5.10.3.- Determinación de proteínas	42
5.10.4.- Fibra cruda	43
5.10.5.- Determinación de cenizas	45
VI.- RESULTADOS	47
6.1.- Cultivos en matraz de <i>Dunaliella salina</i>	47
6.2.-Cultivos en garrafón de <i>Dunaliella salina</i>	58
6.3.-Cultivos en bolsa de <i>Dunaliella salina</i>	72
6.4.-Cultivos en matraz de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	85
6.5.-Cultivos en garrafón de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	95
VII.-DISCUSION	105
VIII.- CONCLUSIONES	109
IX.- BIBLIOGRAFIA	110

I. - RESUMEN

Se propone un cultivo de microalgas utilizando desechos orgánicos.

Se usaron materiales orgánicos de desecho como: Excreta de conejo, Caparazón de camarón y Gallinaza (Excretas de gallina) como fuente de nutrientes en el cultivo de dos especies de *Dunaliella*. (*Chlorophyta*) *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) y *Dunaliella salina*, (Dunal) Teodoresco; con el objeto de producir cultivos masivos a bajo costo de microalgas para alimento en acuicultura.

Los cultivos fueron realizados en diferentes niveles en relación al volumen y tipo de recipientes empleados [matraces con 400 ml; en garrafones con 16 lts., y en bolsas con 12 lts., de medio respectivamente]. Todos los cultivos fueron sometidos a las mismas condiciones de Temperatura, pH, Aireación y Salinidad. También fué utilizado un medio semi-sintético como testigo en cada lote o experimento.

La duración de los cultivos fué variable, siendo un promedio de 14 días para el nivel matraz [cultivo por lote]; 18 días en garrafón y 20 días en bolsa [cultivos masivo]. Periódicamente se tomaron muestras, las cuales fueron usadas en la determinación de los parámetros físico-químicos más importantes.

Al concluir los experimentos, se realizó un análisis bromatológico para determinar la calidad nutricional de las microalgas como alimento, así como la importancia como fuente de nutrientes de los sustratos orgánicos elegidos y del cultivo testigo.

Los cultivos con caparazón de camarón y gallinaza arrojaron los mejores resultados con respecto a la densidad celular y la calidad nutricional. Por lo anterior existe la posibilidad de abatir costos en la producción masiva de estos microorganismos que son a su vez indispensables para la dieta de especies potencialmente importantes en la acuicultura de crustáceos, moluscos y algunos estadios de peces.

II. - INTRODUCCION

La acuicultura es una actividad importante de ámbito cotidiano en muchas regiones del país, con propósitos que tienden a aumentar la disponibilidad de proteínas tanto para autoconsumo humano como a nivel comercial y esto se ve favorecido con inversiones crecientes del sector privado y del esfuerzo de sectores sociales que generan empleos y divisas (*Hernández y García, 1990*). También es importante el avance científico-tecnológico que con gran rapidez está transformando los sistemas de producción de alimento (*Bardach, y col., 1986; Jiménez, 1988*). Es por ello que las nuevas estrategias van dirigidas a obtener rendimientos más elevados gracias a la generación de energéticos que ahorran esfuerzo físico, de sustancias químicas que acentúan el control de enfermedades así como la generación de variedades de elevado rendimiento que favorece la economía del productor y consumidor (*Vergara y De La Garza, 1988; Herrera, 1988*).

La acuicultura en nuestro país, se basa principalmente en el manejo de especies alóctonas (*Arredondo y Juárez, 1986; Guzman, A., y col., 1979; Martínez, J., y Abrego, A., 1986*); sin embargo cabe destacar la existencia de numerosas especies nativas susceptibles de cultivo, las cuales ofrecen diversas ventajas que las hacen recomendables para ser utilizadas en cultivos extensivos e intensivos (*Coll, 1983; Rivera y Orbe, 1990*).

El alimento es uno de los principales factores limitantes en las prácticas acuiculturales, ya que un organismo mal alimentado es más susceptible a las enfermedades y tolera menos las variaciones de los factores físico-químicos del medio en que se desarrolla (*Martínez, y col., 1988*); este problema en acuicultura, actualmente no se ha podido superar, sobre todo la disponibilidad de alimento vivo de buena calidad nutricional que garantice mejores rendimientos en los sistemas

de cultivo (Martínez, y col., 1988); sin embargo, sólo se ha buscado satisfacer estas necesidades mediante la formulación y elaboración de alimentos balanceados que, por una parte representan un alto costo y por otra no son adecuadamente aprovechadas en las etapas requeridas (Jiménez, 1988; Morales, 1990).

A este respecto, la utilización de organismos fitoplanctónicos se presenta como una excelente alternativa, ya que constituyen el primer eslabón de la cadena trófica y su cultivo bajo condiciones controladas ha cobrado gran importancia; son el soporte nutricional en alguna etapa larvaria de diversos organismos cultivables de interés comercial como: ostión, almeja, callo de hacha, abulón, mejillón, camarón, langostino, rotíferos, cladóceros, artemias, copépodos y algunas especies de peces de agua dulce y salada (Brewer y Goldman, 1976; Epifanio y Ewart, 1977; Soeder, 1980; Ukeles, 1980; Sandbank, 1980; Persoone y Claus, 1980; Fabregas y Herrero, 1985; Gutiérrez, 1988; Bautista, 1989; López, 1997). Cabe destacar que, en un cultivo controlado de camarón, en su fase larvaria *protozoa* requiere de 50,000 cel./ml de microalgas para lograr una sobrevivencia superior al 70% (Orbe y Arias, 1987).

Existe una gran variedad de microalgas con excelentes características para ser tomadas en cuenta en cultivos bajo condiciones controladas, usando substancias nutritivas en la preparación de medios y manteniendo estables los parámetros físicos-químicos (Guillard, 1975; Ortega, H., 1984; Richmond, 1990) dentro de las especies importantes podemos mencionar a: *Isochrysis galvana*, *Monochrysis luthery*, *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Nitzschia closterium*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp., *Thalassiosira* sp., y *Cyclotella naana* (Umebayashi, 1972; Chastel, 1980; Spectorova, y col., 1986; Benemann, y col., 1987; Pauw y Persoone, 1988; Bautista 1989).

Las microalgas de origen marino se encuentran catalogadas entre los

organismos de alto valor nutricional, debido a que poseen una gran capacidad de sintetizar y metabolizar: carbohidratos, materiales fibrosos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, así mismo presentan tiempo de generación corto, de aproximadamente 24 horas (Aaronson, y Dubinsky, 1980; Fabregas y Herrero, 1986; De La Noüe y Pauw, 1988; Hernández y Rodríguez, 1988).

El empleo de cultivos de microalgas como alimento en acuicultura representa una serie de ventajas, entre las que podemos destacar: Son una fuente constante de alimento vivo de alto nivel nutricional adecuado para el organismo consumidor; son fácilmente aceptados y asimilados; tienen una mayor permanencia en condiciones de accesibilidad para el consumidor; produce un menor deterioro en la calidad del agua (Martínez, y col., 1988).

El género *Dunaliella* se destaca dentro de esta gran diversidad de microorganismos fitoplanctónicos, debido a sus características morfológicas y fisiológicas ya que pueden ser usadas en diversos tipos de cultivo y para fines específicos; viven en hábitat marino siendo halotolerantes en áreas con luz solar abundante y temperatura moderada a través del año (Ben-Amotz y Avron, 1983); se desarrollan óptimamente en concentraciones de 6-12% de NaCl, aunque pueden adaptarse a diferentes salinidades (Latorella y Vadas, 1973; Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988); acumulan cantidades importantes de metabolitos como: glicerol y carotenos en condiciones de alta intensidad de luz, salinidad, temperatura y deficiencias nutricionales, como el N; carecen de pared celular, lo cual hace más fácil su digestión por aquellos organismos que se alimentan con esta microalga (Ben-Amotz, Edelstein y Avron, 1986; López, 1997).

Con respecto a las técnicas de cultivo de microalgas, existen diversos criterios que han permitido a los investigadores realizar clasificaciones y diseños de estos métodos, las más importantes son: por número de especies, (cultivos monoespecíficos y poliespecíficos); cultivos axénicos y no axénicos; considerando

la salinidad (cultivos de organismos marinos o de agua dulce); tipos de recipientes para cultivo (cerrado y abierto); por lote; continuo; pequeña y gran escala. Sin embargo la preferencia está en función del objetivo a alcanzar, aunque algunos autores recomiendan los cultivos monoespecíficos, no axénicos y a nivel comercial el cual es usado en la producción de alimento vivo de bajo costo (*Palmer, y col., 1974; Cáceres, 1975; Coll, 1983; Torrentera, 1983; Reynoso, y col., 1990*).

La utilización de sustancias químicas para enriquecer el agua de mar para preparar un medio semisintético que permita el desarrollo de microalgas marinas, generalmente implica un costo elevado; este problema ha ocasionado que algunos científicos desvíen su atención para encontrar fuentes que generen macro y micronutrientes así como vitaminas, de bajo costo contribuyendo de esta forma que, la producción de alimento vivo no sea onerosa (*Mclachlan, 1964; Fabregas, y col., 1986*).

Una buena alternativa ha sido el empleo de fertilizantes como fuentes de nutrientes en el cultivo de microalgas, sin embargo presentan inconvenientes que reditúan en el costo de las mismas y en la calidad de los cultivos (*Granados y Bückle, 1984; Corsini y Karydis, 1990; Edward, W., y col., 1994*). El uso de desechos orgánicos como estiércoles digeridos de conejo, gallinaza y caparazón de camarón u otros, no se han empleado actualmente para estos fines y no se ha encontrado en la literatura ninguna investigación en curso que tenga este sentido y sin embargo pueden representar económicamente una excelente fuente de nutrientes para la producción masiva de fitoplancton, de buena calidad nutricional.

Para propósitos del presente trabajo fueron seleccionados los cultivos monoespecíficos, con los sustratos orgánicos antes mencionados y dos cepas del género *Dunaliella*: *D. -salina* y *D. tertiolecta*.

III.- ANTECEDENTES

3.1.-GENERALIDADES

Una gran cantidad de algas microscópicas han sido cultivadas durante muchos años, utilizando diferentes técnicas sin alcanzar todavía los niveles deseados para utilizarlas como alimento; sin embargo es importante mencionar que las investigaciones sobre cultivos masivos se sitúa en los años 40 en Alemania con el desarrollo de técnicas para el cultivo continuo. Los trabajos realizados por *Spoehr y Milner, 1949*, abrieron la posibilidad de la utilización comercial de las microalgas, mostrando que la composición química (lípidos y proteínas) de algunas especies podía ser modificada como una respuesta a las condiciones de cultivo (*Ramos y Salazar, 1990*).

En 1953 se realizó una publicación respecto a la industrialización y comercialización de *Chlorella* en polvo y comprimidos como complemento dietético en el Instituto de *Carnegie* en Washington y 4 años más tarde en Tokio. Los cultivos masivos de *Scenedesmus* en canales de corriente rápida "raceways" iniciado por *Gummert y col., 1953*; se vieron mejorados por las numerosas innovaciones introducidas por *Soeder, 1979*. Los cultivos masivos de *Spirulina* producidas en varios países, principalmente en México son una realidad actualmente ya que sus fines son comerciales (*Ramos y Salazar, 1990*).

Los cultivos masivos de los representantes del género *Dunaliella* han recibido una especial atención en las dos últimas décadas, debido a sus grandiosas bondades como alimento para maricultura (*Davis y Guillard, 1958*); como fuente de B-caroteno (*Massyuk, 1966; Gómez, y col., 1992*); y de glicerol (*Ben-Amotz, y Avron, 1980*).

3.2.- EFECTO DE FACTORES AMBIENTALES EN EL CRECIMIENTO DE *Dunaliella*

La mayoría de los trabajos recientes con microalgas han permitido conocer una gran diversidad de técnicas de cultivos; éstas a su vez nos indican las ventajas que se generan cuando existe un adecuado control de los factores ambientales; concentración óptima de macro y micronutrientes que son indispensables para el crecimiento de las cepas seleccionadas (*Guillard, 1975*).

Dunaliella siendo una microalga que pertenece al fitoplancton marino, tiene una gran importancia ecológica, ya que constituye la base de cadenas tróficas de muchos ecosistemas acuáticos; son el alimento de una gran diversidad de organismos principalmente los pertenecientes al zooplancton como son: rotíferos, crustáceos, cladóceros, copépodos, organismos filtradores como son los moluscos y de algunos representantes de phyla superiores de animales (*Darley, 1987*).

3.2.1.- LUZ

La luz es un factor físico-químico de gran importancia así como la temperatura y las sustancias nutritivas las cuales determinan la productividad primaria de muchos ecosistemas acuáticos (*Sevilla, 1977; López, I., y col., 1994*).

Las microalgas son organismos fotoautótrofos que requieren de cierta cantidad de luz, con determinada longitud de onda, para llevar a cabo eficientemente la fotosíntesis (*Sze, 1993*).

En los mares y en los lagos salados la disponibilidad de luz que tienen las microalgas depende de varios factores: posición geográfica, hora del día, estación, movimientos del agua, intensidad de los vientos, nublado del cielo, etc. y la

cantidad de luz por lo general es muy poca (*Sevilla, 1977*).

La mayoría de las especies de microalgas que se encuentran en sistemas naturales se adaptan rápidamente a las variaciones de luz durante el día así como en las estaciones; esta capacidad se debe a que los pigmentos fotosintéticos como carotenoides, biliproteínas y clorofilas asumen funciones importantes en la absorción de energía luminosa durante la fotosíntesis (*Darley, 1987*).

La iluminación empleada en los diferentes tipos de cultivo, pueden ser de origen natural (luz solar) o puede ser artificial; y la cantidad debe ser óptima aunque ésta puede ser variada por efecto de la cantidad de nutrientes, densidad celular, profundidad y forma de cultivo (*Coll, 1983*).

Se ha comprobado que la mayoría de las especies de microalgas cultivadas en los laboratorios crecen más rápido con ciclos de luz blanca continua que con ciclos de luz-oscuridad (*Brand y Guillard, 1981*) por lo cual ha sido ampliamente recomendado la luz blanca fluorescente fría de 200 lux para especies de crecimiento lento y de más de 15000 lux, para especies de crecimiento rápido (*Mathiessen y Torner, 1968; Droop, 1969; Umebayashi, 1972; Guillard, 1973 (a); Baalen y Edwards, 1973; Hemerink, 1973; Starr, 1973; Aquacop, 1978; Ukeles, 1980; Brand, L., y Guillard, R., 1981; Trotta, 1981; Coll, 1983*).

3.2.2.- TEMPERATURA

Indudablemente éste es otro de los factores ambientales de gran importancia ecológica; su variación en los mares, en los lagos o en los cultivos puede afectar los procesos bioquímicos de las microalgas (*Darley, 1987*); es igualmente importante en otras características fisicoquímicas del medio; por ejemplo: la viscosidad del agua aumenta cuando disminuye la temperatura; la salinidad del agua en general aumenta al subir la temperatura (*Sevilla, 1977*); es una variable importante en el

proceso de recambio debido a su bien conocido efecto sobre la densidad del agua y por lo tanto sobre su estabilidad (*Darley, 1987; López, I., y col., 1994*).

Al aumentar la temperatura en los cultivos o en los ecosistemas naturales, se eleva la tasa de crecimiento hasta un valor óptimo, después del cual disminuye, con frecuencia drásticamente (*Jiménez y Niell, 1990; Sze, 1993*). La mayoría de las algas marinas crecen adecuadamente a temperaturas que van desde los 15 a 30°C y en especial *Dunaliella* es un microorganismo tolerante a altas temperaturas, siendo el óptimo entre 20 y 30 °C (*Gibor, 1956; Yurina, 1966; Borowitzka, 1981*). Se ha comprobado que presenta una mayor tolerancia a altas temperaturas, si el medio de cultivos se enriquece con vitaminas y factores de crecimiento (*Sze, 1993*).

3.2.3. - pH

Es otro de los parámetros importantes que regulan el crecimiento de las poblaciones de microalgas. El agua de los océanos y de los lagos salados es ligeramente alcalina y el valor de su pH fluctúa entre 7.5 y 8.4, aunque estos valores pueden variar ligeramente en función de la temperatura y de la salinidad (*Sze, 1993*). El pH óptimo del medio de cultivo para el crecimiento de microalgas, depende de la especie, pero suele estar comprendido entre 7 y 9 (*Coll, 1983*). Los métodos que se utilizan para controlar el pH del medio de cultivo incluyen: aireación (mezcla de aire con bióxido de carbono); adición de productos químicos y uso de tampones (carbonato - bicarbonato). La fotosíntesis provoca un aumento de pH y el resto del metabolismo de las células lo reduce (*Fogg, 1975; Brewer y Goldman, 1976; Reyes, 1990*).

Las especies del género *Dunaliella* son tolerantes a los cambios de pH y pueden desarrollarse en ambientes con valores de pH de 5.5 hasta 10 (*McLachlan, 1964*).

3.2.4.- SALINIDAD

La salinidad del agua, representa la cantidad de sólidos disueltos en un kilogramo de agua; en el mar éste factor, junto con la temperatura, la luz y el pH determinan la distribución de las microalgas y su crecimiento. La tolerancia a la variación de salinidad de las diferentes especies de microalgas suele ser amplia y puede estar comprendida entre 12 y 40 o/oo (Coll, 1983).

La salinidad óptima para muchas especies de microalgas marinas es alrededor de 20 o/oo, sin embargo algunas especies pueden presentar variedades naturales adaptadas a bajas y/o altas salinidades, como es el caso de *Dunaliella* que puede sobrevivir en aguas hipersalinas de algunos lagos y mares como el mar muerto (Sassi y Ben- Yaakov, 1977; Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988).

3.3.- EFECTO DE NUTRIENTES EN EL CRECIMIENTO DE *Dunaliella*

3.3.1.- MACRONUTRIENTES

La utilización de los nutrientes se lleva a cabo a través de los sistemas enzimáticos específicos, regulados por energía y limitados por la membrana que genera concentraciones intracelulares (nutrientes) como sustratos para los diferentes procesos metabólicos (Darley, 1987). Son pocas los elementos considerados como macronutrientes o componentes esenciales que constituyen organelos celulares, que influyen en el crecimiento y desarrollo de las microalgas, los más importantes son: Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Azufre, Potasio y Magnesio (Coll, 1983).

3.3.1.1.- CARBONO C

Siendo un microorganismo autótrofo *Dunaliella* requiere carbono inorgánico, que es utilizado por la célula para ser fijado a través de la fotosíntesis (Turpin, 1991) y es muy importante en el crecimiento de las microalgas. Las fuentes más comunes de este elemento son: bióxido de carbono, carbonatos y bicarbonatos que se encuentran disueltos en el agua, aunque las concentraciones de dichos compuestos varían en gran medida en los diferentes ecosistemas acuáticos. La cantidad de bióxido de carbono en los cultivos puede ser un factor limitante para el crecimiento de las microalgas (Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988). Este gas se añade al medio de cultivo mediante el uso de tanques de alta presión que contiene la mezcla apropiada de aire con bióxido de carbono (Coll, 1983).

3.3.1.2.- NITROGENO N

La mejor fuente de nitrógeno para *Dunaliella* es nitrato de sodio, aunque también puede utilizarse sales de amonio, urea y nitritos (Jiménez y Niell, 1990; Jiménez y Niell, 1991; Markovits, y col., 1993). Paasche, 1971, observó que el desarrollo celular de *D. tertiolecta* fué un 30% más rápido, cuando se usó amonio como fuente de nitrógeno, que con nitrato y el sugirió que el mayor contenido de enzimas fotosintéticas fué responsable de este porcentaje. El nitrógeno es también utilizado como materia prima para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, compuestos de gran importancia para la célula (Coll, 1983). Los nitritos y la urea pueden ocasionar la muerte celular cuando no se usan las concentraciones

adecuadas (Terry, y col., 1985). La deficiencia de nitrógeno en sistemas naturales o en los medios de cultivo varia la composición química de las microalgas (Fabregas, y col., 1989).

3.3.1.3.- FOSFORO P

La concentración óptima de fosfato para el crecimiento de *Dunaliella* es de 0.02 a 0.025 g/l de K_2HPO_4 , sin embargo existen algunos ecosistemas marinos donde la concentración de este compuesto puede exceder los 5 g/l por lo que el crecimiento de las microalgas se inhibe (Borowitzka M. y Borowitzka L., 1988). Este elemento al igual que el nitrógeno es muy importantes en los procesos de respiración celular, además forma parte de la estructura de compuestos importantes como: ATP, ADP, AMP, algunos aminoácidos, ácidos nucleicos y fosfolípidos entre otros (Terry, y col., 1985). *Dunaliella* tiene gran capacidad de almacenar fosfatos en forma de gránulos citoplasmáticos, los cuales actúan como reservorio de fósforo (Darley, 1987).

3.3.1.4.- AZUFRE S

El azufre pertenece al grupo de los elementos considerados como macronutrientes, ya que lleva a cabo funciones muy importantes formando parte de algunos aminoácidos como: cistina, cisteína y metionina; además de ser un constituyente esencial de proteínas, es activador de algunas enzimas; también se les encuentra en la biotina, la tiamina y la coenzima A. Existen algunos compuestos específicos en ciertas especies de microalgas que incluyen al azufre en sus moléculas, tales como sulfolípidos, compuestos sulfonados y polisacáridos

esterificados; tienen una función importante en la formación y estabilización de la estructura terciaria de enzimas y otras proteínas. *O'Kelley, 1974*, determinó que es indispensable para la división celular y su ausencia puede inhibir el crecimiento de las microalgas. La fuente más importante de este elemento es el sulfato [SO_4^{-2}] (*Massyuk, 1966*).

3.3.1.5.- POTASIO K

El potasio está relacionado con el mantenimiento del balance iónico; interviene en algunas reacciones catalíticas como activador de enzimas; está enlazado ionicamente a la enzima piruvato-quinasa, que es esencial en el proceso de respiración celular y en el metabolismo de carbohidratos (*Bidwell, 1978*); su ausencia puede provocar la inhibición de la división celular (*O'Kelley, 1974*); las fuentes que pueden utilizarse en los cultivos son KNO_3 y KH_2PO_4 (*Coll, 1983*).

3.3.1.6.- MAGNESIO Mg

El magnesio es un componente importante en la estructura de la molécula de clorofila; se encuentra involucrado en la estabilización de los ribosomas, por lo que su ausencia puede detener la síntesis de RNA (*O'Kelly, 1974*); participa en numerosas reacciones enzimáticas de diferentes maneras, ya que puede servir de enlace entre una enzima y un sustrato (*Bidwell, 1978*); su deficiencia provoca varios desordenes internos entre los que se incluyen la alteración del metabolismo del nitrógeno y la acumulación anormal de carbohidratos y polifosfatos (*O'Kelly, 1974*).

3.3.2. - MICRONUTRIENTES

[Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Cl, Co, Ca, Si, Na]

Los micronutrientes son elementos que requieren las microalgas en concentraciones mínimas; sin embargo desempeñan funciones importantes como catalizadores o reguladores de diversas reacciones dentro de la célula (Axler, y col., 1980); está demostrado que pueden afectar el crecimiento de las microalgas cuando las concentraciones son deficientes o cuando sus niveles son altos (Ramos, 1993). En las reacciones catalíticas pueden formar complejos disociables con agentes quelantes (Darley, 1987).

Kaplan y Richmond 1986 consideran que los micronutrientes deben presentar características importantes para su requerimiento: deben tener un efecto positivo sobre el crecimiento de las microalgas; su efecto fisiológico sobre la célula no debe afectar las características fisicoquímicas del medio; no debe ser reemplazado por otro elemento y sus efectos por su deficiencia debe ser reversible.

El Fe, Co, Mn, Cu, Zn y Mo actúan como cofactores de reacciones enzimáticas en las diversas rutas bioquímicas; además algunos de estos elementos forman parte de las estructuras moleculares orgánicas; el Manganeseo y el Fierro se localizan en los sitios activos de algunas enzimas; también pueden tener un papel estructural en los cloroplastos, el Manganeseo de manera más específica que el Fierro, ya que en condiciones de extrema deficiencia pierde su estructura y se desintegra, provocando clorosis como síntoma más aparente (Noro, 1981; Reyes, 1990).

El fierro es importante en la producción de clorofila (O'Kelley, 1974), además forma parte de lípidos, de los cloroplastos y de las mitocondrias (Bidwell, 1978).

El Cobre participa en algunos procesos enzimáticos formando parte de la estructura de las enzimas polifenol-oxidasa y ácido ascórbico-oxidasa (Bidwell, 1978); se encuentra en la plastocianina de los cloroplastos. El Molibdeno tiene como papel importante el de participar en la reducción y asimilación de nitratos y en la fijación de Nitrógeno elemental (Reyes, 1990). El Zinc participa en las síntesis de proteínas; se encuentra en el ácido láctico, ácido glutámico y en la pirimidina deshidrogenasa (Salisbury y Ross, 1978). El Cobalto es esencial para algunas microalgas, aunque se requiere en pequeñísimas cantidades, su principal papel en los cultivos es el de estimular el crecimiento de las microalgas (O'Kelley, 1974).

Los requerimientos de *Dunaliella* con respecto a los micronutrientes son: el fierro de 1.25 hasta 3.75 mg/l, valores superiores a esta concentración inhiben su crecimiento (Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988); de Mn es de 0.1 hasta 0.5 p.p.m. (Noro, 1981). Con respecto a los otros micronutrientes no se tienen datos precisos.

El calcio es importante en la síntesis de pectina; está involucrado en la formación de núcleos y mitocondrias (Reyes, 1990); su deficiencia inhibe la división celular o provoca que ésta sea incompleta en la que sólo hay mitosis sin formación de nuevas paredes (Hellebust, 1976; Bidwell, 1978).

3.3.3. - VITAMINAS

La mayoría de las especies de microalgas, requieren de concentraciones muy pequeñas de vitaminas, entre las que destacan: vitamina B₁₂, tiamina o biotina. En condiciones naturales las concentraciones encontradas van de, décimas a centenas de ng/l (*Provasoli y Carlucci, 1974*). El papel de las vitaminas está relacionado con el crecimiento y reproducción (*Sevilla, 1977*).

3.4. - DISTRIBUCION ECOLOGICA

La distribución ecológica del género *Dunaliella* es muy amplia, siendo un constituyente del fitoplancton y base de muchas cadenas tróficas importantes de ecosistemas marinos (*Dellarossa y Cifuentes, 1991*). *Dunaliella* pertenece a la minoría de las microalgas que se multiplican en hábitats extremos (*Massyuk, 1966; Spectorova, y col., 1982*); sobreviven en salinidades de 0.1 hasta 5 M de NaCl (*Ben-Amotz y Avron, 1983; Javor, 1989; Richmond, 1990; Jiménez y Niells, 1991*). Sin embargo son dominantes en medios hipersalinos como son las aguas del mar muerto en Israel, el gran lago salado de Utah o los lagos hipersalinos del valle de Natrum en Egipto (*Post, 1977; Brock, 1975; Imhoff, y col., 1979; Borowitzka, M. y Borowitzka, L. 1988*).

La capacidad de *Dunaliella* para sobrevivir en estas condiciones de salinidad depende de su habilidad para sintetizar altas concentraciones de glicerol intracelular que les permite mantener el balance osmótico con la concentración de sal extracelular (*Borowitzka y Brown, 1974; Borowitzka, M. y Borowitzka, L. 1988*).

Dunaliella es una de las principales microalgas que generan la productividad primaria en aguas con una salinidad mayor del 20% y temperaturas superiores a los 30°C con pH = 8.0, así como altas concentraciones de magnesio (Mg^{+2}) y sulfatos (SO_4^{-2}) (Volcani, 1944; Oren y Shilo, 1982; Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988).

Las poblaciones naturales de *Dunaliella* presentan distintas tendencias estacionales con respecto a su densidad: en el mar muerto es más abundante a mitad de verano cuando la temperatura del agua excede los 30 °C (Oren, 1981; Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988), predominando en la superficie o a pocos centímetros de profundidad; sin embargo algunas especies se han encontrado a una mayor profundidad, y tienden a emigrar hacia la superficie o hacia los sedimentos en cuerpos de agua poco profundos; esto ocurre cuando se presenta alguna variación en la intensidad de luz (Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988); éste patrón de migración muestra en parte, la respuesta fotosintética de las microalgas a la gran intensidad de luz. Algunas poblaciones de algas pueden ser desplazadas sobre la superficie del agua debido al viento o a la turbulencia (Sze, 1993).

La alta salinidad del agua en la cual *Dunaliella* vive, reduce grandemente el número de predadores. A salinidades superiores de 25%, uno de los depredadores del género es el protozoario *Bodo sp.* y a un poco menor de esta salinidad puede ser el flagelado *Heteroamoeba sp.* y el ciliado *Cladotricha sigmoidea* (Post, y col., 1983; Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988). Si la salinidad es menor a 20% sus depredadores más comunes son el ciliado *Fabrea salina* y *Artemia salina*, los cuales pueden reducir severamente una población natural de *Dunaliella* (Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988).

En sistemas naturales los factores limitantes para el desarrollo de *Dunaliella* son: la concentración de nutrientes, CO_2 , luz, así como la gran diversidad y número de depredadores, (Sze, 1993).

Dunaliella es también excepcionalmente tolerante a metales pesados como el cobre (Lustigman, 1986); plomo (Mandelli, 1969; Pace, y col., 1977; Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988); cadmio (Jenning y Rainbow, 1979), así como hidrocarburos clorados como el D.D.T., algunos de estos elementos son componentes esenciales de moléculas vitales como el Mg en la clorofila, el Fe de los citocromos y ferredoxinas; el cobre de las plastocianinas, las metalproteínas y los metalflavoproteínas (Ramos, 1993); además estos metales participan en alguna de las rutas metabólicas de las microalgas (Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988).

3.5.- TAXONOMIA

REINO: Protista

CLASE: Chlorophyceae

ORDEN: Volvocales

FAMILIA: Polyblepharidaceae

GENERO: *Dunaliella*

ESPECIES: *D. tertiolecta* (Butcher) y *D. salina* (Dunal) Teodoresco;
(Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988).

El primero en describir este género fue Teodoresco (1905) así como *Dunaliella salina*, la cual fue nombrada en honor a M. F. Dunal quien reconoció las características de esta especie (Dunal, 1937); sin embargo de las 29 especies reconocidas actualmente para este género *Dunaliella tertiolecta* y *Dunaliella salina* son las especies más estudiadas para cultivo masivo (Fabregas, y col., 1986); honor a su gran capacidad para acumular metabolitos como es el glicerol y carotenos en

condiciones especiales de luz, salinidad, temperatura y materiales nutricionales (Ben-Amotz y Avron, 1980; Dellarossa y Cifuentes, 1991).

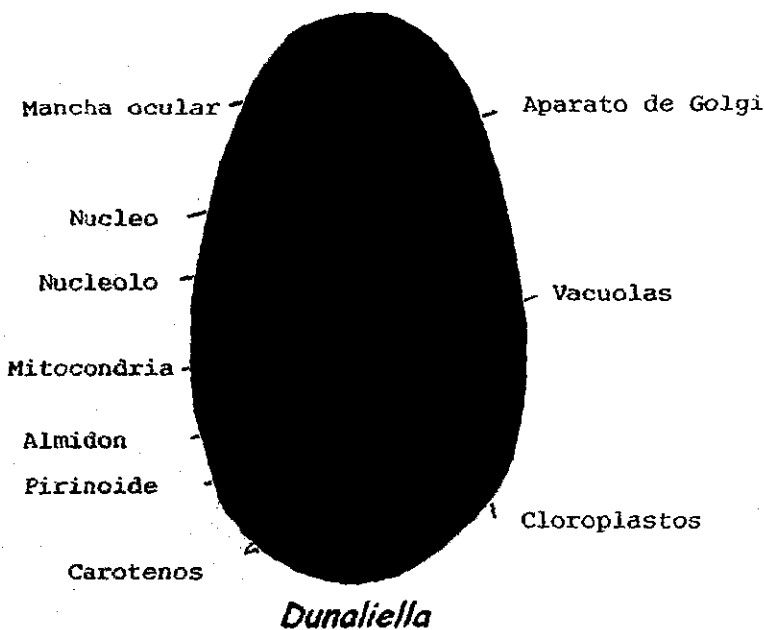
3.6.- MORFOLOGIA

LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MAS IMPORTANTES PARA EL GENERO SON:

Microalgas unicelulares de color verde, muy similares morfológicamente a *Chlamydomonas* (Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988), distinguiéndose de este género principalmente por la ausencia de pared celular, (Oliviera, y col., 1980; Klut, Bisalputra y Antia , 1983; Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988) su membrana citoplasmática puede ser observada claramente a través de un microscopio electrónico, especialmente durante la fase estacionaria del crecimiento celular (Melkonian y Preisig, 1984; Borowitzka, observación no publicada).



Dunaliella



Dunaliella presenta formas muy variadas, las cuales pueden ser esféricas, elipsoidales; sin embargo la forma oval es la más representativa para el género; presenta radio bilateral o dorsiventral simétrico o formas asimétricas; las cuales pueden ser cambiadas bajo condiciones desfavorables, siendo la esférica la más frecuente en estas condiciones (Sze, 1993).

Los tamaños son variables que van de 4 a 10 micras de ancho y 15 micras de largo (Richmond, 1990). Presentan gran movilidad debido a la presencia de dos flagelos apicales de igual tamaño (Richmond, 1990).

El cloroplasto ocupa aproximadamente la mitad del volumen celular y contienen un gran pirenoide central rodeado por gránulos de polisacaridos (Richmond, 1990). La generalidad de las especies presentan una mancha ocular lateral llamada estigma (Borowitzka, M. y Barowitzka, L., 1988).

3.7.- REPRODUCCION

(ASEXUAL Y SEXUAL)

La reproducción asexual es por división binaria, en la cual la célula madre se segmenta longitudinalmente formando dos células hijas idénticas (*Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988*). Bajo ciertas condiciones la célula también puede formar palmela con una gruesa capa de mucílago o raramente quistes (aplanospora) con una gruesa y dura pared. La aplanospora es formada usualmente bajo ciertas condiciones extremas como puede ser una drástica dilución del medio o en un ambiente seco (*Borowitzka, M. y Borowitzka, L., 1988*).

La reproducción sexual es por isogamia, en donde dos células iguales (gametos) se fusionan resultando un huevo o cigoto el cual crece adquiriendo un color verde o rojo rodeado por una gruesa y lisa pared; el núcleo del cigoto se divide formando hasta 32 células hijas las cuales son liberadas al romperse la membrana celular de la célula madre (*Borowitzka, M., y Borowitzka, L., 1988*).

IV.- OBJETIVOS

Obtener altas densidades y de gran calidad nutricional de las células en los cultivos de *Dunaliella tertiolecta* y *Dunaliella salina* utilizando diferentes sustratos orgánicos de desecho.

Determinar la calidad nutricional de las microalgas obtenidas de los cultivos con medio semi-sintético así como de los sustratos orgánicos.

Utilizar diferentes técnicas de cultivo para la obtención de cantidades masivas de *Dunaliella tertiolecta* y *Dunaliella salina*.

V.-MATERIALES Y METODOS

5.1.-LAVADO Y SECADO DE MATERIALES

Todos los materiales que fueron utilizados (de vidrio, de plástico y de metal) fueron lavados rigurosamente con agua y jabón y cuando fue requerido se utilizó mezcla crómica y posteriormente fueron secados a temperatura ambiente o también en una estufa a 100°C durante una hora.

5.2.- ESTERILIZACION (Stein, 1973)

Todos los materiales de vidrio (matraces erlenmeyer de diferentes capacidades, pipetas, cajas de petri, tubos de diferentes diámetros que se usaron en los tapones y en los filtros) fueron esterilizados por calor seco en una estufa a 150°C durante una hora aproximadamente.

Los medios de cultivos contenidos en matraces de 50, 250, 500 y 2000 ml, así como: tapones de hule, mangueras, frascos de plástico; todos estos materiales fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave a 15 lb de presión o a 120 °C durante 20 minutos.

Los medios de cultivo contenidos en garrafones y bolsas de plástico con más de 12 litros de capacidad fueron esterilizados con luz ultravioleta durante 12 horas.

5.3.- CEPAS

Dunaliella tertiolecta y *Dunaliella salina*

Estas especies de origen marino forman parte del cepario del laboratorio de Ecología, Departamento de Zoología, ENCB, IPN.

Las microalgas son mantenidas con medios sintéticos en matraces de diferentes capacidades, según el caso y conservadas en cajas de petri o en viales a temperatura de refrigeración.

Debido a las características y propiedades morfológicas y fisiológicas que presentan *D. salina* y *D. tertiolecta*, así como su uso en ACUACULTURA, el conocimiento y experiencia que se tiene en el laboratorio de Ecología en relación al cultivo de estas cepas; fueron los aspectos más importantes que se consideraron para su elección y propósitos del presente trabajo.

5.4.- MEDIOS DE CULTIVO (McLachlan, J., 1973; Stein, 1973)

Los medios de cultivo semi-sintéticos usados en el crecimiento de las cepas seleccionadas fueron: el medio de cultivo para el género *Dunaliella* y el medio de Walne (Helm, Laing y Jones, 1979; Guillard, R., 1973 (b)) que han sido usados para el mismo fin en el laboratorio de Ecología, ENCB, IPN. Es necesario mencionar que estos medios fueron utilizados para enriquecer al agua de mar, los cuales ofrecen los requerimientos nutricionales que las microalgas necesitan para su proliferación.

Los medios semi-sintéticos fueron usados para preparar los inóculos y testigos en los experimentos.

MEDIO DE CULTIVO PARA EL GENERO *Dunaliella* (Borowitzka, 1988).

REACTIVO	CANTIDAD g/l
Agua de mar a 22 o/oo	
6.024	
NaHCO ₃	1.680
KNO ₃	0.505
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.232
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.033
KH ₂ PO ₄	0.014
Solución de FeCl ₃ [FeCl ₃ (.32 mg) + EDTA (5.84 mg)] [agregar 50 ml / l de medio]	
SOL. DE ELEMENTOS TRAZA	[agregar 10 ml / litro de medio]
H ₃ BO ₃	61.0 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	4.1 mg
ZnCl ₂	4.1 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	5.1 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	34.0 µg/l ó
CuSO ₄ .5H ₂ O	6.0 mg

MEDIO SINTETICO DE WALNE (Helm, Laing y Jones, 1979)

Soluciones que fueron usadas para enriquecer el agua de mar estéril.

REACTIVO	CANTIDAD g/l
SOLUCION A	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1.30
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.36

H ₃ BO ₃	33.6	
EDTA	45.0	
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20.0	de esta mezcla se agrega
NaNO ₃	100.0	1 ml por litro de medio

SOLUCION DE METALES TRAZA

	g/100 ml	
ZnCl ₂ .6H ₂ O	2.1	
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.0	
[NH ₄] ₆ Mo ₇ O ₂₄ .H ₂ O	0.9	de esta mezcla se agrega
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.0	1 ml por litro de medio

SOLUCION B

	mg/100 ml	
Vitamina H	10.0	
Vitamina B ₁₂	10.0	de esta mezcla se agrega
Vitamina B ₁	100.0	0.1 ml por litro de medio

La concentración salina del agua de mar utilizada para la preparación de los medios de cultivo fue de 22 o/oo; pH de 8.0 y bajo condiciones de esterilidad le fueron suministrados en cantidades adecuadas las soluciones patrón del medio de Walne ó el medio de Dunaliella

5.5.- SUSTRATOS ORGANICOS

EXCRETAS DE CONEJO, CAPARAZON DE CAMARON Y GALLINAZA

Se realizó un análisis bromatológico de los sustratos orgánicos elegidos para determinar su contenido de humedad, fibra cruda, lípidos, proteínas y cenizas; de

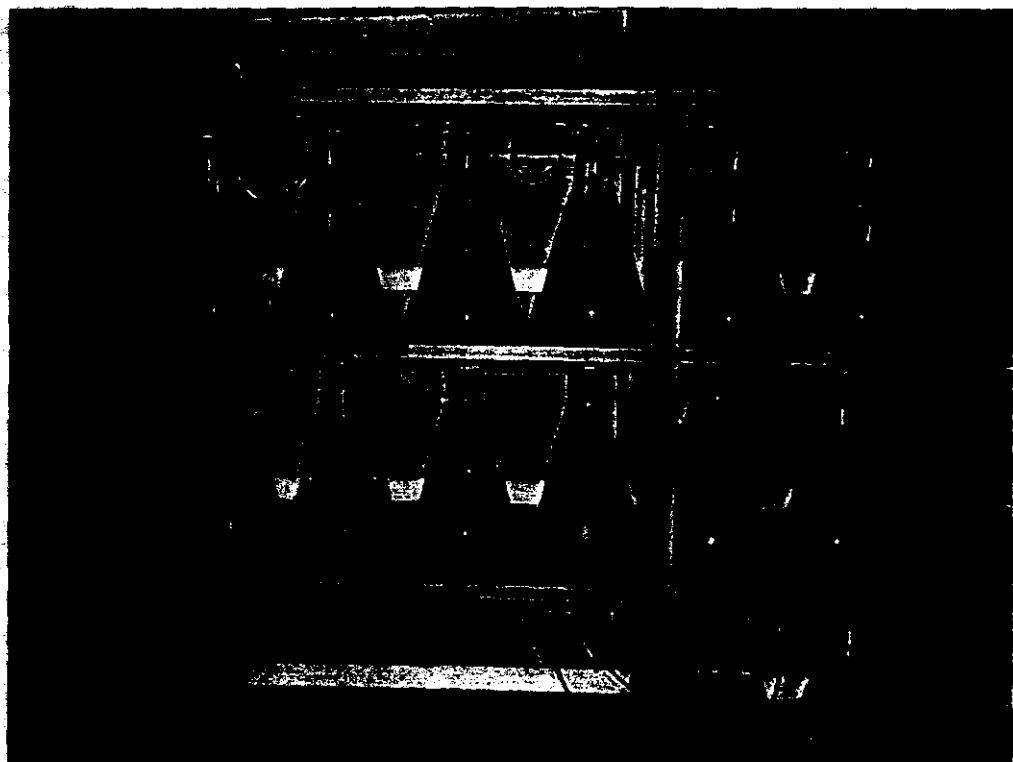
esta forma se pudo valorar su posible uso como fuente de nutrientes para cultivos de microalgas.

Se preparó una suspensión inicial utilizando 1 gramo de sustrato orgánico por ml de agua de mar al 22 o/oo. Se dejó 7 días para su digestión y posteriormente de ésta suspensión se realizaron varias diluciones.

La primera exploración que se hizo para conocer el comportamiento de las microalgas cultivadas con estos sustratos fue a través de diluciones 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 y 1:100, posteriormente se probaron otras diluciones, las cuales fueron las siguientes: 1:200, 1:800 y 1:2000.

5.6.- CULTIVOS POR LOTE (Spectorova, y col., 1982)

Los cultivos en matraces o por lote se llevaron a cabo partiendo de cepas que son conservadas en viales a temperatura de refrigeración; de ahí fueron inoculadas en matraces erlenmeyer de 125 ml de capacidad con 80 ml de medio. Para *D. salina* se usó el medio de WALNE y para *D. tertiolecta* se utilizó el medio específico para *Dunaliella*. Estos cultivos fueron puestos a un periodo de incubación durante 7 días, tiempo necesario para obtener una densidad celular de aproximadamente 0.5 de absorbancia, leída a una longitud de onda de 660 nm; posteriormente se inocularon matraces de mayor tamaño para obtener las cantidades deseadas de células, las cuales fueron utilizadas como inóculos para cada uno de los diferentes bloques de cultivos que comprenden este trabajo.



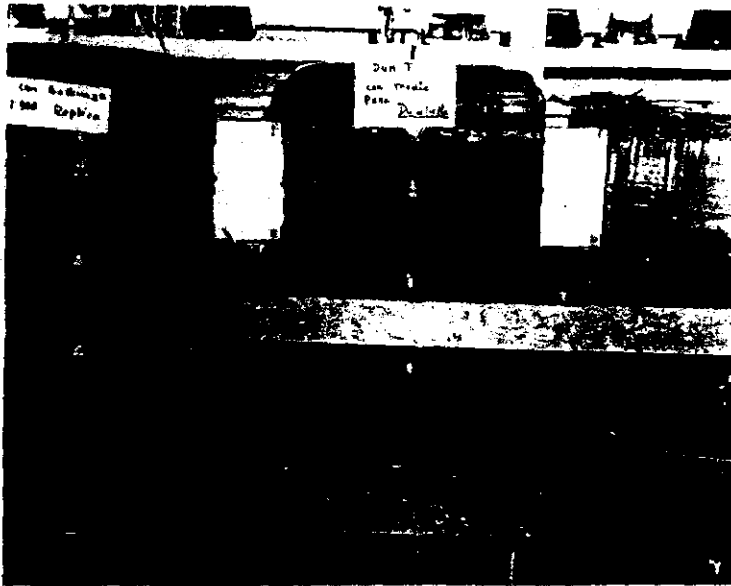
CULTIVOS POR LOTE

Durante la primera etapa [cultivos por lote], se utilizaron matraces de 500 ml de capacidad con 350 ml de medio y 50 ml de inóculo, dividido en dos bloques. En el primero se eligió a *D. salina* como cepa, los tres sustratos orgánicos en las diluciones 1:200, 1:800 y 1:2000 y un testigo en el cual se usó el medio de WALNE. En el segundo bloque se utilizó a *D. tertiolecta*, los tres sustratos con sus diluciones y para el testigo se empleó el medio específico para DUNALIELLA.

De éstos cultivos se llevó el registro periódicamente de la temperatura, pH, y densidad celular

5.7.- CULTIVOS MASIVOS (Goldman, J., 1980)

Los cultivos masivos fueron realizados en dos tipos de recipientes: en garrafones de 19 litros de capacidad, con 14 lts. de medio y 2 lts. de inóculo con una absorbancia de 0.5 equivalente a 5.8×10^6 cel. /ml con ambas cepas y los tres sustratos orgánicos así como sus respectivas diluciones. También se utilizaron bolsas de polietileno con 10.5 litros de medio 1.5 litros de inóculo; con *Dunaliella salina* y solamente dos sustratos: caparazón de camarón y gallinaza con dos diluciones 1:200 y 1:800, ambos tratamientos estuvieron bajo condiciones físico-químicas semejantes. También se llevó el registro de la temperatura, pH, absorbancia y cuenta celular. Es importante mencionar que se obtuvieron muestras de todos estos cultivos correspondientes a la fase estacionaria de la cinética de crecimiento para su respectivo análisis bromatológico.



CULTIVOS EN GARRAFON



CULTIVOS EN BOLSA

5.8.- CONDICIONES DE CULTIVO

Temperatura: ambiente (20 a 32°C)

Salinidad: 22 o/oo

pH: 8.0

Iluminación: *continua* con lámparas fluorescentes de luz blanca de 100 watts

Aireación: *constante* suministrada con una compresora; con un filtro conteniendo una trampa de algodón o fibra de vidrio; la cual permitió eliminar algunos contaminantes.

Estas condiciones prevalecieron en todos los cultivos.

Durante el crecimiento (7 a 30 días aproximadamente); diariamente se revisaron: la aireación, la iluminación, presencia excesiva de bacterias o de protozoarios; así mismo se realizó la reposición del agua evaporada durante cada periodo de 24 horas. Para determinar el pH, la salinidad y la temperatura en cada periodo de tiempo, se extrajo una alícuota de 3.5 ml, de cultivo la cual se separaron 0.7 ml para la determinación de proteína; posteriormente del resto de la alícuota, una parte se usó para la lectura de la absorbancia a 660 nm y cuenta celular en cámara de Neubauer y el resto para la determinación de los otros parámetros (pH y temperatura).

5.9.- DETERMINACION DE PROTEINAS POR LA TECNICA DE LOWRY (Lowry, 1951).

Las proteínas son los componentes esenciales de los alimentos y se utilizan en la síntesis y regeneración de tejidos, así como en la regulación de procesos metabólicos.

- 1.-De la muestra que se colectó todos los días (0.7 ml) se le agregaron 0.3 ml de NaOH 1 N.
- 2.-Se preparó un testigo, sustituyendo la muestra por agua destilada.
- 3.-Las muestras y el testigo fueron colocados en baño María hasta su ebullición durante 10 minutos.
- 4.-Todos los tubos con las muestras fueron enfriados con agua corriente.

5.-Se añadieron 2.5 ml del reactivo D que fue preparado en el momento en que se usó.

REACTIVO D [reactivo A + reactivo B + reactivo C]

REACTIVO A [100 ml de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N]

REACTIVO B [1.0 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%]

REACTIVO C [1.0 ml de tartrato de sodio y de potasio al 2%]

6.-Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos

7.-Se añadieron 0.5 ml del reactivo de folin diluido 1:2 con agua.

8.-Fueron colocados en un baño María a 37°C en la obscuridad durante 30 minutos.

9.-Se tomaron lecturas de todas las muestras en un espectrofotómetro Baush & Lomb a 660 nm.

CURVA PATRON

Tubo	Cantidad de albúmina sérica de bovino	Agua	Concentración en microgramos/ml proteínas.
1	0.5	4.5	50
2	1.0	4.0	100
3	1.5	3.5	150
4	2.0	3.0	200
5	2.5	2.5	250
6	3.0	2.0	300
7	3.5	1.5	350
8	4.0	1.0	400
9	4.5	0.5	450
10	5.0	0.0	500

La fórmula utilizada para calcular el contenido de proteínas en todas las muestras de los diferentes cultivos, por medio de la técnica de Lowry fue la siguiente.

$$\text{mg de P/ml} = \frac{\text{interpolación de la lectura en la curva patrón}}{\text{cantidad de muestra / volumen empleado}} \times \text{Dilución}$$

5.10.- ANALISIS BROMATOLOGICO

(Whitehouse, y picos; 1984)

Se le practicó un análisis bromatológico a los sustratos orgánicos seleccionados y de la biomasa algal obtenida con medio sintético (testigos), así como la que se obtuvo con los sustratos orgánicos de desecho. Las muestras utilizadas para este fin se obtuvieron centrifugando los cultivos de los garrafones y de las bolsas de ambas cepas cuando alcanzaron la fase estacionaria de la cinética de crecimiento de cada tratamiento y de esta forma se determinó la calidad nutricional como alimento de las microalgas y como fuente de nutrientes de los sustratos orgánicos. Se determinó: contenido de humedad, extracto etéreo, fibra cruda, proteínas totales y cenizas.

5.10.1.- CONTENIDO DE HUMEDAD

La técnica empleada para determinar el contenido de humedad, fue la de secado por calor. El calor seco generado permitió la evaporación del agua contenida en las muestras, sin alterar su estructura.

Material usado: cajas de petri, pinzas para crisol, horno, desecador, espátula metálica, pesafiltros y balanza analítica.

Procedimiento:

- 1.- Se determinó el peso constante de los pesafiltros vacíos.
- 2.- Se colocaron 2 gramos de muestra en cada pesafiltro [por triplicado].
- 3.- Se dejaron en un horno durante 2 horas a 200°C.
- 4.- Transcurrido este tiempo, los pesafiltros con las muestras fueron colocadas en un desecador y pesadas hasta obtener su peso constante.

Cálculos:

$$\% \text{ humedad} = \frac{[B - A]}{PM} \times 100$$

Donde: A = peso del recipiente con la muestra seca.

B = peso del recipiente con la muestra.

PM = peso de la muestra.

5.10.2.- EXTRACTO ETereo

El contenido de lípidos en las muestras fue obtenida por medio de la extracción con solventes [éter etílico] y es reportada como la fracción soluble en éter o grasa cruda. Esta fracción contiene ceras, fosfátidos, esteroides, aceites volátiles y otros.

Método de Soxhlet

Es una técnica de extracción continua en la que se empleó éter etílico como solvente.

Materiales: Aparato de Soxhlet, cartucho poroso de papel filtro, parrilla eléctrica, horno, balanza analítica, éter etílico.

Procedimiento:

- 1.- Se pesaron 2 gramos de muestra seca en el cartucho de papel, enseguida se colocó un tapón de algodón a cada cartucho.
- 2.- Los cartuchos con las muestras fueron colocadas en el aparato extractor.
- 3.- En la parte inferior del sistema se colocó un matraz de fondo plano que fué puesto previamente a peso constante; se le añadió 100 ml de éter de tal forma que se logró las descargas suficientes y extraer los lípidos.
- 4.- Se colocó el refrigerante correspondiente al aparato Soxhlet para llevar a cabo los reflujos.
- 5.- Bajo estas condiciones se mantuvo durante 4 horas aproximadamente hasta terminar la extracción.
- 6.- Se dejó transcurrir el tiempo suficiente para obtener el extracto frío y posteriormente se colocó en un horno hasta lograr su peso constante.
- 7.- Por diferencia de peso se determinó el % de lípidos usando la siguiente

fórmula:

$$\% \text{ de extracto etéreo} = \frac{[p - P]}{M} \times 100$$

Donde: P = peso del cartucho antes de desengrasar.

p = peso del cartucho desengrasado.

M = muestra en gramos.

5.10.3.- DETERMINACION DE PROTEINAS

Método de Kjeldahl

Este método se llevó a cabo en tres etapas: **digestión, destilación y titulación.**

Materiales: aparato de digestión; matraces kjeldahl de 100 ml, matraces erlenmeyer de 500 ml; soporte universal; probeta graduada de 100 ml; bureta de 50 ml; espátula; balanza analítica; ácido sulfúrico concentrado; NaOH al 50%; H₂SO₄ al 0.1 N., mezcla digestora, ácido bórico al 2 %, indicador rojo de metilo; granallas de zinc y perlas de ebullición.

Procedimiento

Digestión

- 1.- Se pesaron 0.5 g de muestra seca y se colocaron en un matraz kjeldahl.
- 2.- Se pesaron 8 gramos de mezcla digestora y se colocaron en el matraz kjeldahl.
- 3.- Se añadieron 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y se adicionaron 4 perlas de ebullición.
- 4.- Se colocó el aparato de digestión y se puso a ebullición la muestra hasta que dejó de salir vapores blancos.
- 5.- Después de 2 horas se desconectó el aparato y se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente.

Destilación y titulación

- 1.- Una vez que se enfrió el matraz kjeldahl, toda la muestra se cambió a un matraz redondo de fondo plano, al cual se le adicionaron poco a poco 300 ml de agua destilada y se agitó suavemente.
- 2.- Se añadieron 90 ml de NaOH al 50 % evitando que reaccionara bruscamente.
- 3.- Se agregaron 2 granallas de zinc.
- 4.- Se agitó suavemente el matraz y se procedió a destilar 200 ml de muestra aproximadamente.
- 5.- Una vez que se obtuvo la destilación se desconectó el aparato y se llevó a cabo una titulación con ácido sulfúrico 0.1 N.

Cálculos

$$\% \text{ de N} = \frac{[\text{ ml de H}_2\text{SO}_4] [\text{ N del H}_2\text{SO}_4] [0.014]}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

Donde: % de N = es el porcentaje de nitrógeno.

N del H₂SO₄ = es la normalidad del ácido.

0.014 es una constante.

5.10.4.- FIBRA CRUDA

La fibra cruda es el término que se aplica al residuo de cualquier producto natural o elaborado después de la separación de los materiales solubles en ácido o

álcali diluido.

Durante la hidrólisis ácida, la muestra se sometió a la acción del ácido sulfúrico y aplicando calor se hidrolizaron las proteínas presentes en la muestra. En la hidrólisis alcalina con NaOH, las grasas se hidrolizaron permaneciendo únicamente los carbohidratos.

Materiales: Matraz de bola de fondo plano de 250 ml, refrigerante, quitazato, papel filtro, crisoles, horno, mufla, espátula, balanza analítica, ácido sulfúrico al 1.25 %, NaOH al 1.25 %, alcohol absoluto.

Procedimiento

Hidrólisis ácida

- 1.- Se pesaron 2 g de muestra obtenida del extracto de etéreo que se colocaron en un matraz redondo, se añadieron 200 ml de ácido sulfúrico al 1.25 %.
- 2.- Se calentó y una vez iniciada la ebullición se dejaron transcurrir 30 minutos.
- 3.- Posteriormente se filtró al vacío y se lavó con agua destilada caliente hasta obtener la neutralidad y se dejó secar a temperatura ambiente.

Hidrólisis alcalina

- 1.- Se trasladó el contenido del papel filtro [muestra] a un matraz al cual se le adicionaron 200 ml de NaOH al 1.25 % y se calentó hasta ebullición durante 30 minutos.
- 2.- Una vez terminada esta, se filtró la solución al vacío y se lavó con agua destilada caliente; enseguida se le añadieron 40 ml de alcohol etílico.
- 3.- Se paso la muestra a un crisol, puesta a peso constante previamente, la cual fue

colocada en un horno durante 2 horas a 200 °C, hasta lograr también su peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{[\text{peso del crisol con muestra (horno) }] - [\text{peso del crisol con muestra (mufla) }]}{\text{peso de la fibra cruda}}$$

Donde:

peso de la muestra original..... 100 %

peso de la fibra cruda..... X

X = % de fibra cruda en la muestra

5.10.5.- DETERMINACION DE CENIZAS

Esta determinación corresponde al residuo obtenido después de destruir toda la materia orgánica de la muestra por medio de la incineración.

Representa la parte inorgánica de la muestra, especialmente como el hierro, calcio, magnesio, sodio, azufre y fósforo.

Materiales: crisol, pinzas para crisol, mechero, tripie, mufla, desecador, espátula y balanza analítica.

Procedimiento:

- 1.- Se colocó la muestra en un crisol y enseguida se peso.
- 2.- La muestra fue incinerada completamente.
- 3.- Posteriormente se colocó en una mufla a una temperatura de 550 °C durante una hora.

4.- Transcurrido este tiempo, el crisol con las cenizas fue colocado en un desecador y después de 30 minutos se procedió a pesar.

Cálculos:

$$[PCM - PCV] = PM$$

$$[PCC - PCV] = PC$$

Donde: PCM = peso del crisol con la muestra.

PCC = peso del crisol con cenizas.

PCV = peso del crisol vacío.

PM = peso de la muestra.

PC = peso de las cenizas.

$$PM \dots\dots\dots 100 \%$$

$$PC \dots\dots\dots X$$

X = % de cenizas en la muestra.

VI.- RESULTADOS

La tabla 1 muestra los resultados de análisis bromatológico realizados a los sustratos orgánicos: excretas de conejo, caparazón de camarón y gallinaza.

TABLA 1

Contenido de proteínas, grasas, fibra cruda, humedad y cenizas de los sustratos orgánicos elegidos. Todos los valores están dados en porcentajes.

SUSTRATO ORGANICO	PROTEINAS	E. ETereo	F. CRUDA	HUMEDAD	CENIZAS
EXCRETAS DE CONEJO	32.81	2.85	31.90	16.53	15.61
CAPARAZON DE CAMARON	38.90	3.44	27.90	6.70	22.66
GALLINAZA	35.09	6.97	21.68	14.24	21.62

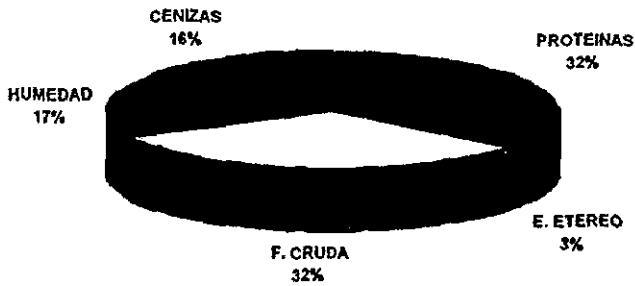
6.1.-CULTIVOS EN MATRAZ DE

Dunaliella salina

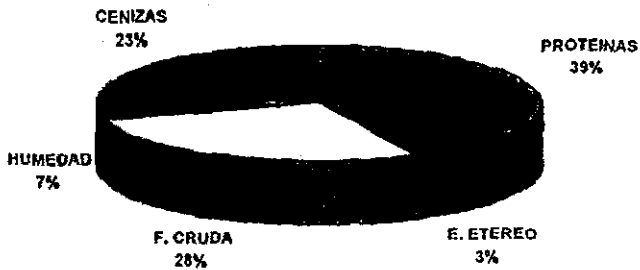
[DE 500 ml DE CAPACIDAD CON 350 ml DE MEDIO y 50 ml DE INOCULO A 0.5 DE ABS. Y 7.5×10^6 CEL. / ml]

A continuación se muestran las tablas 2,3, y 4 con sus respectivas gráficas [1,2, y 3] en la cual se muestran las lecturas de absorbancia leídas a una longitud de onda de 660 nm de cada una de las diluciones usando los sustratos orgánicos como fuente de nutrientes y un testigo; así también se muestran el registro de la temperatura en °C; y la variación del pH.

**ANALISIS BROMATOLOGICO DE SUSTRATO ORGANICO
"EXCRETAS DE CONEJO"**



**ANALISIS BROMATOLOGICO DEL SUSTRATO ORGANICO
"CAPARAZON DE CAMARON"**



**ANALISIS BROMATOLOGICO DEL SUSTRATO ORGANICO
"GALLINAZA"**

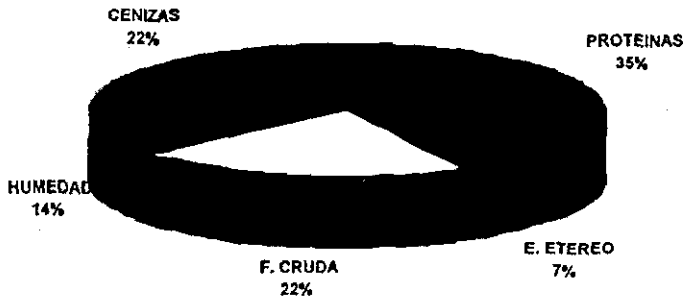


TABLA 2

CEPA: *Dunaliella salina*

TESTIGO: MEDIO DE WALNE

TRATAMIENTO: EXCRETAS DE CONEJO

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000
0	28	0.150	0.119	0.118	0.130
2	29	0.312	0.161	0.177	0.183
3	30	0.374	0.193	0.203	0.216
4	29	0.419	0.229	0.225	0.239
5	30	0.477	0.269	0.231	0.255
7	31	0.577	0.289	0.246	0.261
8	31	0.623	0.312	0.248	0.264
9	31	0.707	0.288	0.252	0.269
11	31	0.826	0.286	0.250	0.267
12	30	0.927	0.280	0.248	0.263
14	32	0.927	0.278	0.247	0.260
VARIACION EN EL pH: INICIAL		8.00	8.08	8.04	8.05
FINAL		8.89	8.30	8.49	8.45

TEMPERATURA °C

LAS LECTURAS DEL TESTIGO Y LAS DILUCIONES SON DE LA ABSORBANCIA [nm] EN TODAS LAS TABLAS.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: EXCRETAS DE CONEJO (CULTIVOS POR LOTE)

GRAFICA 1

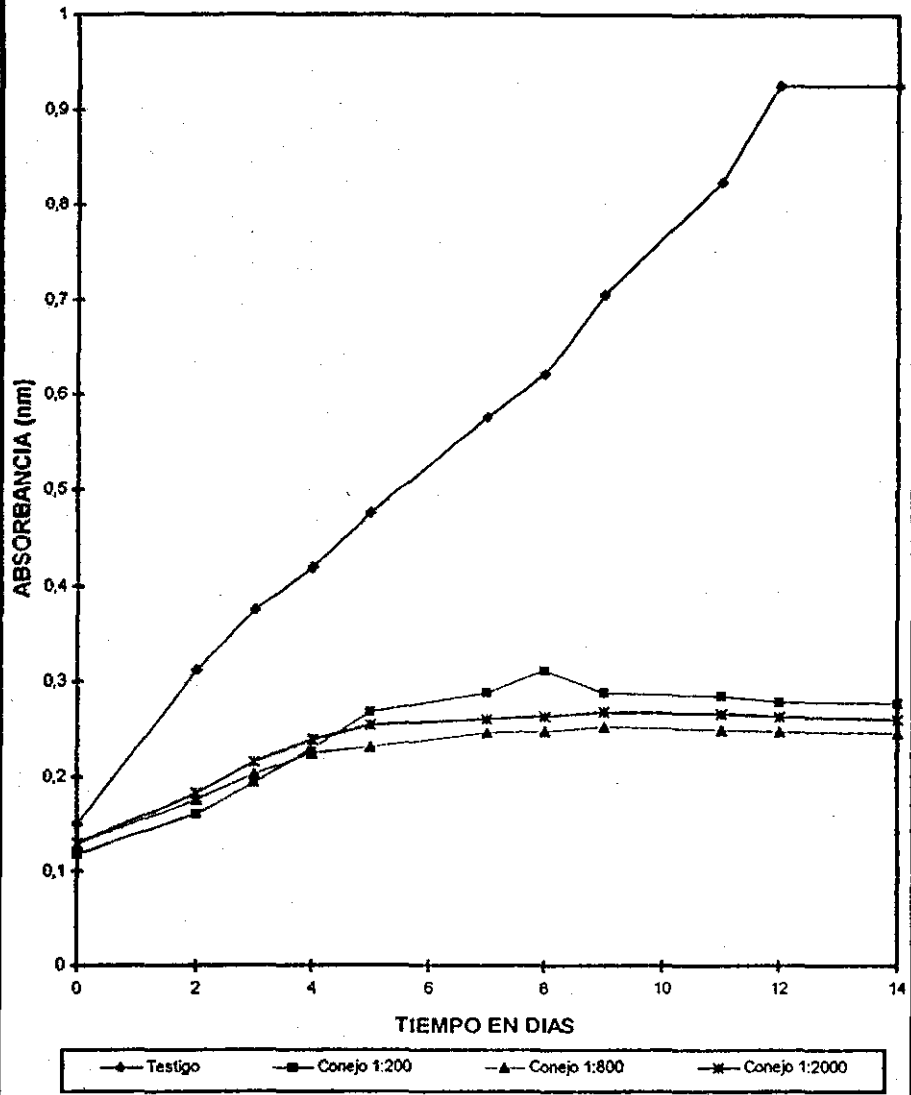


TABLA 3

CEPA: *Dunaliella salina*

TESTIGO: MEDIO DE WALNE

TRATAMIENTO: CAPARAZON DE CAMARON

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000
0	28	0.150	0.153	0.140	0.127
2	29	0.312	0.464	0.403	0.335
3	30	0.374	0.521	0.470	0.352
4	29	0.419	0.574	0.570	0.442
5	30	0.477	0.625	0.619	0.484
7	31	0.577	0.700	0.772	0.605
8	31	0.623	0.722	0.825	0.644
9	31	0.707	0.752	0.845	0.675
11	31	0.826	0.757	0.978	0.718
12	30	0.927	0.767	1.022	0.728
14	32	0.927	0.770	1.033	0.739
VARIACION EN EL pH:					
	INICIAL	8.00	7.66	7.88	7.90
	FINAL	8.89	8.84	8.95	8.57

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: CAPARAZON DE CAMARON (CULTIVOS POR LOTE)
GRAFICA 2

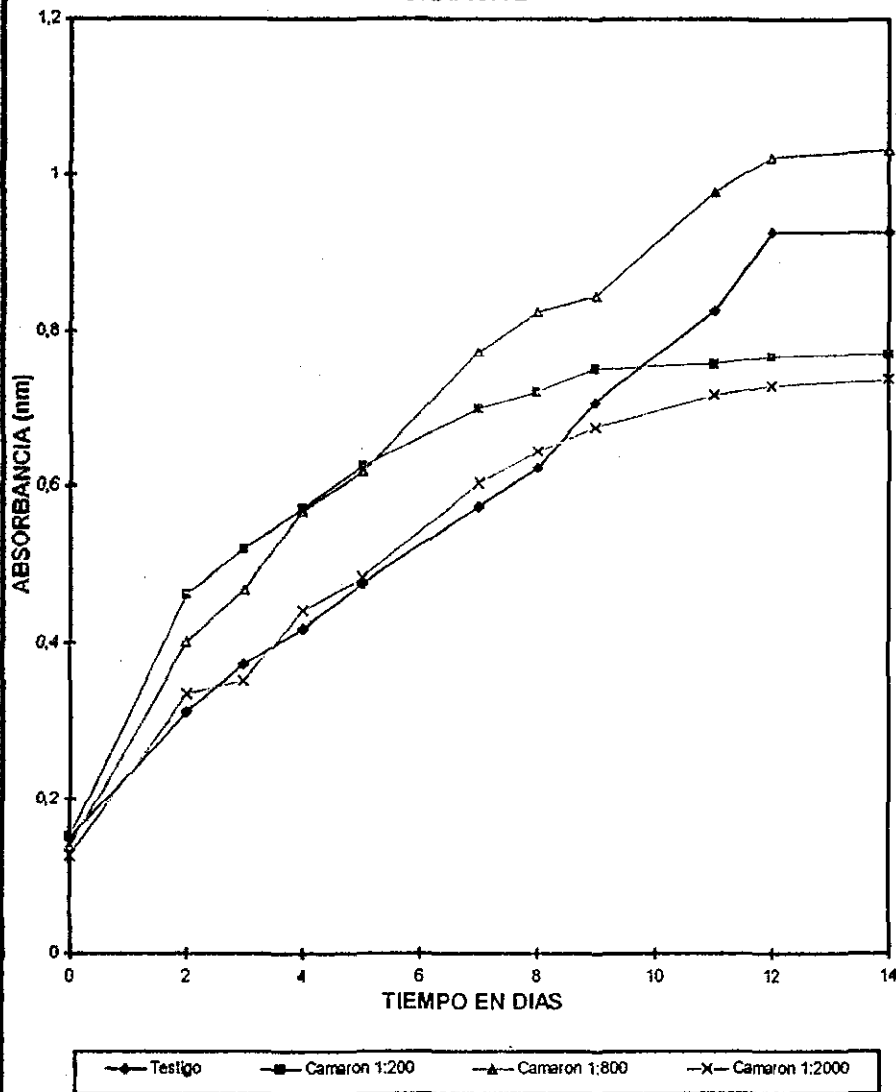


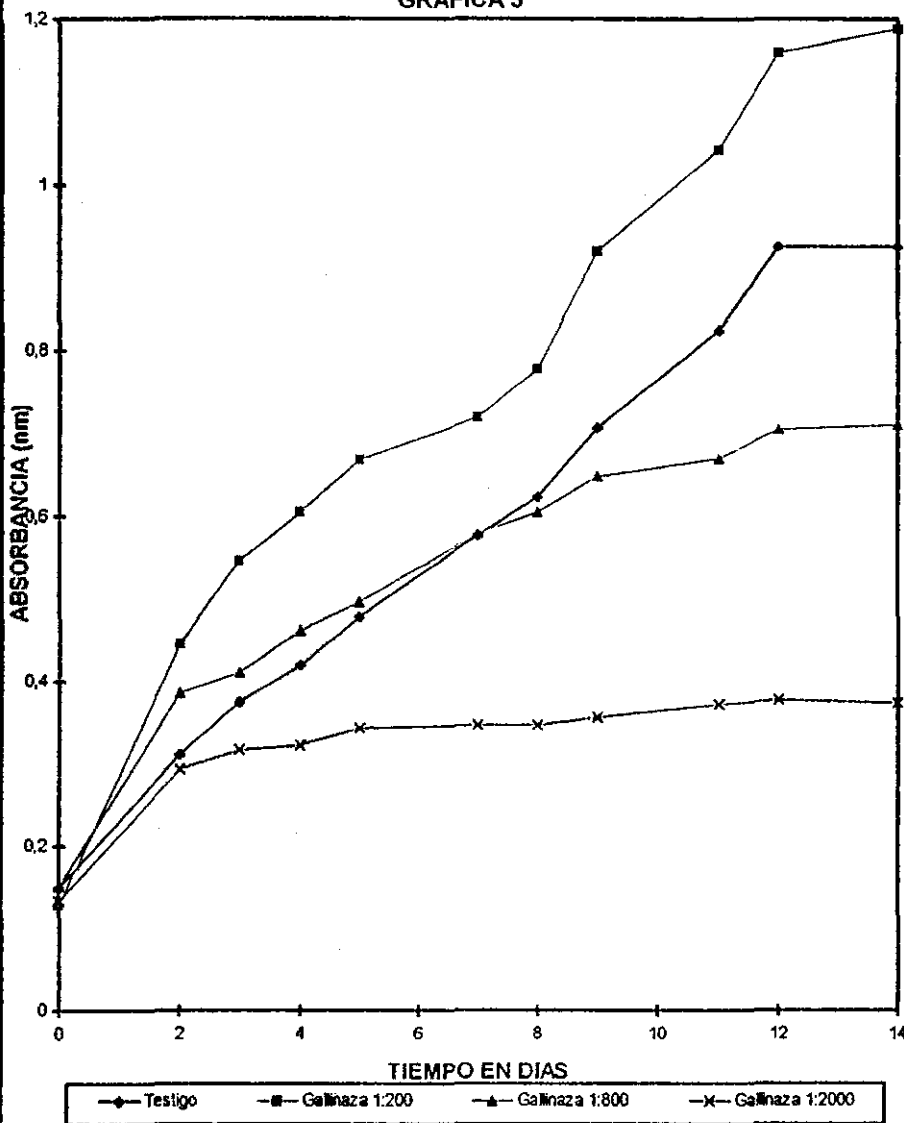
TABLA 4

CEPA: *Dunaliella salina*
 TESTIGO: MEDIO DE WALNE
 TRATAMIENTO: GALLINAZA

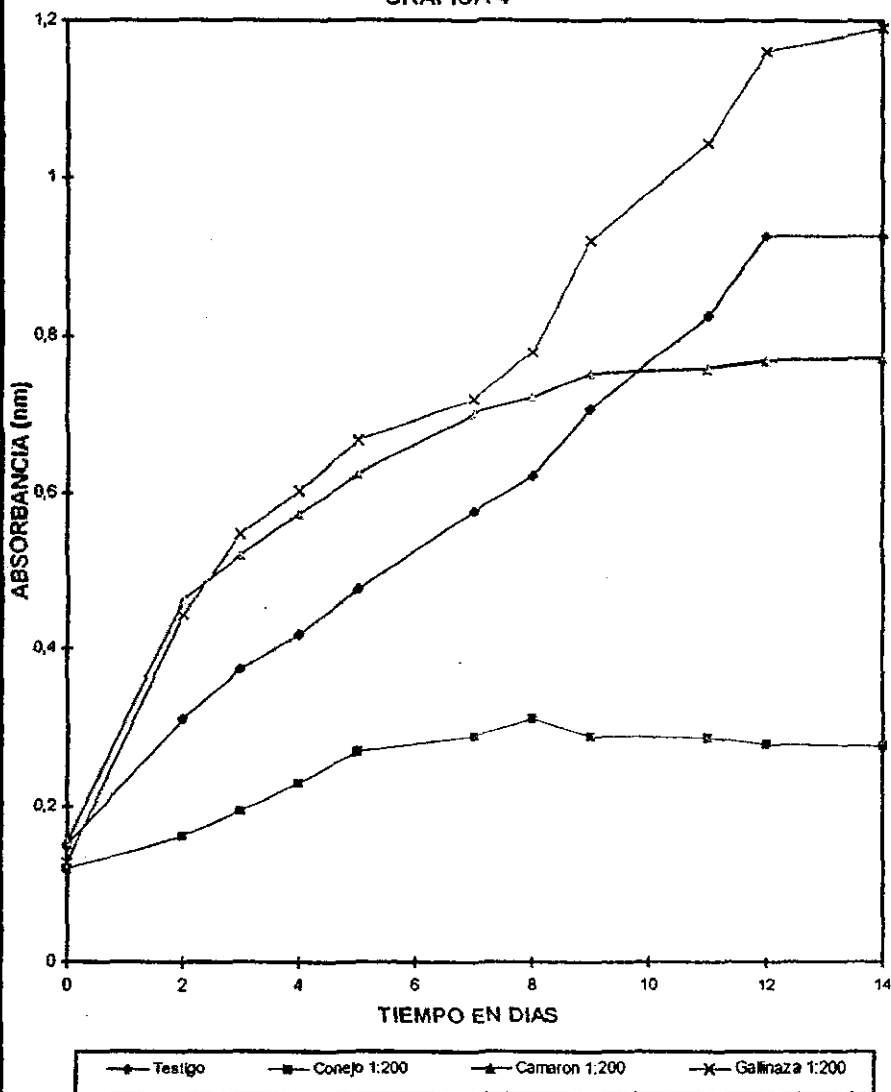
TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000	
0	28	0.150	0.127	0.152	0.134	
2	29	0.312	0.445	0.385	0.294	
3	30	0.374	0.548	0.411	0.317	
4	29	0.419	0.604	0.460	0.322	
5	30	0.477	0.667	0.495	0.344	
7	31	0.577	0.720	0.580	0.347	
8	31	0.623	0.779	0.605	0.348	
9	31	0.707	0.921	0.647	0.356	
11	31	0.826	1.044	0.669	0.372	
12	30	0.927	1.160	0.705	0.377	
14	32	0.927	1.190	0.710	0.375	
VARIACION EN EL pH:		INICIAL	8.00	7.02	7.26	7.98
		FINAL	8.89	8.30	8.86	9.16

En las gráficas 4, 5, y 6 se muestran los resultados concentrados de las diluciones 1:200, 1:800 y 1:2000.

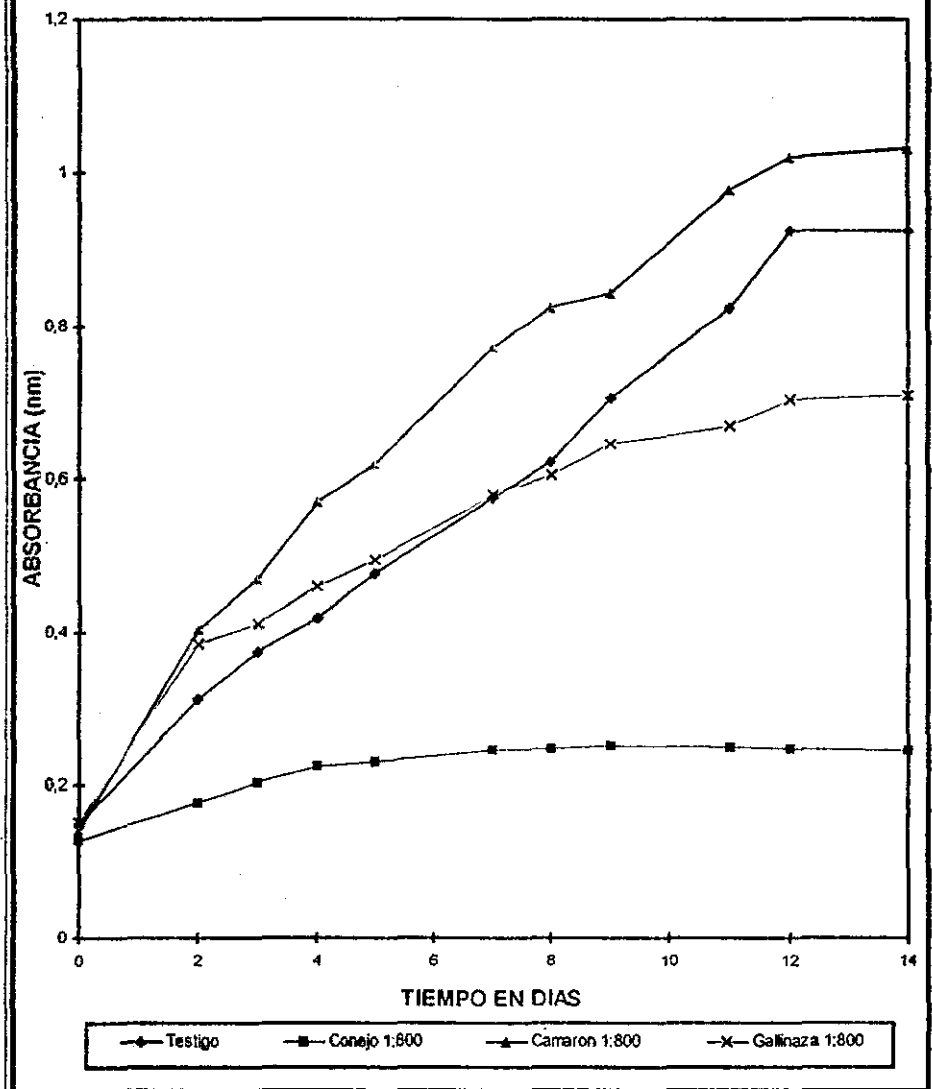
CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: GALLINAZA, (CULTIVOS POR LOTE)
 GRAFICA 3



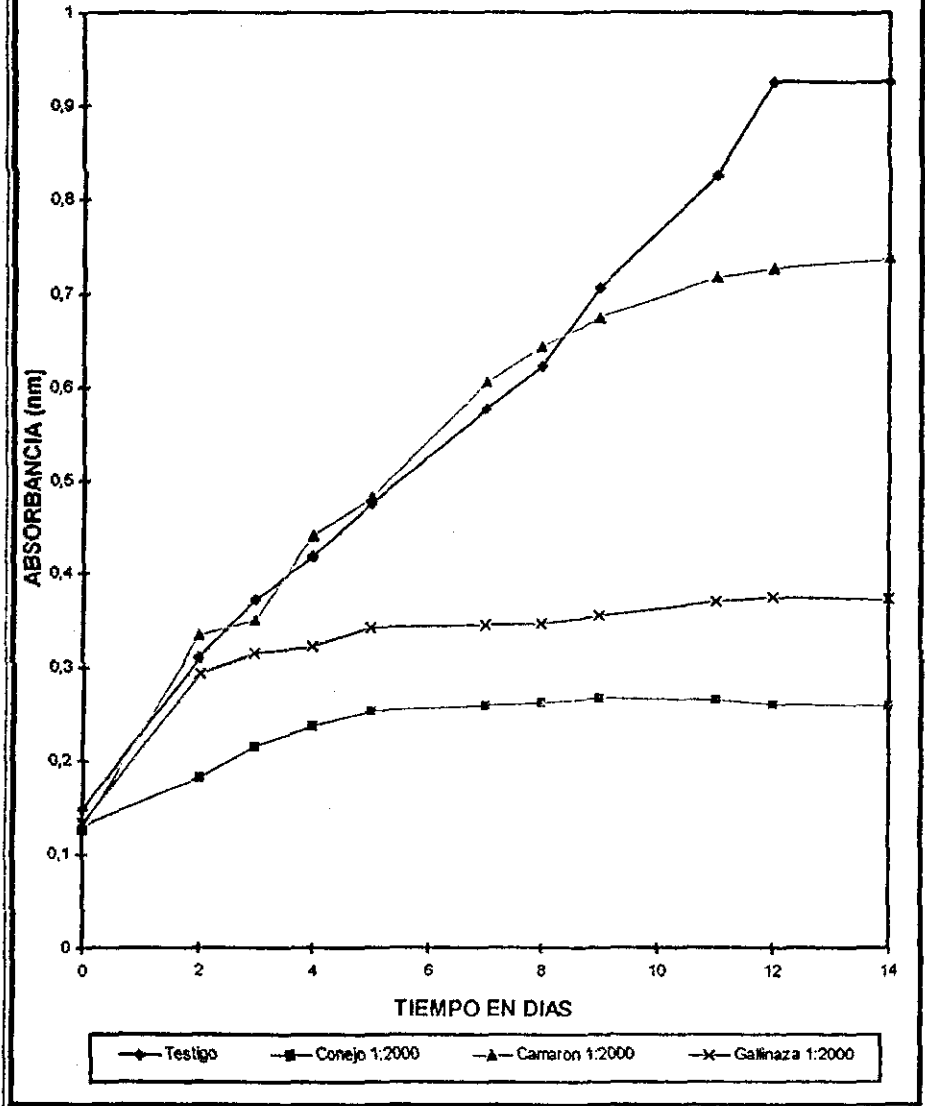
CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON Y GALLINAZA (CULTIVOS POR LOTE)
GRAFICA 4



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON Y GALLINAZA (CULTIVOS POR LOTE)
 GRAFICA 5



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAPARAZON Y GALLINAZA (CULTIVOS POR LOTE)
 GRAFICA 6



6.2.-CULTIVOS EN GARRAFON

Dunaliella salina

[DE 19 LITROS DE CAPACIDAD, CON 14 LTS. DE MEDIO Y 2 LTS. DE INOCULO: 0.5 DE ABS. Y 7.5×10^6 CEL. /ml]

En la tabla 5, 6 y 7 así como las gráficas 7, 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos de los cultivos en garrafones. Las lecturas corresponden a la absorbancia y al final de la misma se muestra la variación del pH, y de cuenta celular, que es otro de los parámetros considerado en el presente trabajo.

La tabla 8 muestra los resultados del análisis bromatológico realizado a las muestras que se obtuvieron de los cultivos en garrafones, del testigo y las diluciones 1:200 y 1:800.

TABLA 5

CEPA: *Dunaliella salina*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: WALNE

TRATAMIENTO: EXCRETAS DE CONEJO

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000
0	26	0.122	0.121	0.121	0.122
2	27	0.247	0.207	0.161	0.136
4	27	0.349	0.239	0.180	0.160
6	27	0.423	0.283	0.184	0.169
7	28	0.469	0.280	0.199	0.182
9	27	0.548	0.304	0.202	0.185
11	28	0.598	0.318	0.217	0.193
12	29	0.636	0.340	0.228	0.198
13	29	0.691	0.357	0.237	0.230
14	27	0.752	0.365	0.242	0.227
15	27	0.868	0.376	0.245	0.225
16	26	0.972	0.382	0.267	0.222
18	28	1.066	0.428	0.288	0.217
VARIACION DEL pH:	INICIAL	8.00	8.09	8.07	8.02
	FINAL	8.86	8.57	8.49	8.36
CUENTA CELULAR [10^6]	INICIAL	0.87	0.80	0.72	0.75
	FINAL	11.92	3.75	1.97	1.35

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO (CULTIVOS EN GARRAFON)
 GRAFICA 7

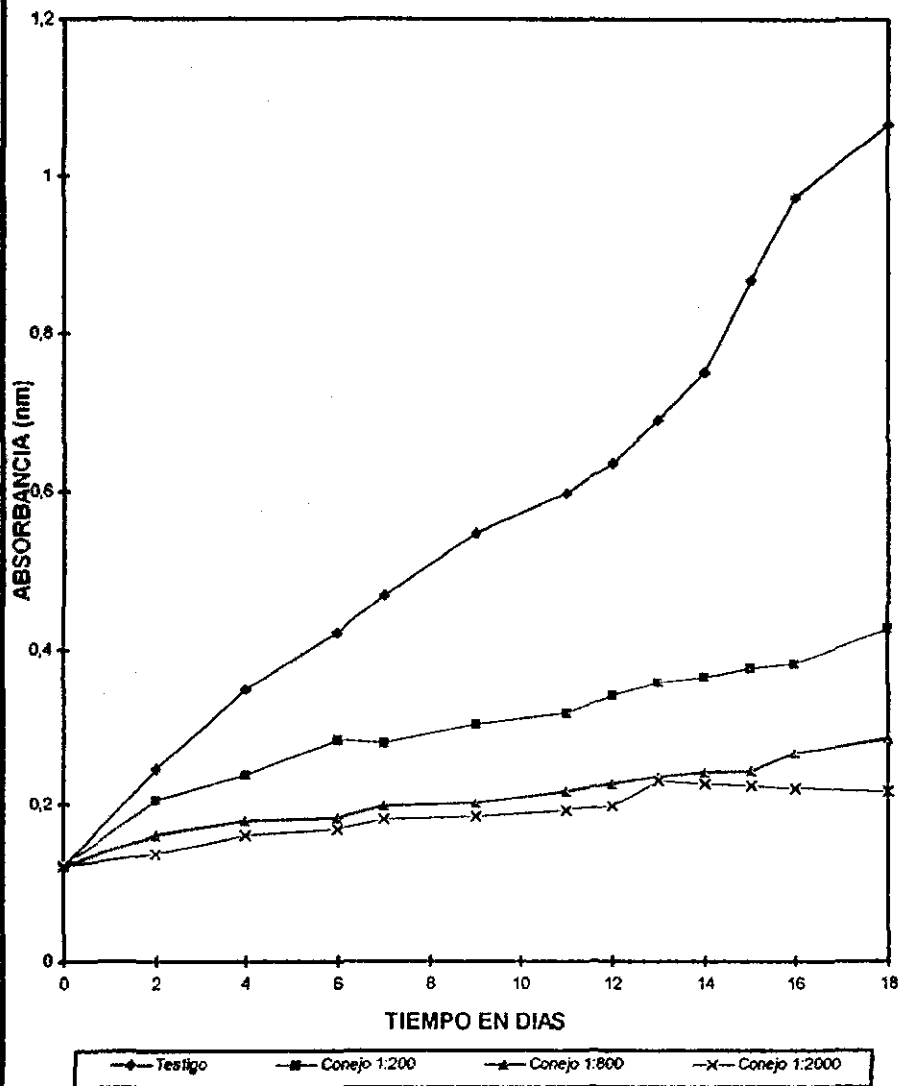


TABLA 6

CEPA: *Dunaliella salina*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: WALNE

TRATAMIENTO: CAPAZON DE CAMARON

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000
0	26	0.122	0.116	0.111	0.115
2	27	0.247	0.315	0.174	0.149
4	27	0.349	0.494	0.254	0.179
6	27	0.423	0.658	0.273	0.187
7	28	0.469	0.825	0.340	0.232
9	27	0.548	0.975	0.355	0.234
11	28	0.598	1.154	0.382	0.236
12	29	0.636	1.270	0.426	0.238
13	29	0.691	1.329	0.450	0.258
14	29	0.752	1.416	0.458	0.260
15	27	0.868	1.416	0.476	0.272
16	26	0.972	1.658	0.570	0.335
18	28	1.066	1.810	0.662	0.364
VARIACION DEL pH:	INICIAL	8.00	8.07	8.02	8.08
	FINAL	8.86	8.74	8.60	8.48
CUENTA CELULAR [10^6]	INICIAL	0.87	0.65	0.77	0.82
	FINAL	11.92	15.67	7.17	4.10

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: C. DE CAMARON (CULTIVOS EN GARRAFON)
GRAFICA 8

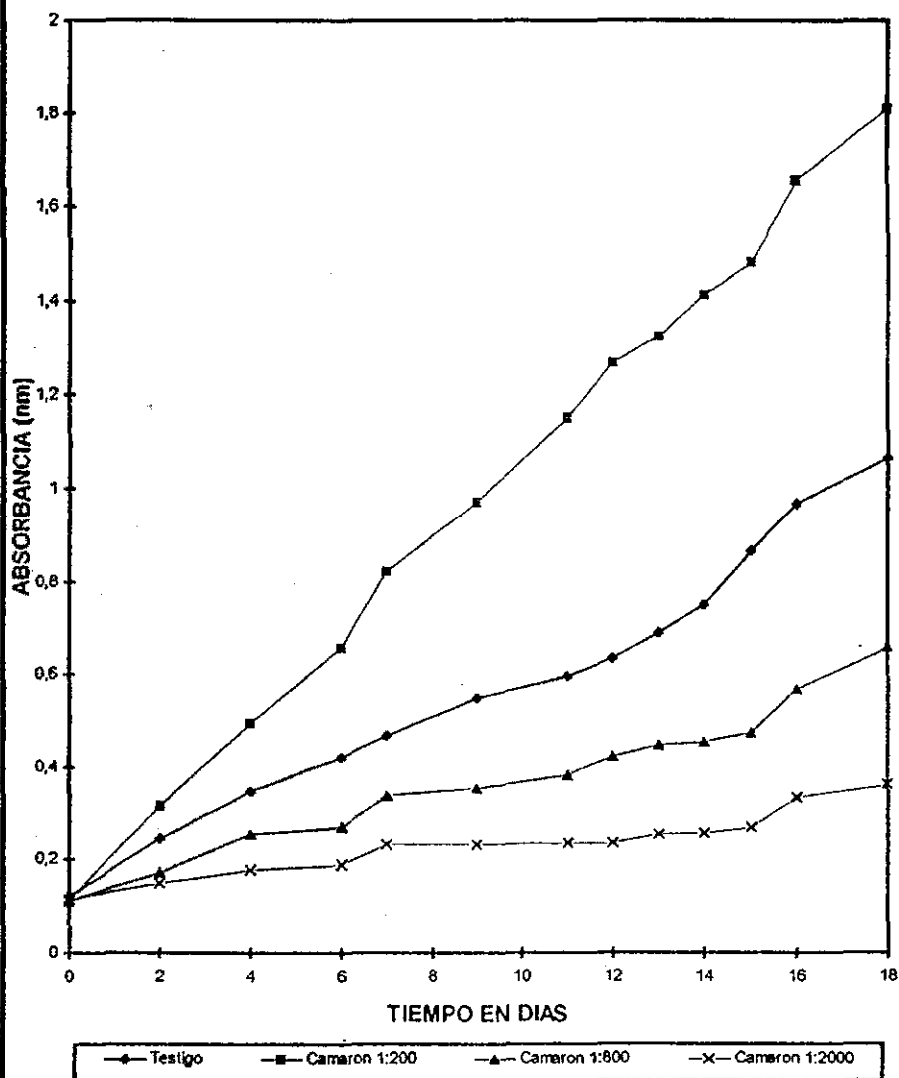


TABLA 7

CEPA: *Dunaliella salina*

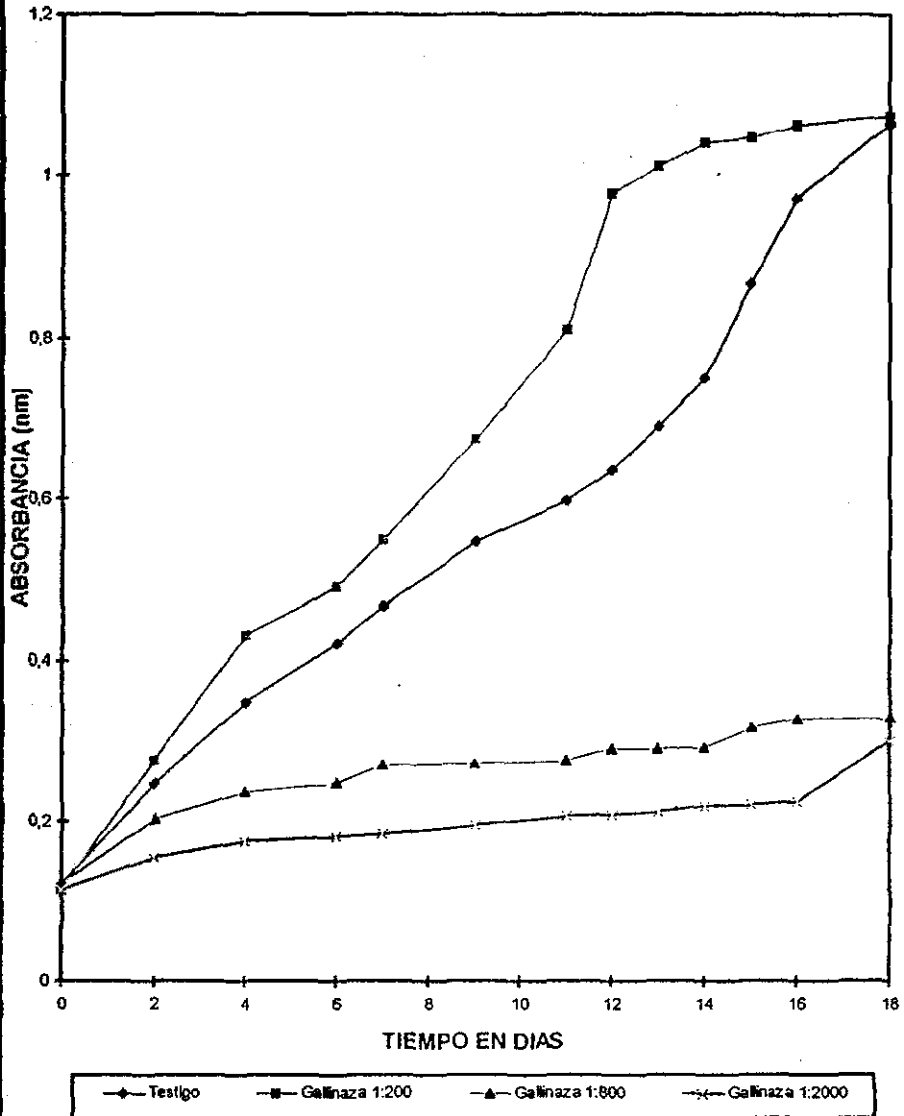
MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: WALNE

TRATAMIENTO: GALLINAZA

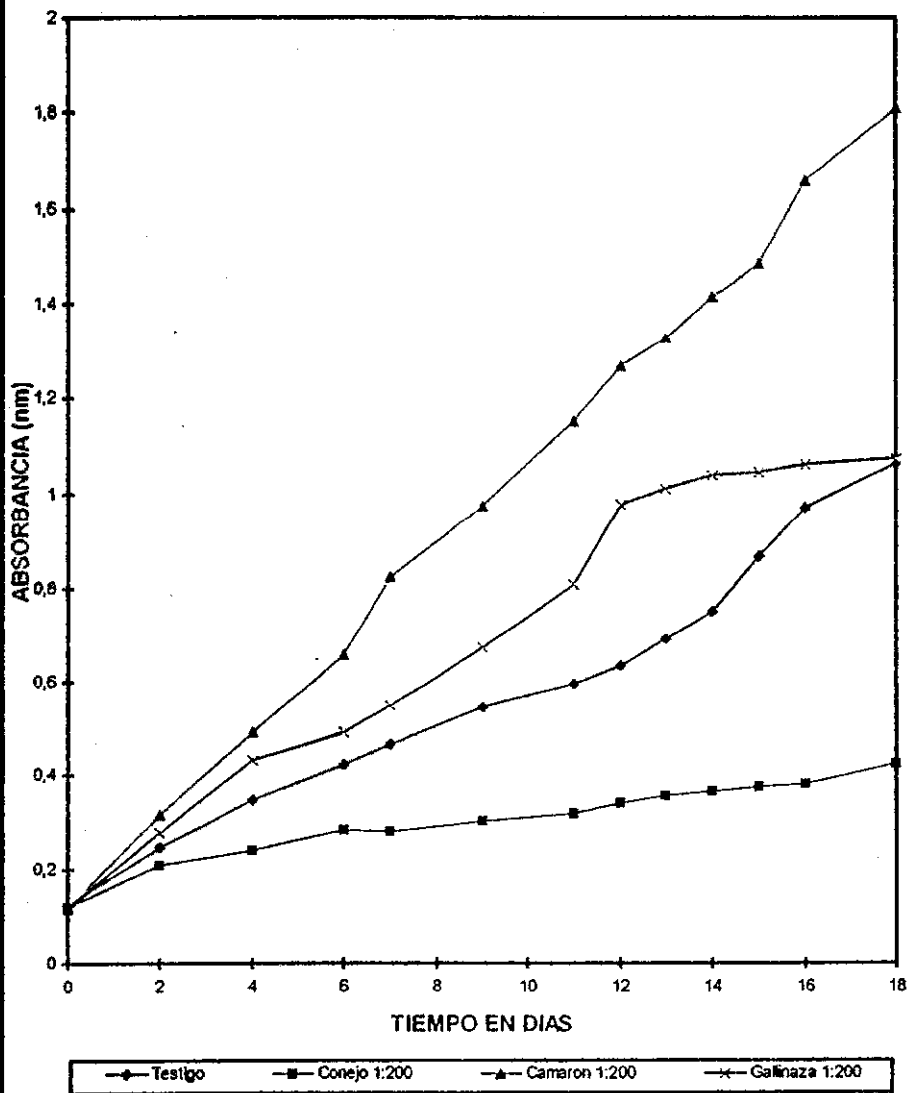
TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000
0	26	0.122	0.116	0.122	0.115
2	27	0.247	0.277	0.203	0.155
4	27	0.349	0.432	0.236	0.175
6	27	0.423	0.493	0.248	0.180
7	28	0.469	0.550	0.272	0.185
9	27	0.548	0.674	0.274	0.196
11	28	0.598	0.810	0.276	0.206
12	29	0.636	0.978	0.291	0.209
13	29	0.691	1.011	0.292	0.213
14	29	0.752	1.041	0.294	0.220
15	27	0.868	1.047	0.318	0.222
16	26	0.972	1.063	0.329	0.226
18	28	1.066	1.074	0.330	0.301
VARIACION DEL pH:	INICIAL	8.00	8.07	8.06	8.08
	FINAL	8.86	8.66	8.74	8.39
CUENTA CELULAR [10^4]	INICIAL	0.87	0.70	0.42	0.55
	FINAL	11.92	12.02	4.95	2.12

Las gráficas 10,11 y 12 se muestran los resultados de manera concentrada por dilución de cultivos en garrafón.

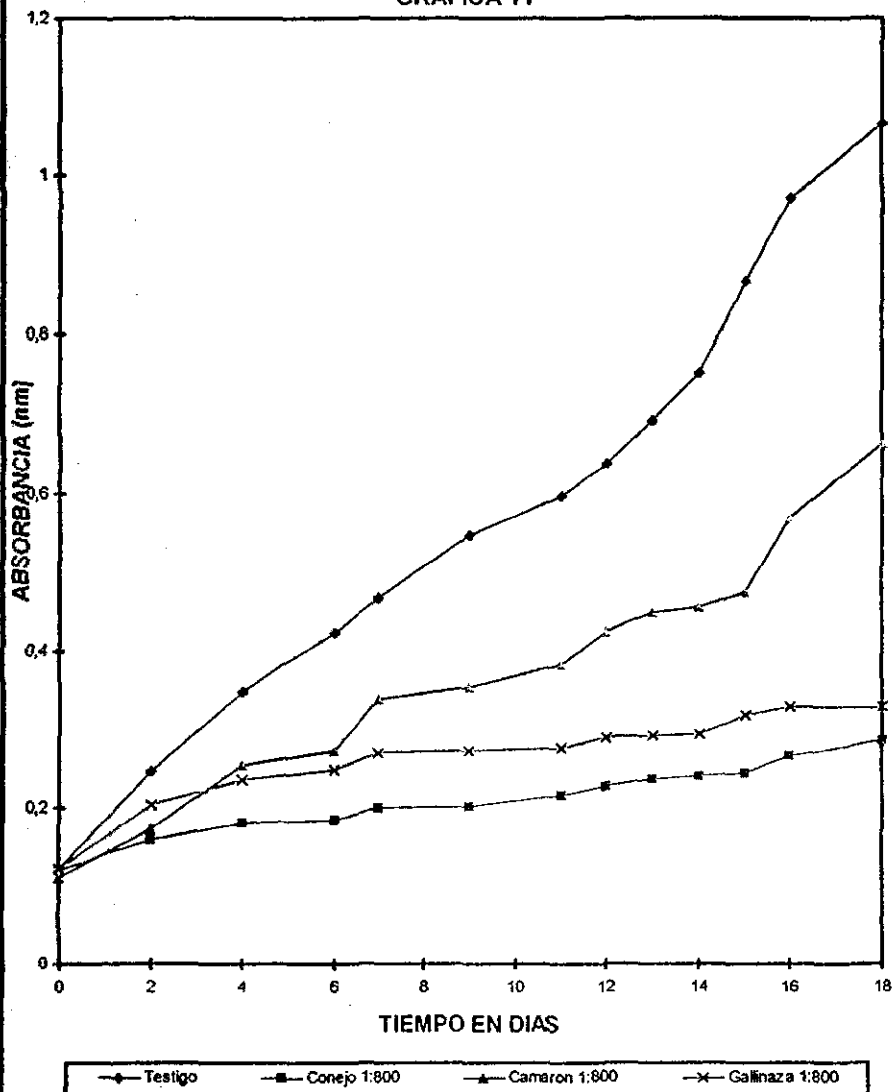
CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: GALLINAZA (CULTIVOS EN GARRAFON)
GRAFICA 9



**CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO
DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON Y
GALLINAZA (CULTIVOS EN GARRAFON)
GRAFICA 10**



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO
 DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON Y
 GALLINAZA (CULTIVOS EN GARRAFON)
 GRAFICA 11



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO
DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON Y
GALLINAZA (CULTIVOS EN GARRAFON)
GRAFICA 12

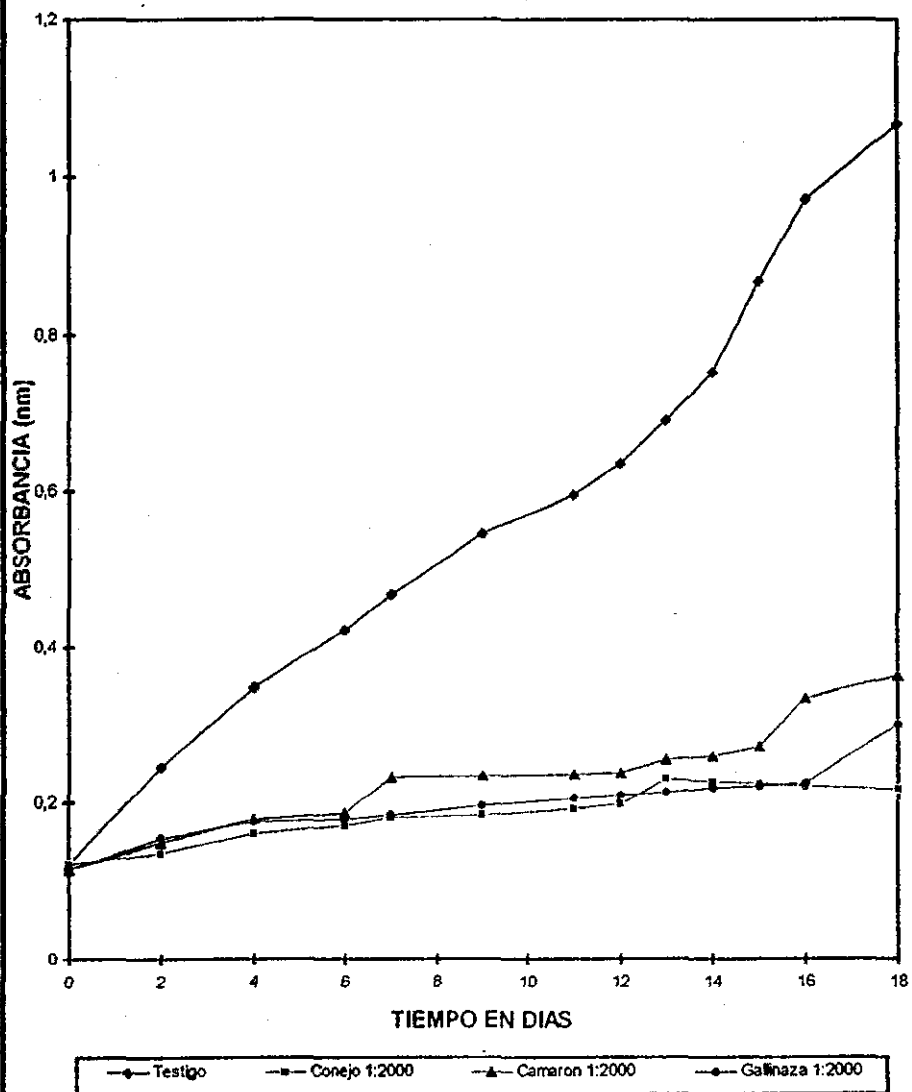
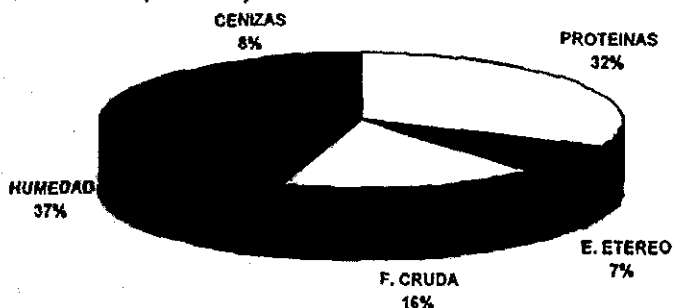


TABLA 8

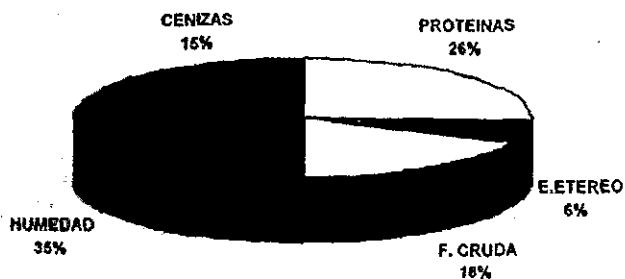
Resultados del análisis bromatológico de las muestras centrifugadas de los cultivos en garrafón, en porcentajes:

TRATAMIENTO	HUMEDAD	E. ETereo	F. CRUDA	PROTEINAS	CENIZAS
TESTIGO	36.42	7.12	16.48	31.48	8.47
1:200	35.15	5.68	18.46	25.76	14.93
E. DE CONEJO					
1:800	33.19	7.02	17.44	28.02	14.31
1:200	31.32	7.45	15.36	35.78	10.08
C. DE CAMARON					
1:800	31.09	7.01	16.78	34.06	11.05
1:200	38.46	6.14	11.23	28.49	15.66
GALLINAZA					
1:800	39.85	5.97	12.36	29.78	12.04

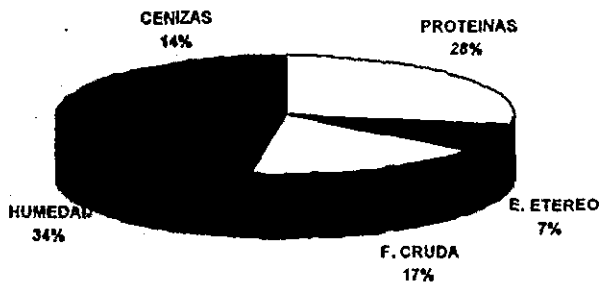
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina*
(TESTIGO) "CULTIVO EN GARRAFON"



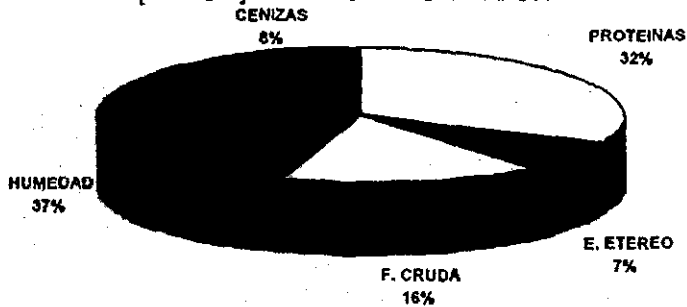
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
EXCRETAS DE CONEJO [1:200]



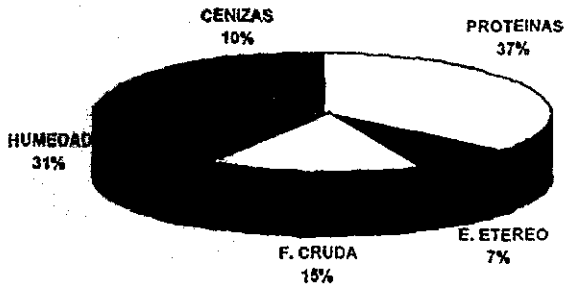
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
EXCRETAS DE CONEJO [1:800]



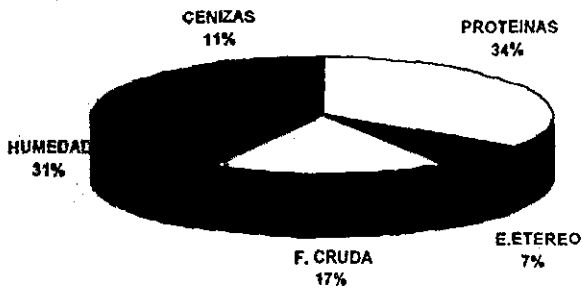
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina*
[TESTIGO] "CULTIVOS EN GARRAFON"



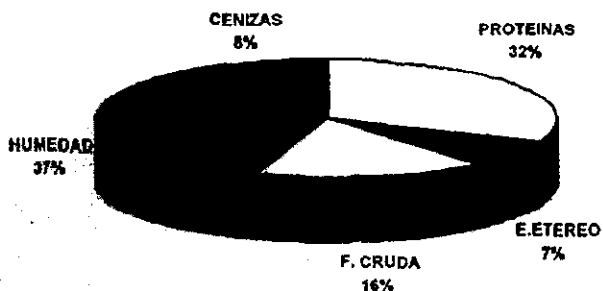
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
CAPARAZON DE CAMARON [1:200]



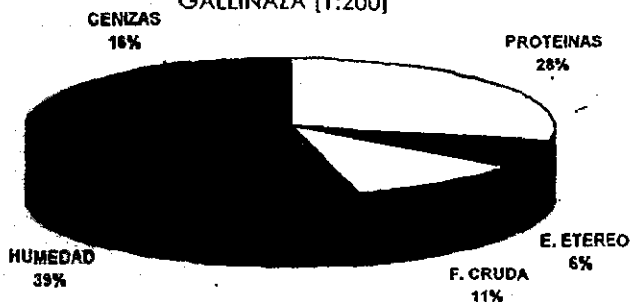
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
CAPARAZON DE CAMARON [1:800]



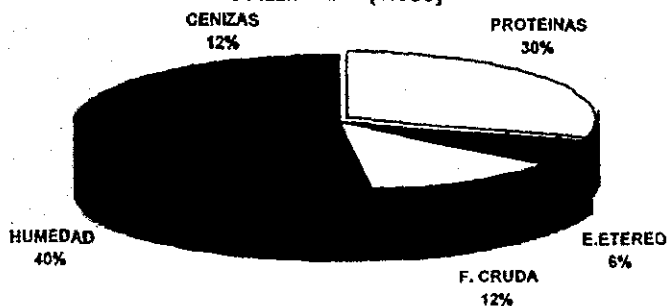
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina*
[TESTIGO] " CULTIVOS EN GARRAFON"



ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
GALLINAZA [1:200]



ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
GALLINAZA [1:800]



6.3.-CULTIVOS EN BOLSA

Dunaliella salina

[CON 10.5 LTS. DE MEDIO Y 1.5 LTS. DE INOCULO 0.5 DE ABS. Y 7.5×10^6 CEL. / ml]

En las tablas 9, 10, 11 y en las gráficas 13,14, y 15 se muestran los resultados obtenidos en los cultivos en bolsa, con los tres sustratos, y diluciones: 1:200 y 1:800.

Las gráficas 16 y 17 se muestran los resultados concentrados de absorbancia de los cultivos en bolsa y además de cada una de las diluciones trabajadas.

TABLA 9

CEPA: *Dunaliella salina*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: WALNE

TRATAMIENTO: EXCRETAS DE CONEJO

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800
0	28	0.112	0.050	0.037
1	27	0.154	0.184	0.115
3	26	0.201	0.305	0.168
4	27	0.224	0.333	0.192
5	28	0.242	0.350	0.217
7	28	0.294	0.399	0.223
8	28	0.319	0.442	0.252
10	27	0.481	0.458	0.301
11	27	0.581	0.505	0.348
12	28	0.619	0.525	0.348
14	29	0.662	0.595	0.412
15	29	0.728	0.592	0.398
17	28	0.915	0.590	0.397
18	29	0.921	0.588	0.395
19	26	0.934	0.585	0.390
VARIACION EN EL pH	INICIAL	8.00	7.95	7.93
	FINAL	9.64	8.42	8.54
CUENTA CELULA [10 ⁶]	INICIAL	0.81	0.52	0.43
	FINAL	9.80	6.05	3.50

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO
DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO (CULTIVOS EN BOLSA)
GRAFICA 13

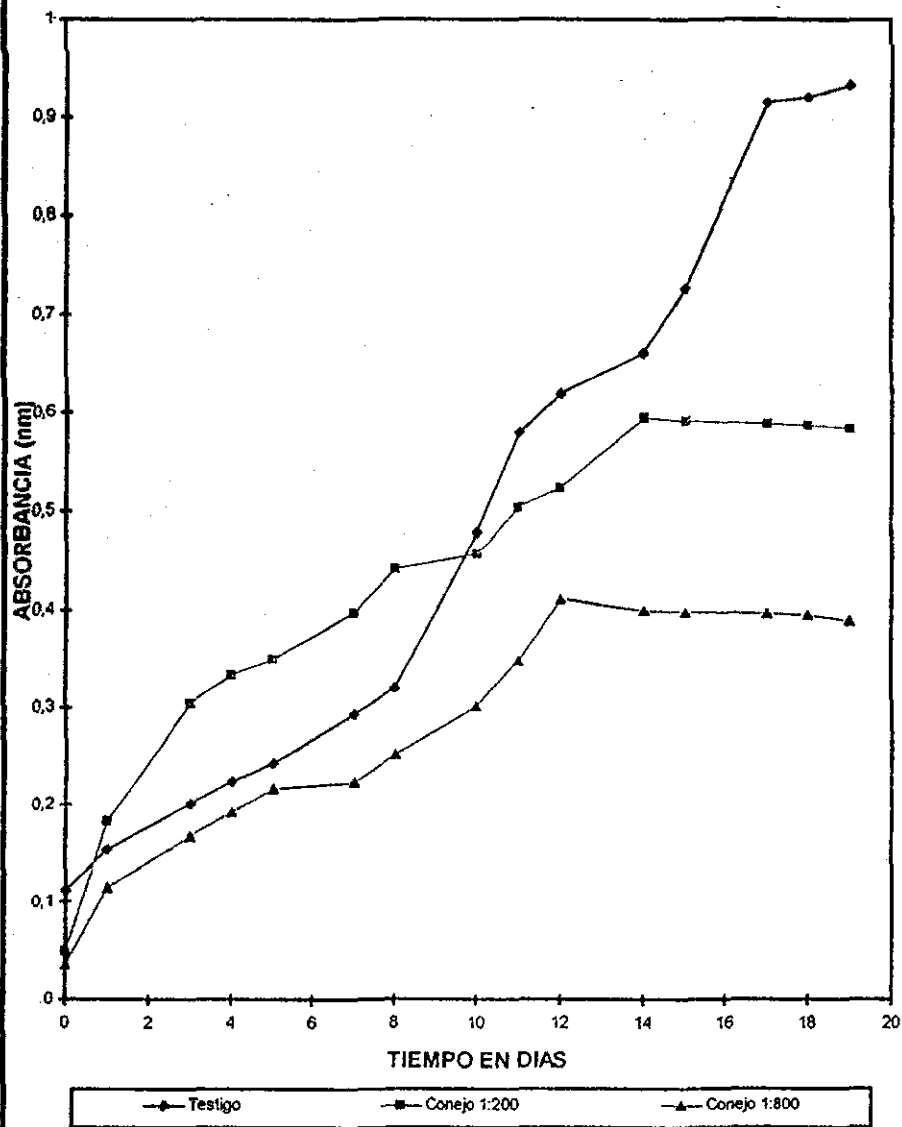


TABLA 10

CEPA: *Dunaliella salina*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: WALNE

TRATAMIENTO: CAPARAZON DE CAMARON

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800
0	28	0.112	0.072	0.065
1	27	0.154	0.456	0.342
3	26	0.201	0.612	0.467
4	27	0.224	0.673	0.570
5	28	0.242	0.684	0.694
7	28	0.294	0.718	0.773
8	28	0.319	0.759	0.857
10	28	0.481	0.803	0.906
11	27	0.581	0.857	0.956
12	28	0.619	0.887	1.008
14	29	0.662	0.948	1.008
15	29	0.728	1.091	1.039
17	28	0.915	1.123	1.058
18	29	0.921	1.087	1.061
19	26	0.934	1.056	1.051
VARIACION DEL pH:	INICIAL	8.00	8.02	8.08
	FINAL	9.64	8.90	9.20
CUENTA CELULAR [10 ⁶]	INICIAL	0.81	0.87	0.86
	FINAL	9.80	7.47	10.85

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: C. DE CAMARON (CULTIVOS EN BOLSA)
GRAFICA 14

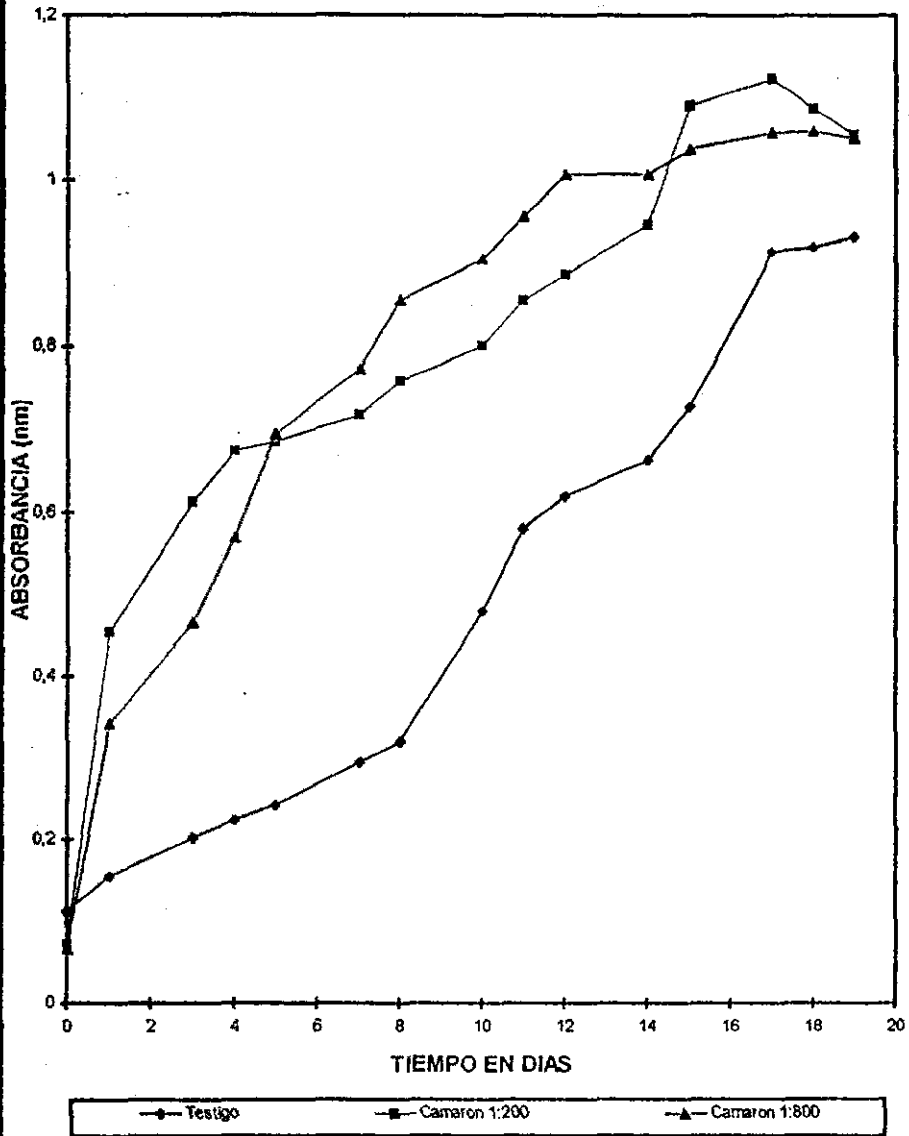


TABLA 11

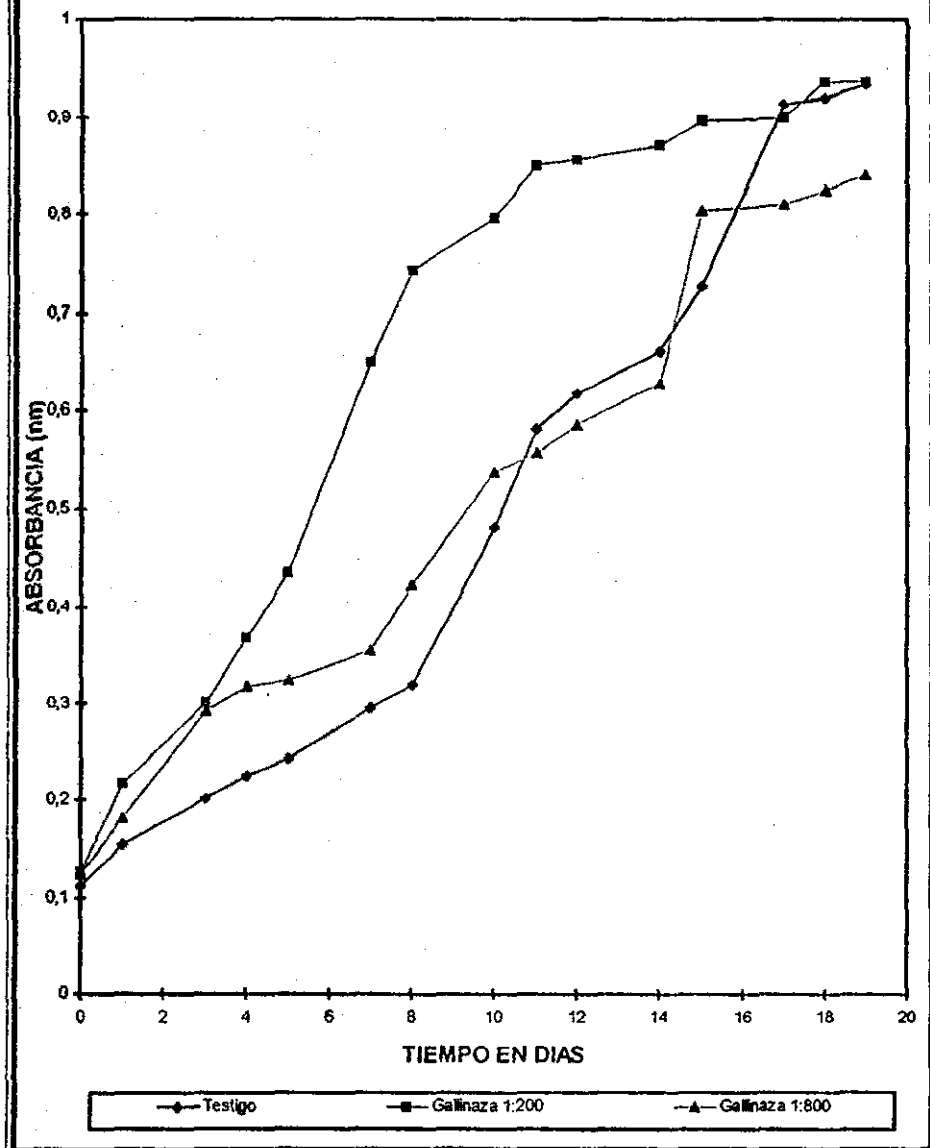
CEPA: *Dunaliella salina*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: WALNE

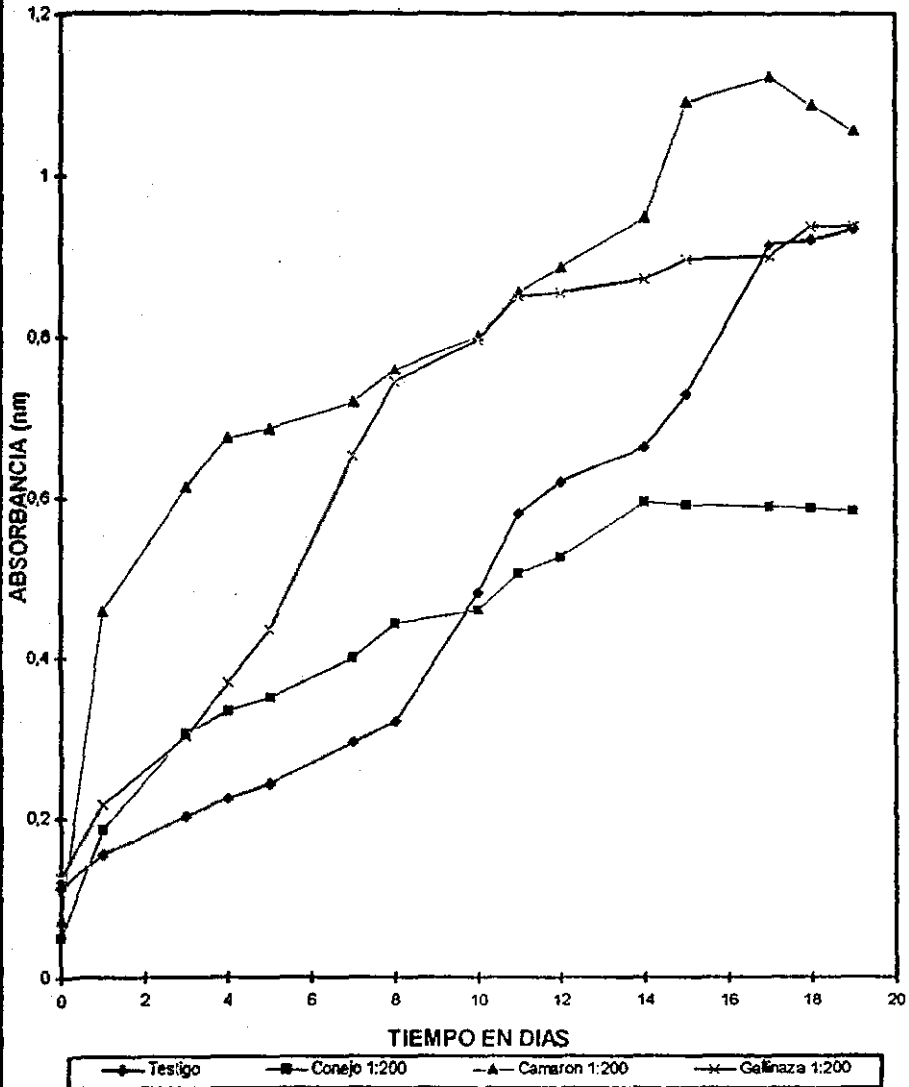
TRATAMIENTO: GALLINAZA

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800
0	28	0.112	0.126	0.124
1	27	0.154	0.217	0.181
3	26	0.201	0.301	0.292
4	27	0.224	0.368	0.317
5	28	0.242	0.435	0.323
7	28	0.294	0.651	0.354
8	28	0.319	0.743	0.423
10	27	0.481	0.797	0.537
11	27	0.581	0.850	0.558
12	28	0.619	0.856	0.587
14	29	0.662	0.872	0.629
15	29	0.728	0.897	0.805
17	28	0.915	0.901	0.811
18	29	0.921	0.938	0.826
19	26	0.934	0.938	0.841
VARIACION DEL pH:	INICIAL	8.00	8.05	8.03
	FINAL	9.64	9.72	9.68
CUENTA CELULAR [10 ⁶]	INICIAL	0.81	0.79	0.83
	FINAL	9.80	9.72	7.72

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: GALLINAZA (CULTIVOS EN BOLSA)
GRAFICA 15



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON Y GALLINAZA (CULTIVOS EN BOLSA)
 GRAFICA 16



**CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN MEDIO
DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON ó
GALLINAZA (CULTIVOS EN BOLSA)
GRAFICA 17**

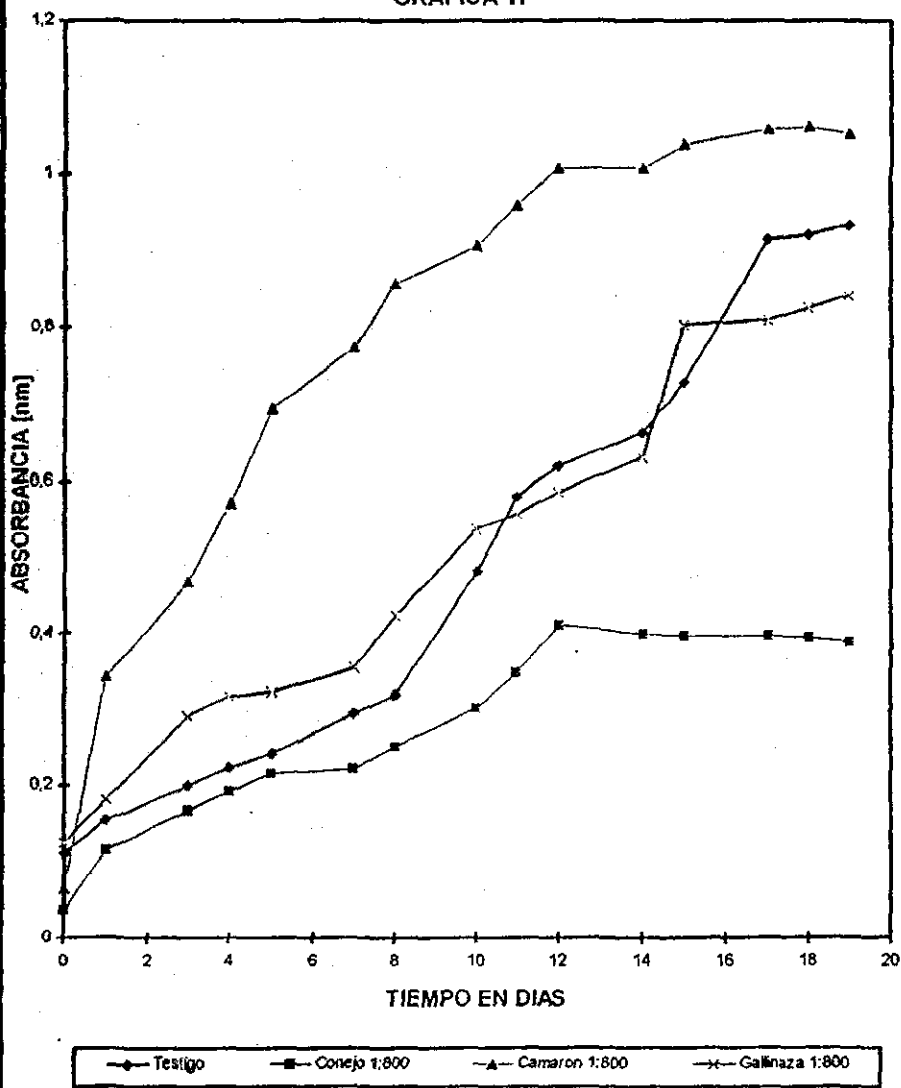
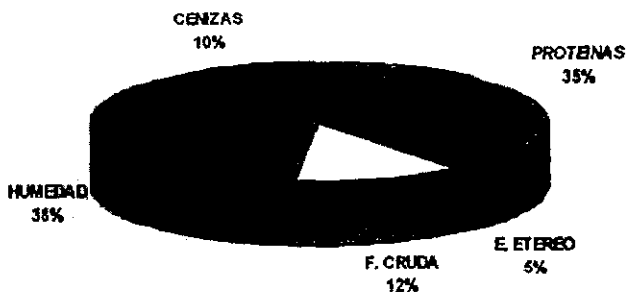


TABLA 12

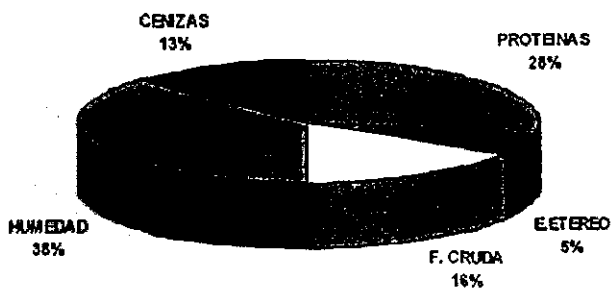
En la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis bromatológico realizados a los centrifugados de los cultivos en bolsas: datos expresados en porcentajes, tanto del testigo como de las diluciones 1:200 y 1:800.

TRATAMIENTO	HUMEDAD	E. ETereo	F. CRUDA	PROTEINAS	CENIZAS
TESTIGO	38.56	5.26	11.89	34.56	9.68
1:200	37.05	5.18	16.23	28.49	13.03
E. DE CONEJO					
1:800	36.45	5.62	15.76	28.04	14.11
1:200	35.89	6.12	7.12	39.78	13.18
C. DE CAMARON					
1:800	35.14	7.11	7.45	40.13	10.16
1:200	36.57	9.45	10.26	35.46	8.24
GALLINAZA					
1:800	37.76	8.13	9.37	34.23	10.50

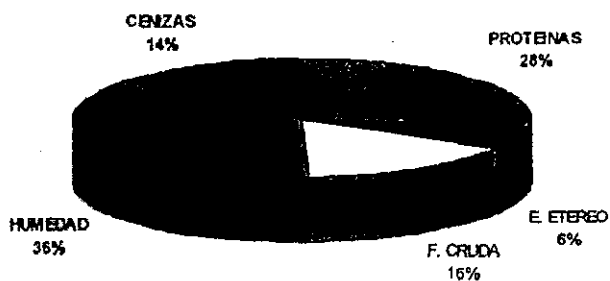
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina*
[TESTIGO]; CULTIVOS EN BOLSA



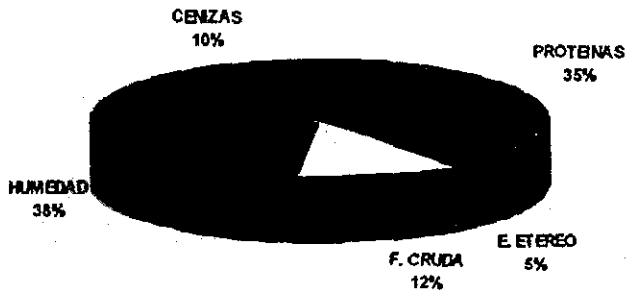
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
EXCRETAS DE CONEJO [1:200]



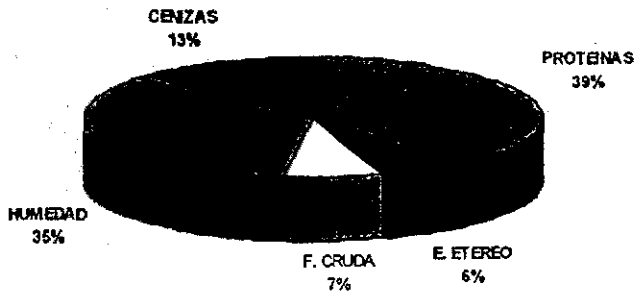
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
EXCRETAS DE CONEJO [1:800]



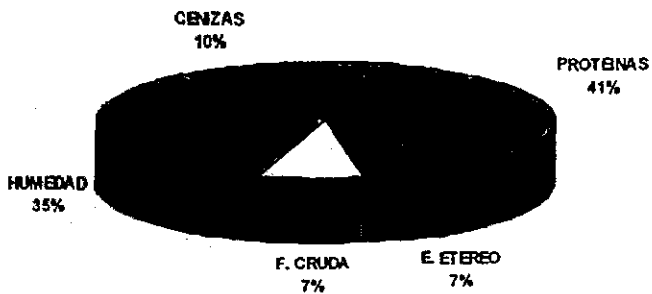
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina*
[TESTIGO]; CULTIVOS EN BOLSA



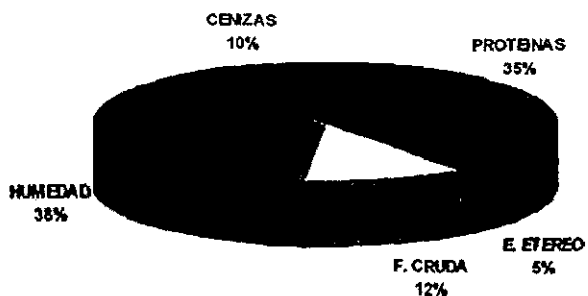
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
CAPARAZON DE CAMARON [1:200]



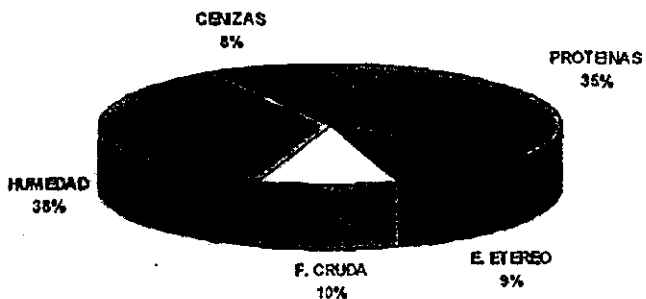
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
CAPARAZON DE CAMARON [1:800]



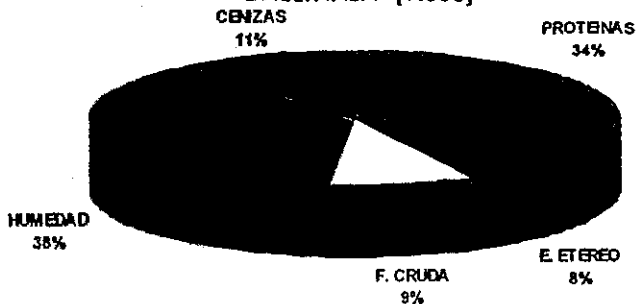
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina*
[TESTIGO]; CULTIVOS EN BOLSA



ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
GALLINAZA [1:200]



ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella salina* CON
GALLINAZA [1:800]



6.4.-CULTIVOS EN MATRAZ DE:

Dunaliella tertiolecta

[MATRACES DE 500 ml DE CAPACIDAD, CON 350 ml DE MEDIO Y 50 ml DE INÓCULO: 0.5 DE ABS. 7.5×10^6 CEL. /ml]

Los siguientes resultados corresponden a los cultivos en matraz de *Dunaliella tertiolecta*, con las diluciones 1:200, 1:800 1:2000 y un testigo con un medio de cultivo diferente [medio específico para *Dunaliella*] así como los sustratos orgánicos utilizados anteriormente, como son: excretas de conejo, caparazón de camarón y gallinaza [TABLAS: 13, 14, 15 y gráficas 18,19, y 20,]. Los resultados de estos cultivos también se encuentran representados de manera concentrada por dilución en las gráficas 21, 22 y 23.

Se consideraron los mismos parámetros físico - químicos de los cultivos anteriores.

TABLA 13

CEPA: *Dunaliella tertiolecta*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: DUNALIELLA

TRATAMIENTO: EXCRETAS DE CONEJO

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000	
0	28	0.121	0.113	0.114	0.111	
2	29	0.230	0.131	0.139	0.136	
3	30	0.274	0.154	0.153	0.163	
4	29	0.350	0.170	0.180	0.173	
5	30	0.396	0.219	0.182	0.178	
7	31	0.487	0.239	0.183	0.183	
8	31	0.525	0.238	0.198	0.180	
9	31	0.578	0.237	0.197	0.179	
11	31	0.690	0.236	0.195	0.175	
12	30	0.744	0.235	0.193	0.174	
14	32	0.900	0.234	0.191	0.172	
VARIACION EN EL pH:		INICIAL	8.00	8.07	8.06	8.08
		FINAL	8.35	8.60	8.56	8.40

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN
MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO (CULTIVOS POR
LOTE)

GRAFICA 18

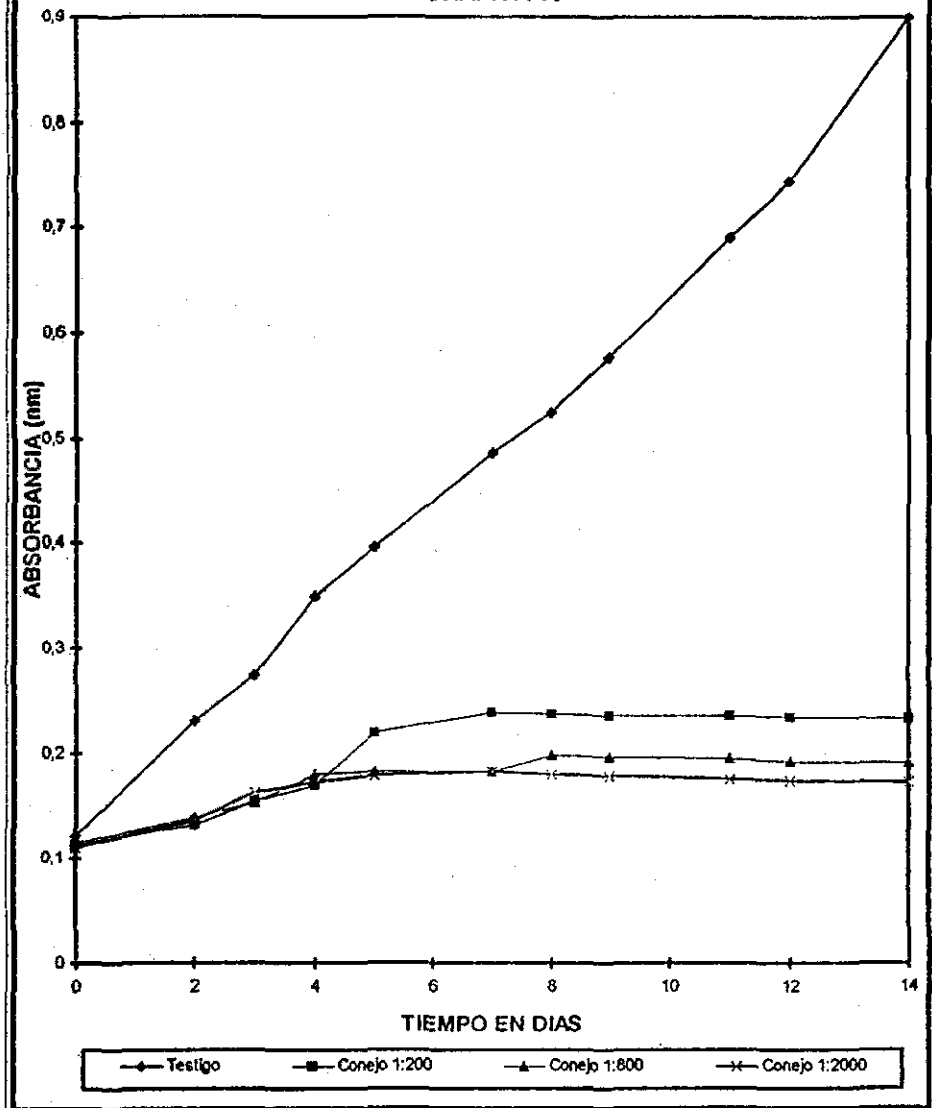


TABLA 14

CEPA: *Dunaliella tertiolecta*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: DUNALIELLA

TRATAMIENTO: CAPARAZON DE CAMARON

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000
0	28	0.121	0.148	0.107	0.098
2	29	0.230	0.662	0.431	0.314
3	30	0.274	0.867	0.511	0.357
4	29	0.350	0.937	0.600	0.431
5	30	0.396	1.002	0.635	0.500
7	31	0.487	1.011	0.792	0.638
8	31	0.525	1.015	0.802	0.646
9	31	0.578	1.016	0.820	0.685
11	31	0.690	1.022	0.900	0.693
12	30	0.744	1.025	0.974	0.699
14	32	0.900	1.040	0.980	0.715
VARIACION DEL pH:	INICIAL	8.00	7.55	7.53	7.54
	FINAL	8.35	8.65	8.26	8.14

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN MEDIO DE CULTIVO CON: C. DE CAMARON (CULTIVOS POR LOTE)

GRAFICA 19

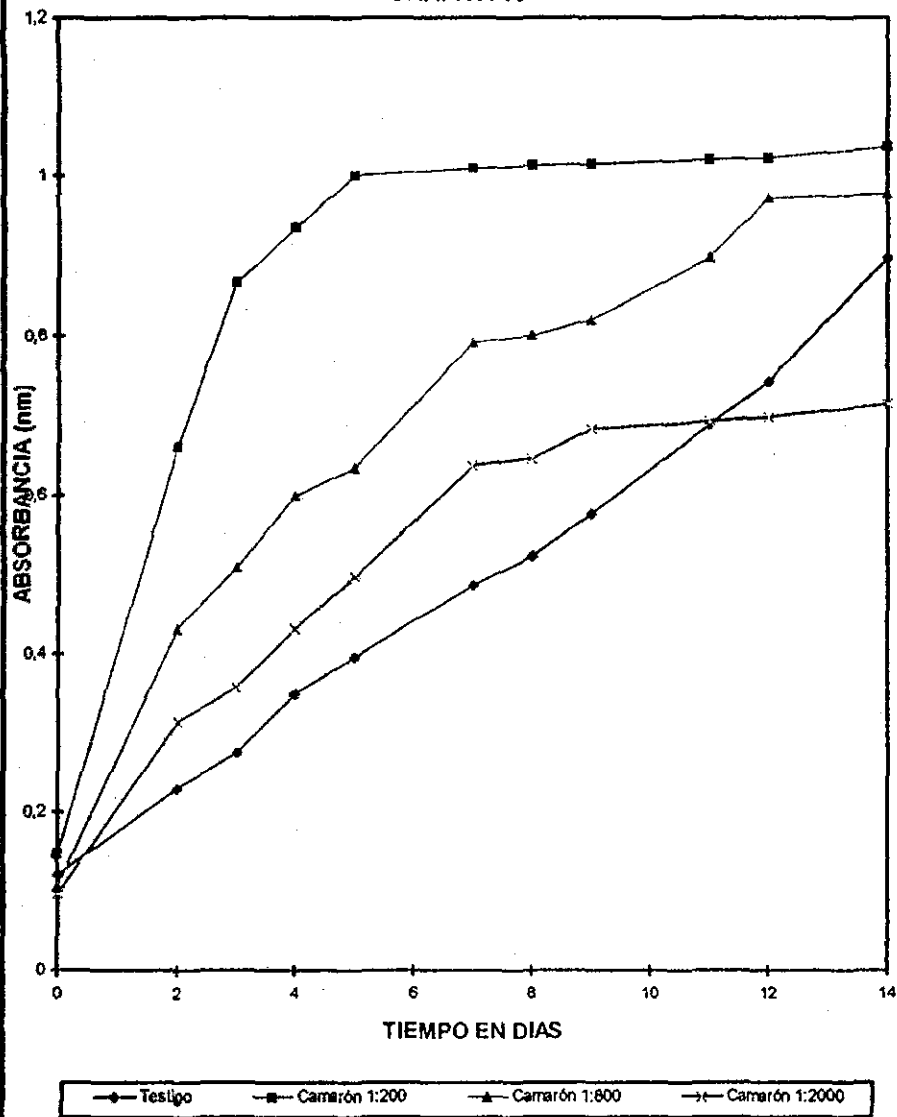


TABLA 15

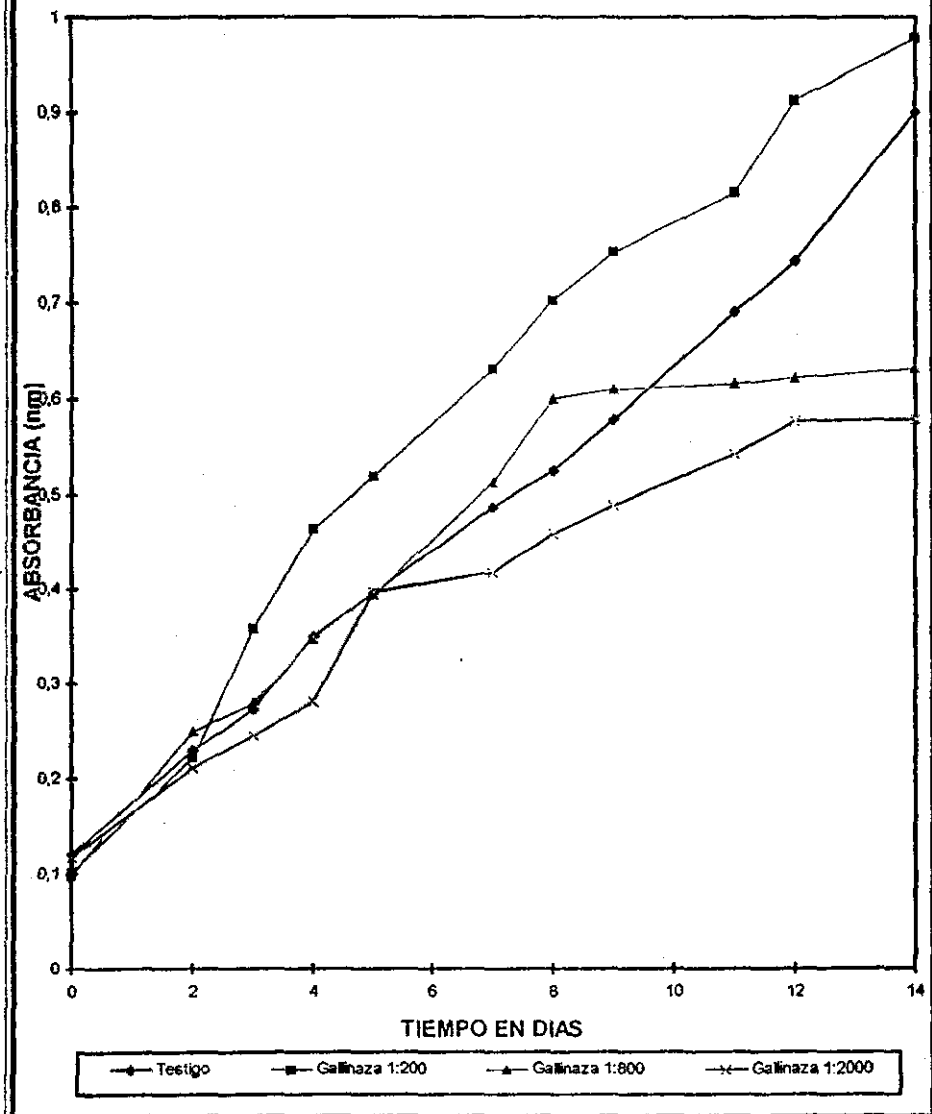
CEPA: *Dunaliella tertiolecta*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: DUNALIELLA

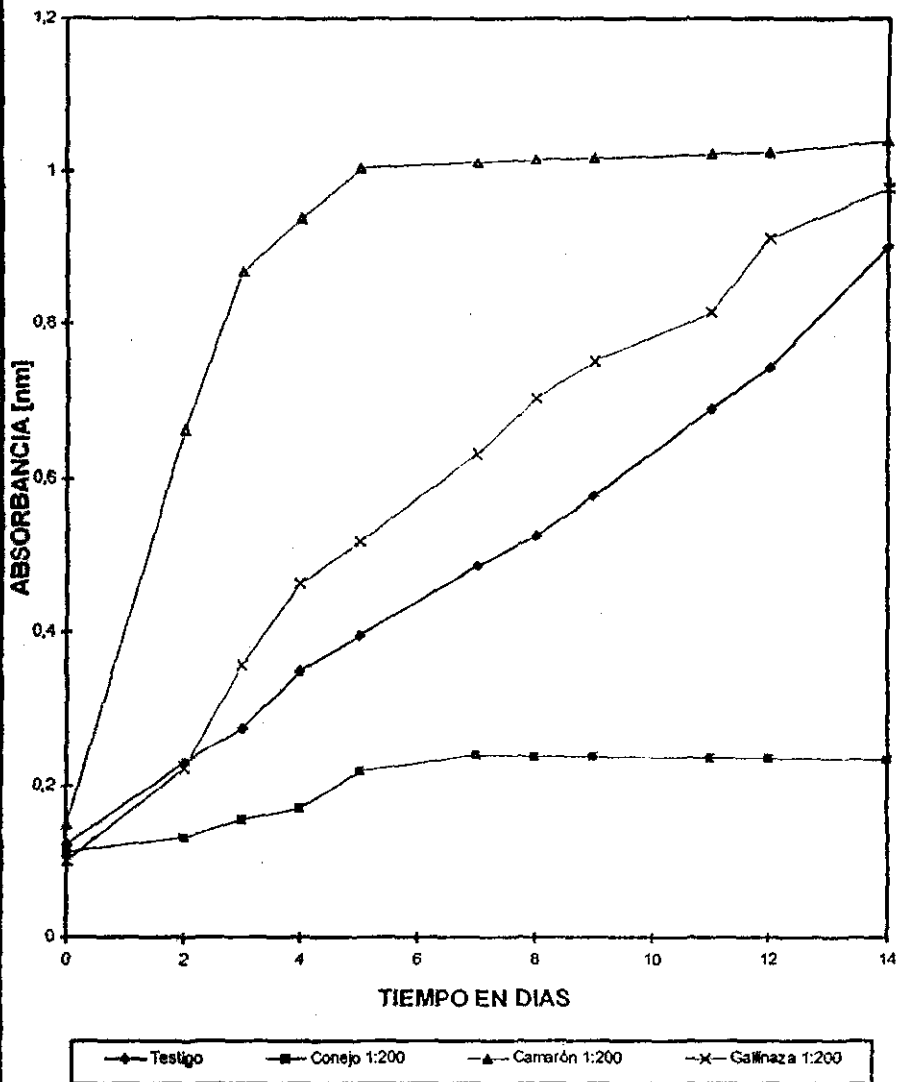
TRATAMIENTO: GALLINAZA

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800	1 : 2000
0	28	0.121	0.101	0.098	0.117
2	29	0.230	0.222	0.250	0.212
3	30	0.274	0.358	0.280	0.245
4	29	0.350	0.464	0.347	0.281
5	30	0.396	0.518	0.394	0.397
7	31	0.487	0.631	0.512	0.418
8	31	0.525	0.703	0.600	0.459
9	31	0.578	0.752	0.608	0.489
11	31	0.690	0.816	0.615	0.541
12	30	0.744	0.912	0.622	0.576
14	32	0.900	0.978	0.630	0.578
VARIACION EN EL pH:	INICIAL	8.00	8.03	8.06	8.02
	FINAL	8.35	8.26	8.21	8.16

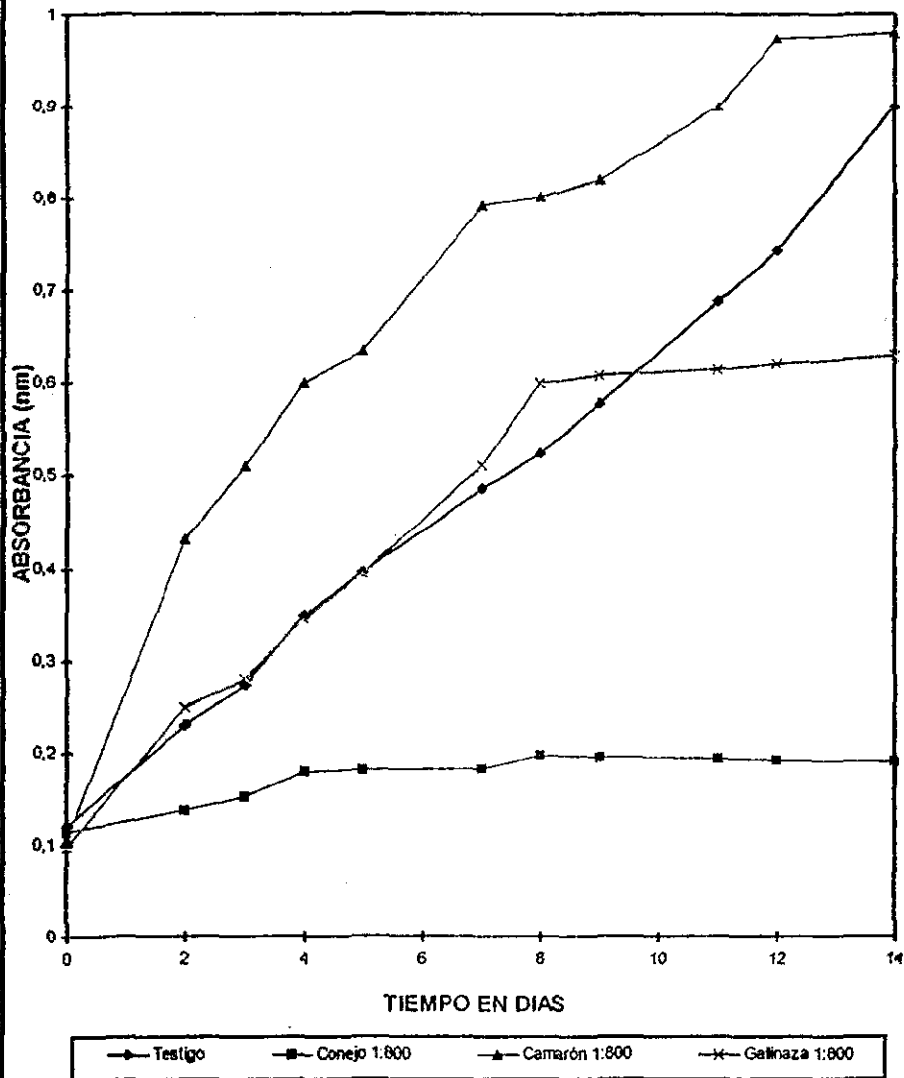
CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN
MEDIO DE CULTIVO CON: GALLINAZA (CULTIVOS POR LOTE)
GRAFICA 20



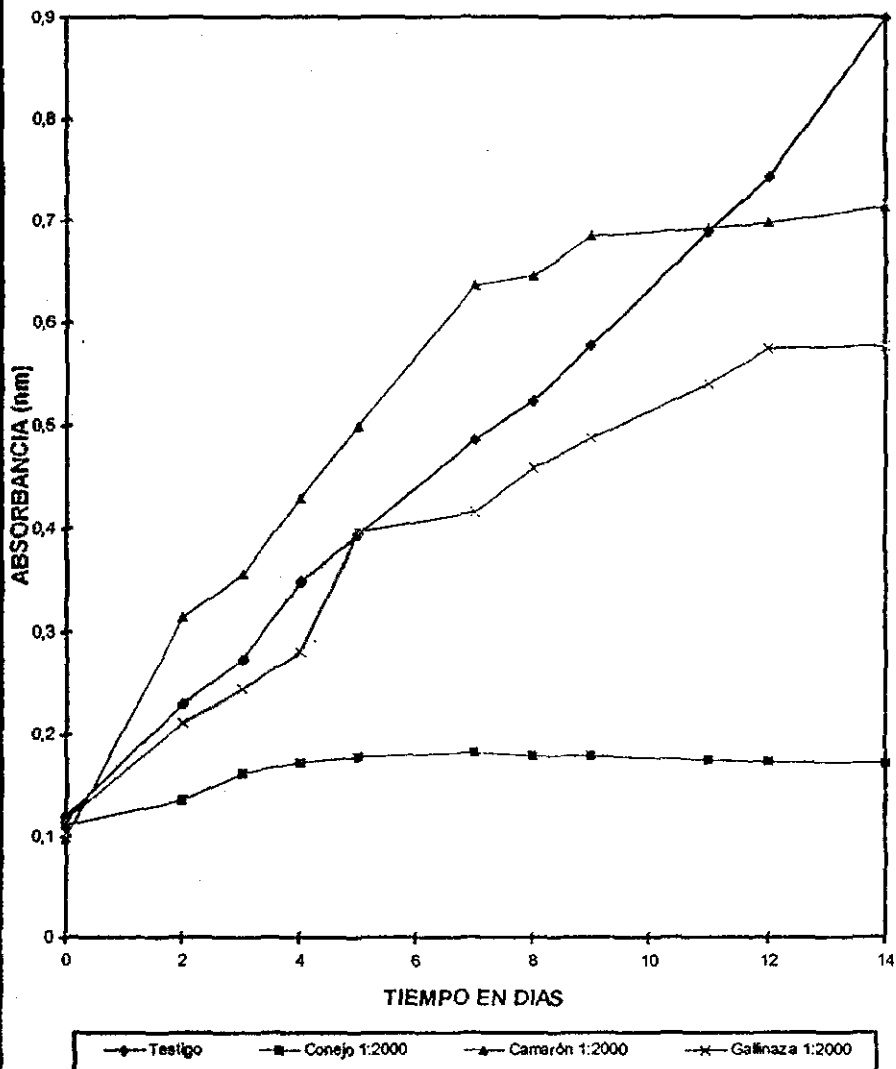
**CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN
MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON
Y/O GALLINAZA [CULTIVOS POR LOTE]
GRAFICA 21**



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN
 MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON
 Y/O GALLINAZA (CULTIVOS POR LOTE)
 GRAFICA 22



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN MEDIO DE CULTIVO CON: E. DE CONEJO, C. DE CAMARON Y/O GALLINAZA (CULTIVOS POR LOTE)
 GRAFICA 23



6.5.-CULTIVOS EN GARRAFON DE

Dunaliella tertiolecta

[CON 19 LITROS DE CAPACIDAD; 14 LITROS DE MEDIO Y 2 LTS. DE INOCULO: 0.5 DE ABS. Y 7.5×10^6 CEL. / ml]

Los siguientes resultados corresponden a los cultivos llevados a cabo en garrafones con *D. tertiolecta* usando como fuente de nutrientes, dos sustratos orgánicos [caparazón de camarón y gallinaza], en dos diluciones: 1:200 y 1:800 [TABLAS: 16,17 y gráficas 24, y 25]. Se usó el medio específico para *Dunaliella* con el testigo.

TABLA 16

CEPA: *Dunaliella tertiolecta*

MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: DUNALIELLA

TRATAMIENTO: CAPARAZON DE CAMARON

TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800
0	26	0.074	0.105	0.077
2	27	0.180	0.220	0.202
4	27	0.261	0.342	0.294
5	27	0.304	0.369	0.425
6	28	0.331	0.400	0.571
7	28	0.345	0.451	0.601
9	27	0.400	0.524	0.625
11	28	0.438	0.638	0.664
13	28	0.468	0.683	0.671
14	28	0.498	0.716	0.655
16	28	0.524	0.734	0.651
18	27	0.588	0.732	0.649
20	28	0.603	0.730	0.645
VARIACION EN EL pH:	INICIAL	8.00	8.05	8.03
	FINAL	9.08	8.65	8.83
CUENTA CELULAR [10 ⁶]	INICIAL	0.95	1.22	1.00
	FINAL	7.60	7.46	6.18

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN
MEDIO DE CULTIVO CON: C. DE CAMARON (CULTIVOS EN
GARRAFON)
GRAFICA 24

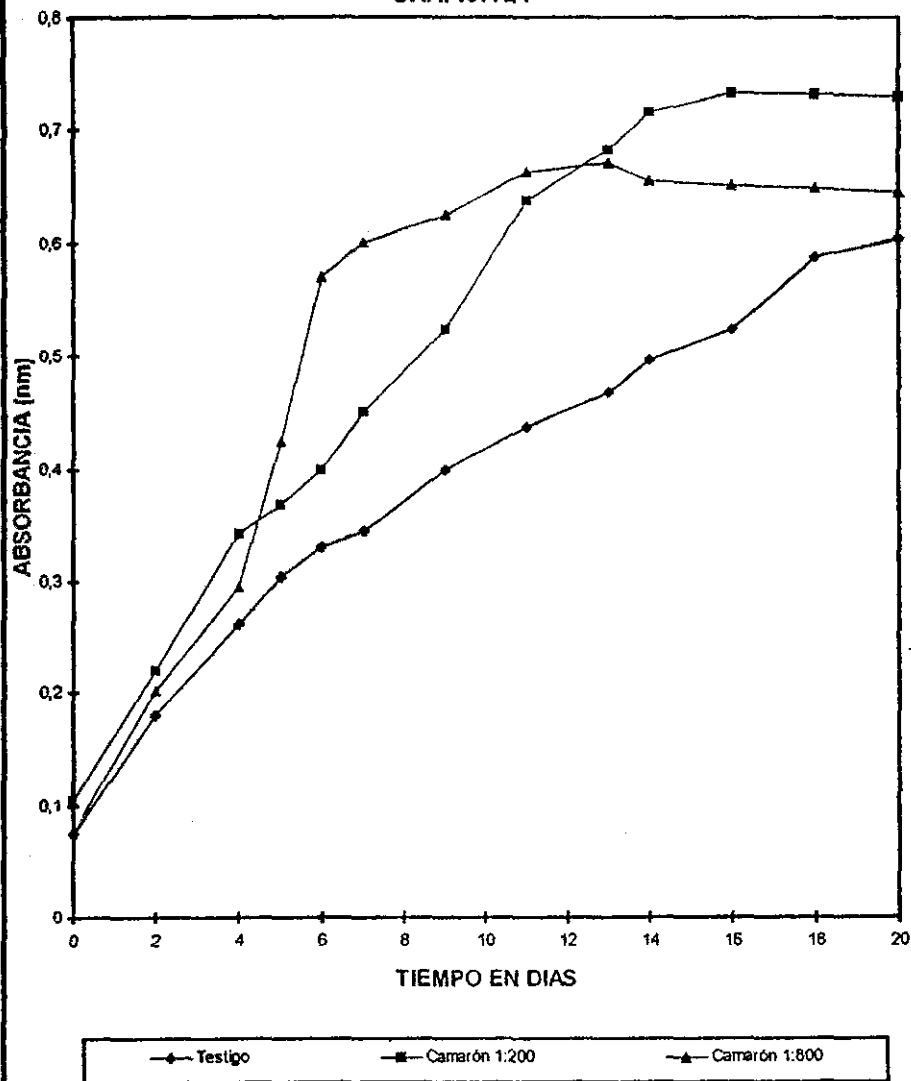


TABLA 17

CEPA: *Dunaliella tertiolecta*

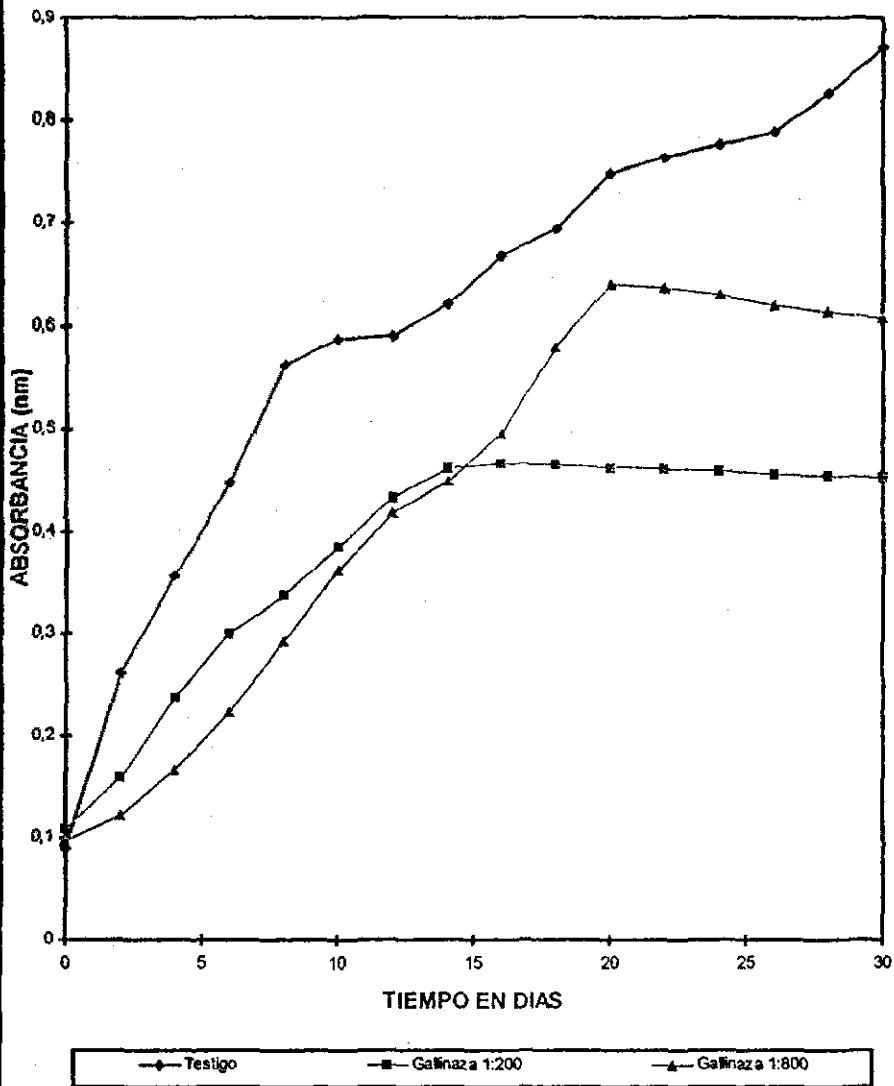
MEDIO DE CULTIVO DEL TESTIGO: DUNALIELLA

TRATAMIENTO: GALLINAZA

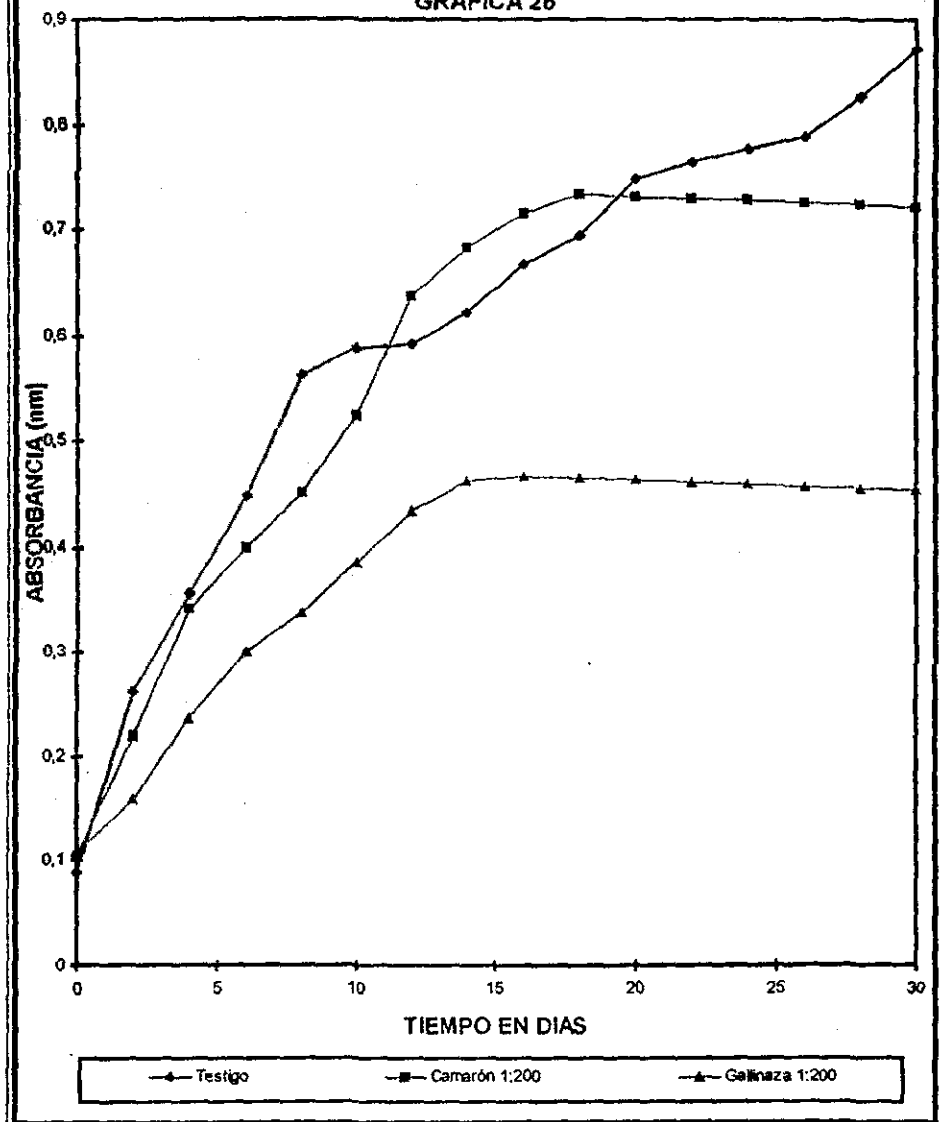
TIEMPO EN DIAS	TEMPERATURA	TESTIGO	1 : 200	1 : 800
0	27	0.090	0.108	0.097
2	26	0.262	0.159	0.122
4	27	0.356	0.237	0.167
6	27	0.448	0.300	0.223
8	27	0.562	0.338	0.293
10	26	0.588	0.385	0.363
12	27	0.592	0.434	0.419
14	28	0.622	0.462	0.449
16	28	0.668	0.467	0.496
18	27	0.698	0.465	0.580
20	28	0.748	0.463	0.640
22	27	0.764	0.461	0.638
24	28	0.776	0.459	0.630
26	28	0.788	0.457	0.620
28	27	0.826	0.455	0.614
30	27	0.871	0.453	0.609
VARIACION EN EL pH:				
	INICIAL	8.00	8.08	8.07
	FINAL	8.80	8.45	8.58
CUENTA CELULAR [10 ⁶]				
	INICIAL	1.02	0.95	1.01
	FINAL	8.50	5.59	6.75

En las gráficas 26 y 27 se muestran los resultados de los cultivos de *D. tertiolecta* en garrafón de manera concentrada y por dilución.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN
MEDIO DE CULTIVO CON: GALLINAZA (CULTIVOS EN
GARRAFON)
GRAFICA 25



**CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN
MEDIO DE CULTIVO CON: C. DE CAMARON Y/O GALLINAZA
(CULTIVOS EN GARRAFON)
GRAFICA 26**



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Dunaliella tertiolecta* EN MEDIO DE CULTIVO CON: C. DE CAMARON Y/O GALLINAZA (CULTIVOS EN GARRAFON)
 GRAFICA 27

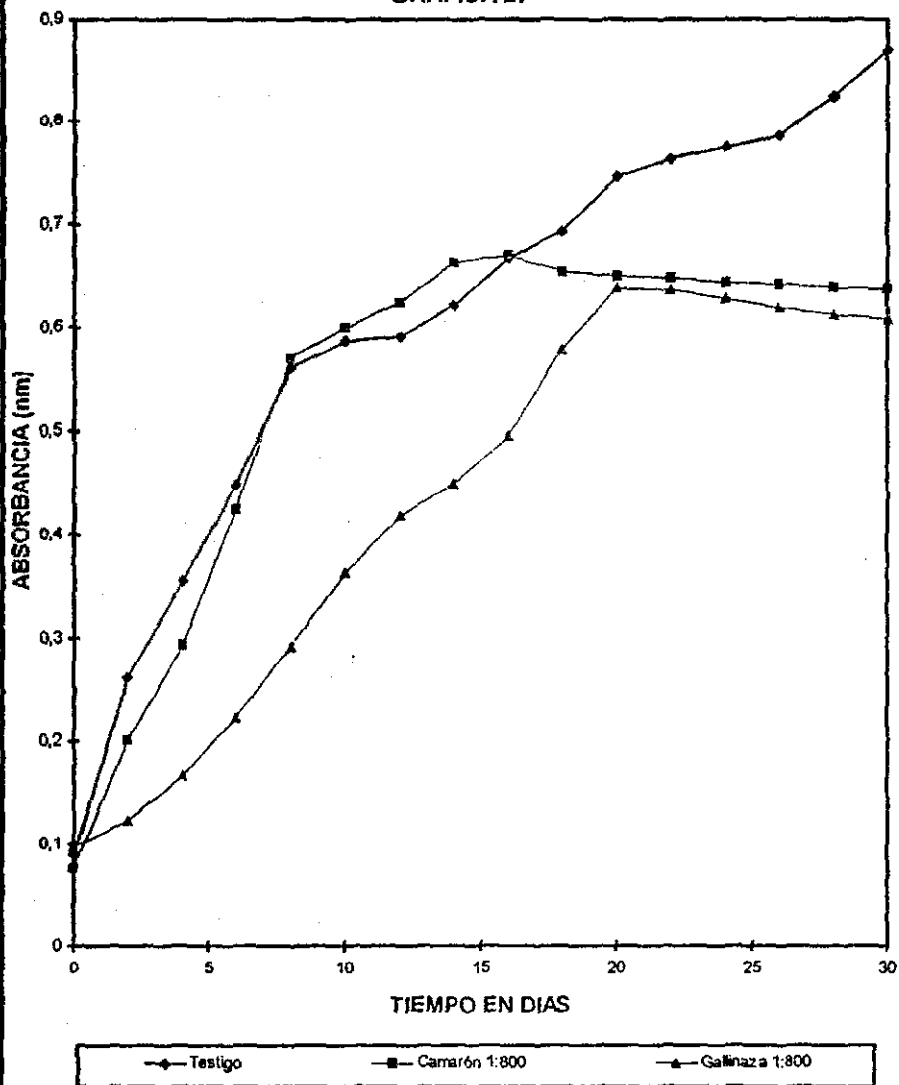
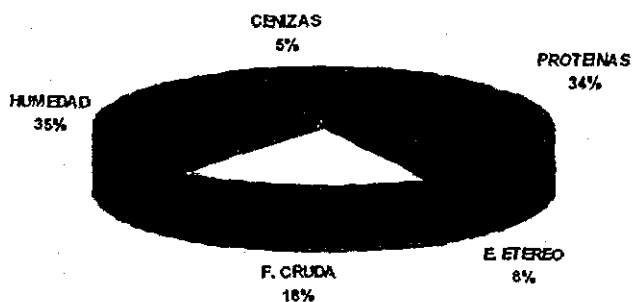


TABLA 18

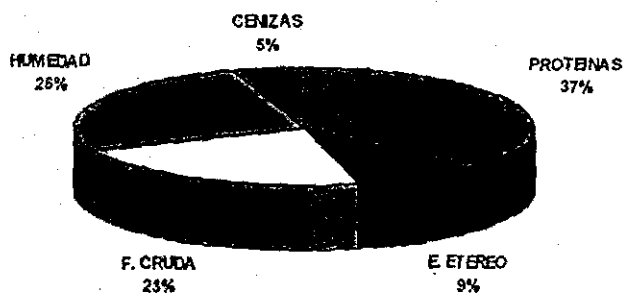
La siguiente tabla, muestra los resultados del análisis bromatológico realizado a las muestras centrifugadas de los cultivos con *D. tertiolecta* con comparación de camarón, gallinaza y su respectivo testigo.

TRATAMIENTO	HUMEDAD	E. ETereo	F. CRUDA	PROTEINAS	CENIZAS	
TESTIGO	34.59	7.87	18.12	34.68	4.68	
C. DE CAMARON	1:200	26.12	8.56	22.54	37.50	5.07
	1:800	23.65	7.49	23.58	41.46	3.74
GALLINAZA	1:200	37.91	6.71	20.32	29.68	5.09
	1:800	35.73	7.27	20.45	28.24	8.29

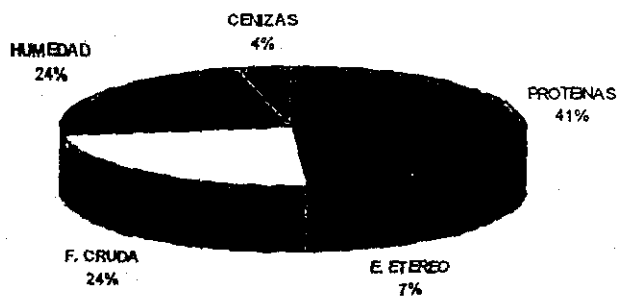
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella tertiolecta*
[TESTIGO] "CULTIVOS EN GARRAFON"



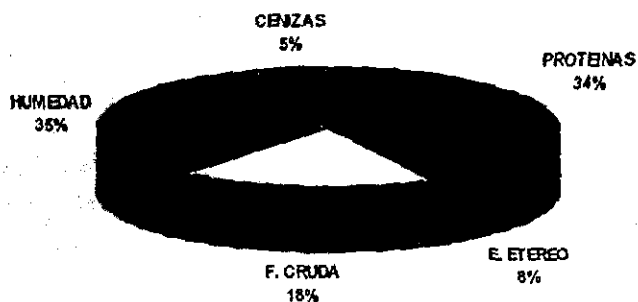
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella tertiolecta*
CON CAPARAZON DE CAMARON [1:200]



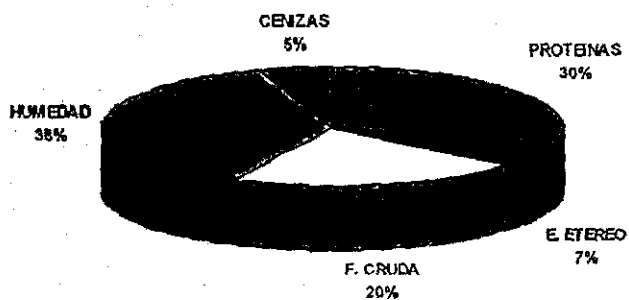
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella tertiolecta*
CON CAPARAZON DE CAMARON [1:800]



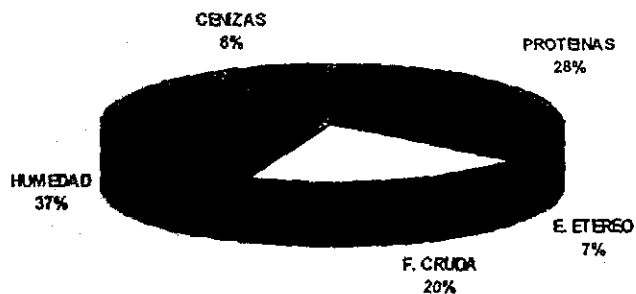
ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella tertiolecta*
[TESTIGO] CULTIVOS EN GARRAFON



ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella tertiolecta*
CON GALLINAZA [1:200]



ANALISIS BROMATOLOGICO DE *Dunaliella tertiolecta*
CON GALLINAZA [1:800]



VII. - DISCUSION

DE LOS SUSTRATOS ORGANICOS

Con respecto a la elección de los sustratos orgánicos, fué necesario considerar los siguientes aspectos: su abundancia, su bajo costo y el tiempo de descomposición. Sin embargo, el análisis bromatológico que se les practicó fué muy importante ya que proporcionó resultados valiosos de cada una de las determinaciones realizadas como fueron: porcentajes de proteínas, grasas, fibra cruda y cenizas, los cuales a su vez muestran un panorama de la presencia de elementos químicos conocidos como nutrientes que participan en el metabolismo de los organismos, importantes para su crecimiento o proliferación.

De los resultados obtenidos en el análisis bromatológico con los tres sustratos orgánicos, el caparazón de camarón presentó un contenido alto de proteínas y minerales [38.9 y 22.66 % respectivamente]; la gallinaza el mayor porcentaje de lípidos [6.97%]; y las excretas de conejo de fibra cruda con 16.53 %. Estos valores indican que el caparazón de camarón es el mejor sustrato y puede ser considerado como una excelente alternativa para ser usado como fuente de nutrientes para propósitos acuaculturales.

DE LAS CEPAS

Las dos especies de *Dunaliella* utilizadas en el trabajo se adaptaron rápidamente a las nuevas condiciones de cultivo; es decir en agua de mar enriquecido con los sustratos orgánicos e incluso se acercó al óptimo ya que proliferaron con gran velocidad en comparación con las microalgas cultivadas con los medios sintéticos. Esto refleja las grandes cualidades morfológicas y fisiológicas de estas cepas para adaptarse a las diferentes condiciones físico-químicas del medio.

DE LOS CULTIVOS EN MATRAZ

Con respecto a los cultivos llevados a cabo en matraces de, *D. salina* los mejores resultados se generaron con la gallinaza 1:200 y el caparazón de camarón 1:800 alcanzado ambos su mayor densidad celular a los 14 días de iniciado los cultivos [tablas 3 y 4 ; gráficas 2 y 3].

En relación a las diluciones probadas de cada sustrato, con el caparazón de camarón se obtuvieron resultados muy similares entre cada una de ellas, alcanzando una biomasa algal superior a 1.0 de absorbancia en la dilución 1:800, [gráfica 2], superando al testigo.

Con *D. tertiolecta*, los resultados que se obtuvieron fueron ligeramente menores a los obtenidos con *D. salina* [menor a 1 de absorbancia, gráficas 21,22 y 23]; en todas las diluciones probadas, los mejores resultados en la curva de crecimiento fueron los obtenidos usando como sustrato orgánico al caparazón de camarón.

Con respecto a la temperatura y al pH, su variación fue mínima, durante todo el periodo de cultivo y en todos los experimentos, por lo que el aumento en la densidad celular, lo atribuimos a la calidad del sustrato.

DE LOS CULTIVOS EN GARRAFON

Los trabajos hechos en garrafón constituyeron un nivel de cultivo de mayor grado de dificultad, debido al volumen implicado (16 lts.) y por el control de algunos factores ambientales como la esterilidad durante el periodo de cultivo.

En estos experimentos fue muy importante darle un seguimiento no solo con la absorbancia, sino también con la cuenta celular, ya que este parámetro permite confirmar el aumento de la densidad celular en los cultivos.

En este volumen, *D. salina* cultivada con caparazón de camarón se obtuvieron las lecturas más altas tanto de absorbancia como de cuenta celular en la dilución 1:200 alcanzando 1.81 de Abs., y 15.67×10^6 células / ml (tabla 6 gráficas 8 y 10).

Con *D. tertiolecta*, y usando como sustrato orgánico al caparazón de camarón en la dilución 1:200, se obtuvieron resultados ligeramente menores a los obtenidos con *D. salina* [menor a 1 de absorbancia y 7.46×10^6 células por ml], tabla 16 y gráfica 25.

A este nivel de cultivo [en garrafón] y de los tres sustratos, el caparazón de camarón fué el que propició los mejores resultados y en todas las diluciones probadas, lo cual indica la importancia que tiene este sustrato como fuente de nutrientes para el cultivo masivo de microalgas.

Del análisis bromatológico realizado a todas las muestras centrifugadas de ambas cepas, testigos, así como de las diluciones y de los tres sustratos utilizados a este volumen de cultivo: fueron *D. salina* y *D. tertiolecta* en las diluciones 1:200 y 1:800 donde se obtuvieron los porcentajes más altos de: proteínas [35-41 %]; de fibra cruda [15-23 %]; y extracto etéreo [7-9 %] tablas: 8 y 18, gráficas: 2 y 3 de las páginas 70 y 103; lo cual significa, que también son de buena calidad nutricional como alimento.

DE LOS CULTIVOS EN BOLSA

Los cultivos en estos recipientes indican también que su elección fué acertada por la facilidad en su manejo y por los resultados obtenidos. Nuevamente con *D. salina* cultivada con el caparazón de camarón arrojaron los mejores resultados, logrando 1.12 de Abs. Y 10.85×10^6 células /ml (tabla 10 y gráfica 14). Y en cuanto al análisis bromatológico, repite esta cepa con el mismo sustrato alcanzando 40.13 % de proteína en la dilución 1: 800 (tabla 12 y gráficas: 2 y 3 de la página 83).

En relación a las curvas de crecimiento que se obtuvieron en los cultivos con gallinaza en sus tres niveles: [por lote, en garrafón y en bolsa], así como con ambas cepas, y también con respecto a los porcentajes de proteínas que se determinaron con el análisis bromatológico a los centrifugados de este sustrato; fueron resultados muy buenos, sin lograr alcanzar al caparazón de camarón; pero que también puede recomendarse para cultivos masivos de microalgas. No así con los obtenidos con las excretas de conejo, ya que fueron muy bajos.

En todos los niveles de cultivo [matraces, garrafones y en bolsas] la temperatura y el pH sufrieron variaciones mínimas por lo que se consideraron como constante y las fluctuaciones de los resultados se le atribuyeron a los nutrientes presentes en los sustratos orgánicos utilizados.

VIII. - CONCLUSIONES

Se obtuvieron cultivos masivos de un alto nivel nutricional con *D. salina* y *D. tertiolecta*, usando medios semi-sintéticos y con sustratos orgánicos de desecho como fuentes de nutrientes.

Al utilizar diferentes recipientes o contenedores de cultivos, se comprobó que en cada uno de ellos, se presentan condiciones favorables que propician un buen crecimiento de las microalgas, sin embargo, en los cultivos masivos, los mejores resultados se obtuvieron cuando se usaron bolsas.

En todos los niveles de cultivo, se comprobó que la cepa que se adaptó rápidamente a las nuevas condiciones fué *D. salina*, con ella se registraron los resultados más altos.

Con respecto a los sustratos orgánicos de desecho que fueron usados como fuente de nutrientes; sobresalieron el caparazón de camarón en primer lugar por los buenos resultados que se registraron en todas las diluciones probadas; en segundo lugar la gallinaza y por último las excretas de conejo.

Las muestras analizadas de los cultivos en garrafón y en bolsa con el análisis bromatológico, las de caparazón de camarón dieron resultados altos de proteína, de lípidos y minerales por lo que se considera un alimento de alto valor nutricional para los organismos que las consumen.

Por lo anterior se puede concluir que, los cultivos de microalgas en condiciones relativamente controladas son una excelente alternativa en acuicultura, principalmente por el uso de sustratos orgánicos de desecho como fuentes de nutrientes con lo cual se reduce considerablemente los costos de producción para el desarrollo de organismos marinos como: camarón, bivalvos, peces y algunos otros organismos filtradores.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- 1.-Aaronson, Berner and Dubinsky, 1980, Microalgae as a source of chemicals and natural products, en, Algae Biomass, G. Shelef and C. J. Shoeder Editors, 555-595.
- 2.-Aquacop, Anónimo, 1978, Algal food culture of the centre oceanologique du pacifique. Centre Oceanologique du pacifique.
- 3.-Arredondo, F., y Juárez, P., 1986, Ciprinicultura (Manual para el cultivo de carpas), Secretaria de pesca, México, 121 p.
- 4.-Axler, Gersberg, and Goldman, 1980, Stimulation of nitrate uptake and photosynthesis by molybdenum, en Castle lake, California., can F. Fish Aquat. Sci., 37, 707-712.
- 5.-Baalen, C., and Edwards, P., 1973, Ligth temperature gradient plate., en Stein J.R. (Ed) Handbook of phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, New York, 267-273.
- 6.-Bardach, Ryther y Mclarney, 1986, Acuacultura, crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce, AGT Editors, S.A., México, 741.
- 7.-Bautista, C., 1989, Moluscos, tecnología de cultivo, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid España, 57-74.
- 8.-Ben-Amotz y Avron, 1980, Glycerol, B-carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*, G., Shelef and C., J. Soeder, Editors, 603-610.
- 9.-Ben-Amotz and Avron, 1983, Acumulation of metabolitos by halotolerant algae and its industrial potential; ann Rev. Microbil. 37, 95-119.
- 10.-Ben-Amotz, Edelstein y Avron, 1986, Use of the B-carotene rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol, British Poultry Science 27, 613-619.

- 11.-Benemann, Tillett and Weissman, 1987, *Microalgae biotechnology*, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 47-53.
- 12.-Bidwell, R., 1978, *Plant physiology*, 2nd Ed. Wadworth Publishing company. Inc. California. New York.
- 13.-Borowitzka, L., y Brown, A., 1974, The salt relations of marine and halophilic strains of the unicellular green alga, *Dunaliella*. The role of glycerol as a compatible solute. *Archives of microbiology*, 96 , 37-52.
- 14.-Borowitzka, L. J. 1981, The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes., *Hydrobiologia*, 81,33-46.
- 15.-Borowitzka, L.J. y Borowitzka, M.A., 1988, *Micro-algal biotechnology*, Cambridge University Press New York 27-58.
- 16.-Brand, L., y Guillard, R., 1981, The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. *F. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 50, 119-132.
- 17.-Brewer y Goldman, 1976, *Cultivo de microalgas en Coll*, M. 1983 (Ed) *Acuicultura marina animal*. Ediciones mundi-prensa, Madrid, España, 328-358.
- 18.- Brock, T., 1975, *Salinity and the ecology of Dunaliella* from great salt lake. *Journal of general microbiology* 89, 285-292.
- 19.-Cáceres, M., 1975, *Low-cost continuous algal culture system.*, Instituto di Biologia Animal, Universidad de Padova, Italia, 75-77.
- 20.-Chastel, H., 1980, Production and use of spirulina in México, en *Algae Biomass*, G.S. Y C.J. Soeder, Editors, Elsevier, Amsterdam, 51-63.
- 21.-Coll, M., 1983, *Acuicultura marina animal*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 670 p.p.
- 22.-Corsini, M. y Karydis, M., 1990 An algal medium based on fertilizers an its evaluation in mariculture, *Journal of Applied phycology* 2, Kluwer Academic publishers. Printed in Belgium, 333-339.

- 23.-Darley, M., 1987, *Biología de las algas: Enfoque fisiológico*, Editorial Limusa, S.A. 236 p.p.
- 24.-Davis, H., y Guillard, R., 1958, Relative value of ten genera of microorganisms as food for Oyster and clam larvae. *Fishery Bulletin of the fish and wildlife Service*, 58, 293-304.
- 25.-De la Lanza, E.G. y Arredondo, F., 1990, *La acuicultura en México: De los conceptos a la producción*, Instituto de Biología, UNAM, México, 315 pp.
- 26.-Dellarossa, S., y Cifuentes, de la T., 1991, Fotosíntesis-Iluminación en especies de *Dunaliella* y en cepas nativas de *D. Salina* (dunal) Teodoro, Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile, tomo 62, 83-88 pp.
- 27.-De la Noue y Pauw, 1988, The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae biotech adv. vol, 6, 725-770.
- 28.-Droop, M. R., 1969. *Algae methods in microbiology*. Vol 38 Academic press. 269-313.
- 29.-Dunal, M., 1937, Note sur les algues qui colorent en rouge certains eaux des marais salants méditerranéens; in *Mico-algal biotechnology*, Cambridge University Press New York.
- 30.-Edward, W., 1994, Cultivation of algae and nutrient removal in a waste heal utilization proces., *Journal of applied phycology* 3 159-167.
- 31.-Epifanio, C. y Ewart, J., 1977, Maximun ration of four algal diets for the oyster *Crassostrea virginica* Elsevier scientific publishing company, Amsterdam; *Omelin, Aquaculture*, 11, 13-29.
- 32.-Fabregas, J. y Herrero, C., 1985, Marine Microalgae as a potential source of sigle cell protein (SCP), *appl. Microbiol. Biotechnol.*, 110-113.
- 33.-Fabregas, J., y Herrero, C., 1986, Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets, *Aquaculture* 51, Elsevier science publishers, 237-243.

- 34.-Fabregas, Herrero, Abalde, Liano and Cabezas, 1986, Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *D. tertiolecta* (butcher) with high nutrient concentrations, Elsevier science publishers B.V., Aquaculture, 53, 187-199.
- 35.-Fabregas, Abalde, Cabezas and Herrero, 1989, Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *D. tertiolecta* (butcher) by nitrogen concentration as nitrate, nitrite and urea, Aquacultural Engineering 8, 223-239.
- 36.-Fogg, G., 1975, Algal cultures and phytoplankton ecology, 2nd Ed. The University of Wisconsin press, U.S. A.
- 37.-Gibor, A., 1956, The culture of brine algae, Biological bulletin, Woods Hole 3, 223-229.
- 38.-Goldman, J., 1980, Physiological aspects in algal mass cultures, G. Shelef and C.J. soeder, Editor E/NHBP, 343-359.
- 39.-Gomez-Pinchetti, Ramozanov, Fontes and García-Reina, 1992, Photosynthetic characteristics of *D. salina* (Chlorophyceae dunaliellales) in relation to B-carotene content.
- 40.-Granados, M. y Bückle, R., 1984, Cultivo de las microalgas -*Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos, An Ist. Ciencia del mar y limnología, UNAM, México, pag. 241-256.
- 41.-Guillard, R., 1973 (a), Methods of microflagellates and nannoplankton, en, Stein J. Cambridge University Press, USA, 448.
- 42.-Guillard, R., 1973 (b), Division rates, en, Stein, R., Ed. Handbook physiological methods., Culture methods and growth measurements., Cambridge University Press., New York., 289-312.
- 43.-Guillard, R., 1975, Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates., en, Smith, W. I. and Charley, M. H. (Ed) culture of marine invertebrates animals. Plenum Press., USA 29-66.

- 44.-Gummert, F., y Meffert, M., 1953, Nonsterfle large-scale culture of *Chlorella*, in green house and open air, en, Burlew, J. (Ed) Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, publ. 1-166.
- 45.-Gutierrez, A., 1988, Cultivo de microalgas -memorias- Seminario nacional de cultivo larvario de camarones peneidos, Nutrición larvaria, Fideicomiso Fondo Nacional para el desarrollo Pesquero, San Blas Nayarit, México.
- 46.-Guzman, A., 1979, Análisis del Estado del Arte de la Acuicultura en México, Departamento de Pesca y centro de ciencias del mar y limnología, México, 8-15 y anexo.
- 47.-Helm, M., Laing y Jones, 1979, Culture of algae for larval fish and shellfish rearing., The development of a 200l algal culture vessel at conway., Fisheries research technical report, number 53. Ministry of Agriculture, Fisheries an food, USA, 18.
- 48.-Hellebust, J., 1976, A osmoregulation, Ann Rev., Plant Physiol., 27, 485-505.
- 49.-Hemerink, G., 1973, Mass culture, en, Stein, R. J. (Ed) Handbook phycological methods., culture methods and growth measurement., Cambridge University Press. New York., 195-205.
- 50.-Hernandez, C., y Rodriguez, M., 1988, Las algas marinas: productos acuáticos de alto valor nutricional: Acuavisión, No.15 Publicación del Fideicomiso fondo Nacional para el desarrollo Pesquero, 29-30.
- 51.-Hernandez, A., y García, C., 1990, La acuicultura, hacia el manejo integrado de los recursos en la acuicultura en México, Instituto de Biología, UNAM, México, 15-37.
- 52.-Herrera, M., 1988, Proceso de elaboración de alimento balanceado para peces, Acuavisión, No. 15, 27-28.

- 53.-Imhoff, Sahl, Soliman, and Trüper, 1979, The wadi Natrun: Chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. *Geomicrobiology journal* 1, 219-234.
- 54.-Javor, B., 1989, *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry*. Brock/Springer series in contemporary bioscience, Springer V 328 pp.
- 55.-Jennings, J., y Rainbow, P., 1979, Accumulation of cadmium by *D. tertiolecta* (butcher), *Journal of plankton research*, vol. 1 number 1, information retrieval inc., New York USA, 67-74.
- 56.-Jimenez, C., y Niell, F., 1990, Influence of temperature and nitrogen concentration on photosynthesis of *D. viridis* Teodoresco, J., *appl. phycol.*, 3, 309-317.
- 57.-Jimenez, C., y Niell, F., 1991, Growth of *D. viridis* Teodoresco, effect of salinity, temperature and nitrogen concentration, *J. appl. phycol.* 3, 319-327.
- 58.-Jimenez, R., 1988, Panorama de la microscopía de alimentos balanceados, *Acuavisión* No. 14, *Revista Mexicana de Acuacultura*, 25-26.
- 59.-Kaplan, D., y Richmond, 1986, Algal nutrition., en *Handbook of Microalgal mass culture.*, Richmond, A., Ed. CRC. Press, inc. Boca Raton, Florida, USA, 147-198.
- 60.-Klut, Bisalputra and Antia, 1983, Agglutination of the chlorophycean flagellate *D. tertiolecta* by treatment with lectins or divalent cations at alkaline pH. *Journal of phycology* 19, 112-115.
- 61.-Latorella, A., y Vadas, R., 1973, Salinity adaptation by *D. tertiolecta* I. Increases in carbonic anhydrase activity and evidence for a light-dependent Na^+/H^+ Exchange., en *J. Phycol.*, 9, 273-277.
- 62.-López, H., 1997, *Estudios en cultivo continuo de una microalga del genero Ankistrodesmus*, Tesis profesional, IPN, México.

- 63.-López, Muñoz, Abalde and Herrero, 1994, Crecimiento y contenido en pigmentos de 4 especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *Nova Acta científica Compostelana (biología)* 3, 59-65.
- 64.-Lowry, Rosebrough, Lewis and Randall, 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J., Biol., Chem.*, 193, 265-275.
- 65.-Lustigman, B., 1986, Enhancement of pigment concentrations in *D. tertiolecta* as a result of copper toxicity; *Buli., Envirom., Contam. Toxicol.*, 37, 710-713.
- 66.-Mandelli, E., 1969, The inhibitory effect of copper on marine phytoplankton. *Contributions in Marine Science* 14, 47-57.
- 67.-Martinez, J., y Abrego, A., 1986, Modelo Mexicano de policultivo, Secretaria de pesca, México, 105.
- 68.-Martinez, Ramirez, Villaseñor, Rios y Espinosa, 1988, Cultivos de apoyo para la acuicultura; producción de alimento vivo, acuavisión, No. 14 revista mexicana de acuicultura, 18-23.
- 69.-Markovits, Gianelli, Conejeros and Erazo, 1993, Strain selection for B-carotene production by *Dunaliella* *World Journal of Microbiology and biotechnology*, vol,9, 534-537.
- 70.-Massyuk, N., 1966, Mass culture of the carotene bearing alga *D. salina* Teod. *Ukransky Botanicchnya Zhournal* 23, 19-20.
- 71.-Mathiessen, G., y Torner, R., 1968, Possible Methods of improving the shellfish industry of marthas vineyard, Dukess country Massachusetts., *Marine Research Fundation., Inc., Edgar town*, 138.
- 72.-Mellkonian, M., y Preisig, H., 1984, An ultrastructural compararison between spermatopsis and *Dunaliella* (Chlorophyceae)- plant systematics and evolutions 164, 31-46.

- 73.-Mclachlan, J., 1964, Some consideration of the growth of marine algae in artificial media., *Canadian Journal of Microbiology*, 10, 769-782.
- 74.-Mclachlan, J., 1973, Growth media, Marine, en, Stein J. Handbook, USA, 448.
- 75.-Morales, P., 1990, Aislamiento y algunos datos biológicos en la determinación experimental de una técnica para el cultivo del rotífero, *Brachionus calyciflorus*, Pallas, tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 62.
- 76.-Noro, T., 1981, Effect of Mn on the growth of a marine green alga. *D. tertiolecta*. *Japanese journal of phycology* 26, 69-72.
- 77.-O' Kelley, J., 1974, Inorganic nutrient. In Steward, W. (Ed), *Algal Physiology and biochemistry*. Botanical monographs. Vol. 10. Blackwell Scientific publications oxford, 610-635.
- 78.-Oliviera, Bisalputra and Antia, 1980, Ultrastructural observation of the surface coat of *D. tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. *New phytologist* 85, 385-392.
- 79.-Orbe, M., y Arias, A., 1987, Métodos de cultivo del camarón en México, *Secretaría de Pesca*, México, 29.
- 80.-Oren, A., 1981, Approaches to the microbial ecology of the dead sea. *Kieler Meeresforschungen, Sonderheft* 5, 416-424.
- 81.-Oren, A., y Shilo, M., 1982, Population dynamics of *Dunaliella parva* in the dead sea. *Limnology and oceanography* 27, 201-211.
- 82.-Ortega, M., 1984, Catálogo de las algas continentales recientes de México, 1ra. Ed. UNAM, México, 189.
- 83.-Paasche, E., 1971, Effect of ammonia and nitrate on growth, photosynthesis and ribulose-diphosphate carboxylate content of *Dunaliella tertiolecta*. *Physiologia Pl.* 25 294-299.

- 84.-Pace, Ferrara and Del Carratore, 1977, Effect of sub-lethal doses of copper sulphate and lead nitrate on growth and pigment composition of *D. salina* Teod. Bulletin of environmental contamination and toxicology 17, 679-685.
- 85.-Palmer, Ballard y Taub, 1975, A continuous culture apparatus for the mass production of algae, Aquaculture, Vol. 6, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 319-331.
- 86.-Pauw y Persoone, 1988, Micro-algae for Aquaculture, en, Micro-algal Biotechnology Cambridge University press New York, 197-213.
- 87.-Persoone, G., y Claus, C., 1980, Mass culture of algae a bottleneck in the Nursery culturing of molluscs., G. Shelef and C. J. Soeder, Editors, 265-283.
- 88.-Post, F., 1977, The microbial ecology of the great salt lake. Microbial Ecology 3, 143-165.
- 89.-Post, F., Borowitzka, L., Borowitzka, M., Mackay, B., and Moulton, T., 1983, The protozoa of a western Australian hypersaline lagoon. Hydrobiología 105, 95-113.
- 90.-Provasoli, L., and Carlucci, A., 1974, Vitamins and growth regulators. In Steward, W. (Ed), Algal physiology and biochemistry. Botanical monographis, vol. 10, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 741-789.
- 91.-Ramos, A., y Salazar, M., 1990, Uso potencial de los cultivos masivos de microalgas; en La acuicultura en México, de los conceptos a la producción; Instituto de Biología, UNAM, 274-288.
- 92.-Ramos, C., 1993, Bioacumulación del zinc y su influencia en el desarrollo de diferentes cepas de microalgas, Departamento de Biotecnología UAM Iztapalapa, México.
- 93.-Reyes, F., 1990, Aislamiento y caracterización de una especie fitoplanctónica del sistema lagunar Boca del Rio, Mandinga, Ver., para uso acuacultural y contribución al cepario del lab., de alimento vivo del

Instituto Tecnológico del mar, Boca del Rio, Ver., México, tesis profesional, SEP/ITMAR Boca del Rio, Ver., México.

- 94.-Reynoso, Maeda, Roman y Monsalvo, 1990, Cultivos continuos de fitoplancton mediante un turbidostato de construcción simple, CICIMAR, vol., 5, No. Esp. I. México, 13-18.
- 95.-Richmond, A., 1990, Large scale microalgal culture and applications progress in phycological research vol. 7, 31-62.
- 96.-Rivera, L., y Orbe, M., 1990, Contribución al conocimiento de la biología, cultivo y pesquería de la acumara *Algaesea lacustris* del lago de Patzcuaro, Michoacan; en, Acuicultura en México, Instituto de Biol. UNAM, México, 41-54.
- 97.-Salisbury, F., y Ross, C., 1978, Plant physiology 2nd Ed. Wadworth Publishing Company. Inc. California.
- 98.-Sandbank, E., 1980, Microalgae grown in wastewater as an ingredient in the diet of warmwater fish. G. Shelef and C. J. Soeder, Editors, 697-706.
- 99.-Sass, y Ben-Yaakov, 1977, The carbonate system in hypersaline solutions: Dead sea brines, Marine chemistry, 5, 183-199.
- 100.-Sevilla, M., 1977, Introducción a la ecología marina, consejo editorial del IPN, México, 220.
- 101.-Soeder, J., 1979, The scope of microalgae for food and feed G. Shelef and C. J. Soeder, Editors, 9-17.
- 102.-Soeder, J., 1980, Production and utilization of microalgae, A brief survey. Procc. 2nd. Egypt. Algae Symposium. Cairo, 9-28.
- 103.-Spectorova, Goronkova, Nosova and Albitskaya, 1982, High-density culture of marine microalgae promising items for mariculture I. mineral feeding regime an installations for culturing *D. tertiolecta* Butch, Acuaculture, 26, Elsevier Scientific publishing company, 289-302.

- 104.-Spectorova, Goronkova, Nosova and Albitskaya, 1986, High-density culture of marine microalgae- promising items for mariculture. III Mass culture of Monochrysis lutheri Droop. Aquaculture 55, 231-240.
- 105.-Spoehr, H., y Milner, H., 1949, The chemical composition of Chlorella: effect of enviromental conditions. Pl. Physiol 24, 120-149.
- 106.-Starr, C., 1973, Apparatus an maintenance. en, Stein R. (Ed) handbook phycological metods. Culture methods an growth measurement. Cambridge University Press New York, 159-170.
- 107.-Stein, R., 1973, Phycological methods, culture methods and growt measurements, Cambridge, University press, USA, 448
- 108.-Sze, P., 1993, A Biology of the algae, Second Edition WCB, WMC., Brown Publishers, England, 259.
- 109.-Teodoresco, E., 1905, Organization et développement du Dunaliella nouveau genere de volvocacée in Mico-algal biotechnology, Cambridge University Press New York.
- 110.-Terry, Laws and Burns, 1985, Growth rate variation in the N: P requirement ration of phytoplankton, Phycol 21, 323-329.
- 111.-Torretera, B., 1983, Cultivo semicontínuo de Chlorella saccharophyla. Tesis profesional, Iztacala, UNAM, México.
- 112.-Trotta, P., 1981, A simple and inexpensive system for continuous monoaxenic mas culture of marine microalga aquaculture 22, 383-387.
- 113.-Turpin, A., 1991, Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism, J. Phycol, 27, 14-20
- 114.-Ukeles, R., 1980, American experience in the mass culture of microalgae for feeding larvae mass the American Oyster, Crassostrea virginica, G. Shelef and C.J. Soeder, Editors, 287-303.
- 115.-Umebayashi, O., 1972, Practical culture of Microalgae Government of Japan 6, 131-141.

- 116.-Vergara, C., y De la Garza, M., 1988, La nutrición en la producción acuícola, *Acuavisión*, Revista Mexicana de Acuicultura, No. 14, 29-31.
- 117.-Volcani, B., 1944, The microorganisms of the dead sea. In C. Weizmann commemorative volume. pp 71-85, Rehovot, Israel: Daniel Sieff Research Institute.
- 118.-Whitehouse, C., y Picos, G., 1984, Manual de técnicas para el análisis de los alimentos, Offsali-6, S:A., México, 85.
- 119.-Yurina, E., 1966, Experiment on cultivation of the halobiontic algae *Asteromonas gracilis* Artari and *D. salina* Teod. Moscow Universitat vertnik, *Biologra* 21, 76-83.