



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

BO130/83
G.2.

CULTIVO SEMICONTINUO DE *Chlorella saccharophila*
(Krüger).

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

LAURA TORRENTERA BLANCO

Los Reyes Iztacala, México
1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MI MADRE CON CARÍO,
ADMIRACION Y GRATITUD

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MIS HERMANOS

AGRADECIMIENTOS

Hago patente mi agradecimiento a todos los--- investigadores de la Estación Experimental de Pesca de la Prefectura de Kochi, Japón, por las facilidades brindadas para el uso de material e instalaciones, que hicieron posible el desarrollo de este estudio, en especial a los ingenieros M. Yamagushi y M. Tsuneishi.

Al oceanólogo Alfonso Aguirre por sus recomendaciones, que fueron una guía para la realización de este trabajo, y

A todas aquellas personas que de una u otra-- forma contribuyeron para su culminación.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	2
II. ANTECEDENTES.....	6
1. Cultivo semicontinuo y continuo...	6
2. Descripción de la especie.....	6
III. MATERIALES Y METODOS.....	16
1. Cultivo estático.....	16
2. Cultivo semicontinuo.....	17
2.1 Dilución o cosecha óptima.....	18
2.2 Tasas de crecimiento.....	20
2.3 Producción máxima.....	21
IV. RESULTADOS.....	23
1. Cultivo estático.....	23
2. Cultivo semicontinuo.....	23
2.1 Dilución o cosecha óptima.....	24
2.2 Producción máxima.....	24
2.3 Tasas de crecimiento.....	25
V. DISCUSION.....	38
CONCLUSIONES.....	42
APENDICE I.....	44
APENDICE II.....	50
VII. LITERATURA CITADA.....	55

RESUMEN

En el presente trabajo se determinaron la tasa óptima de dilución (cosecha) y la producción -- máxima de un cultivo semicontinuo de *Chlorella saccharophila* usando el método propuesto por Droop (1966) para microalgas. Estas resultaron ser: D óptima= 190 l/día equivalentes al 38% del volumen total, -- con una P máxima= 36×10^{11} células.

En relación a su desarrollo en un medio de -- fertilizantes agrícolas (Medio de Kochi) con una -- relación nitrógeno: Fósforo (13:1), éste resultó -- adecuado, pues se obtiene una tasa de crecimiento -- de 1.44 divisiones celulares/día, y una densidad -- máxima en el período de crecimiento exponencial de 40×10^6 /ml.

El sistema de cultivo desarrollado en condi-- ciones ambientales no controladas ofrece una pro-- ducción a gran escala para ser utilizada con fines acuaculturales.

I. INTRODUCCION

En la Acuacultura, uno de los factores limitantes y el problema más urgente a resolver, es la fuente constante de alimento vivo, esencial para la mayoría de los estadios larvales de moluscos, crustáceos y peces (Droop, 1975).

Para el caso de fitoplancton existe una extensa literatura sobre las técnicas para su cultivo; las más usadas se encuentran descritas en los trabajos de Guillard (1972), Stein (1973) y Kinne (1976).

En su mayoría son métodos de cultivo discontinuos, conocidos como cultivos de tina; su mantenimiento es complicado y su producción no es constante, por lo que se han ideado tratamientos que permitan almacenar las microalgas por tiempo indefinido (Holm-Hansen, 1973; Sorgeloos, 1974; Flassch, *et. al.*, -- 1975).

En Japón se inició el cultivo masivo de microalgas alrededor de 1964, con fines acuaculturales para la producción de rotíferos principalmente; esta técnica recibió el nombre de "Método del tanque de transferencia diaria", pero no fue muy popular --- pues requería de una intensa labor que involucra un cultivo nuevo cada día (SISFFA, 1964 a,b). To

dos estos métodos en realidad no resuelven el problema de la demanda constante de alimento vivo; -- una solución a éste puede ser el automatizar y optimizar los cultivos para convertirlos de sistemas discontinuos a sistemas semicontinuos o continuos- (Dunstand-Menzel, 1971; Retousky, 1966; Droop, --- 1975).

Un cultivo continuo se establece mediante diluciones continuas de medio fresco, de un volumen fijo de cultivo en donde los nutrientes no actúan como factores limitantes; el equilibrio es establecido por la tasa de dilución adecuada (Ukeles, 1973).

No existe una definición clara de cultivo semicontinuo en la literatura consultada, pero Fencel --- (1966), establece que no existe diferencia entre el proceso continuo y el proceso semicontinuo, establece matemáticamente que el número de períodos de remoción de un cultivo y adición de medio nutritivo por unidad de tiempo, puede ser diferente y -- que cuando es suficientemente alto, el proceso semicontinuo pasa a ser continuo. De acuerdo con lo anterior y tomando como base la definición de Kubitscheck (1970), Aguirre (1981) propone que: "Un cultivo semicontinuo es un sistema de flujo en el cual células individuales están suspendidas en un volumen cercanamente constante, en un estado de --

equilibrio dinámico (o cercano a él), establecido por una remoción de cultivo y adición de medio nutritivo por unidad de tiempo menor a infinito".

En base a las definiciones anteriores, podemos concluir que se logra optimizar un cultivo conociendo la concentración adecuada de nutrientes, buscando una coordinación entre la tasa de crecimiento y la utilización de los nutrientes, así como la producción sostenida y estandarización de la cosecha a intervalos periódicos con reemplazamiento del medio de cultivo en forma continua o semicontinua. (Droop, 1975; Cáceres, 1979; Aguirre, 1981).

Chlorella saccharophila, es una de las microalgas de mayor uso en la acuicultura, en Japón es la base de casi todas las cadenas tróficas de la acuicultura comercial, teniendo actualmente una importancia central su cultivo a niveles masivos (SISFFA, 1964 a,b; Hirayama y Ogawa, 1972; Tsukada, et. al., 1974; Fukusho, et. al., 1976; Hirata, 1974; Mae, 1979; Ioku, et. al., 1980). Se hace inminente la necesidad de optimizar su cultivo, automatizando el sistema, ya que hasta la fecha sólo se ha usado la técnica de cultivo discontinuo, en la cual se aprovecha el volumen total, desperdiciándose la posibilidad de sostener el cultivo a largo plazo implicando ésto un gasto mayor de tiempo, trabajo y

una menor planeación de la producción de todo el sistema acuacultural.

El presente trabajo es un intento de producción masiva utilizando la técnica de cultivo semicontinuo bajo condiciones ambientales, en forma económica y sencilla, probando un medio de fertilizantes agrícolas (medio de Kochi), para la especie particular que nos ocupa, por lo que se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la dilución óptima para la cual la producción diaria de *Chlorella saccharophila* es máxima.
2. Determinar las tasas de crecimiento en Divisiones celulares/día.
3. Determinar la producción del sistema y sus límites de confianza.

II. ANTECEDENTES

1. Cultivo semicontinuo y continuo

Cuando se requiere de grandes cantidades de células a intervalos frecuentes los cultivos semicontinuos o continuos, proveen un gran número con mayor consistencia, en forma uniforme para fines acuaculturales. La teoría básica y el análisis matemático de estos sistemas fueron propuestos por Monod (1942-1950) y NÓvick y Szilard (1950 a,b) para cultivos de bacterias y levaduras. Recientemente el método ha sido utilizado en investigaciones sobre la fisiología, nutrición, mecanismo fotosintético, bioquímica, etc., de una gran cantidad de microalgas (Burmester, 1979 a-b; Caperon, 1967; Howell *et. al.*, 1966; Turpin y Harrison, 1979; Ukeles, 1973-1976). El análisis matemático extensivo para microalgas corresponde a Droop (1968, 1970, 1973, 1974). A la fecha son pocos los reportes sobre la aplicación del método con fines acuaculturales (Droop, 1975; Cáceres, 1979; Aguirre, 1981).

2. Descripción de la especie

Chlorella saccharophila, (Krüger) Migula var. *saccharophila*, fue aislada y clasificada en la estación Yashima en Japón, por el Dr. Yuichi Yoneda en 1973 y reportada por Tsukada, *et. al.*, en 1974. A la fe-

cha se han llevado a cabo varios estudios sobre las características de la especie que nos permiten hacer una descripción precisa de su morfología y estructuras (Foot-Novakova, 1969; Yoneda, 1973; Tsukada, *et.al.*, 1974; Rascio y Casadoro, 1981; Lee, Reidy y Kessler, 1982). Se trata de una cloroficea discoidal de color verde intenso de 6 micras de diámetro, con un núcleo central irregular y deforme; singular complejo de Golgi y grandes vacuolas en yuxtaposición al núcleo; cloroplasto lobulado y simple ocupando el mayor volumen celular; pirenoide prominente penetrado por numerosos tilacoides simples rodeado de glóbulos de almidón. (Fig. 1).

La división celular se caracteriza por la formación de autosporas ovales de 4 micras de diámetro; el número de autosporas producidas es de 8, 16 a 32, dependiendo de la concentración de los nutrientes (Hirata, 1972, 1975). El promedio de crecimiento individual es de 1.2 micras/día con una tasa de crecimiento poblacional de 1.4 divisiones cel./día en promedio (Hirokawa, 1975; Hirata, 1972, 1975). La curva de crecimiento poblacional presenta una fase de crecimiento exponencial alrededor de los 7 días con una densidad promedio de 30×10^6 cel/ml. y máxima de 40×10^6 cel/ml. una fase estacionaria de los 8 a los 25 días con 17×10^6 cel/ml. y una fase de decaimiento de los 26 a los 30 días con 8×10^5 cel/ml.--

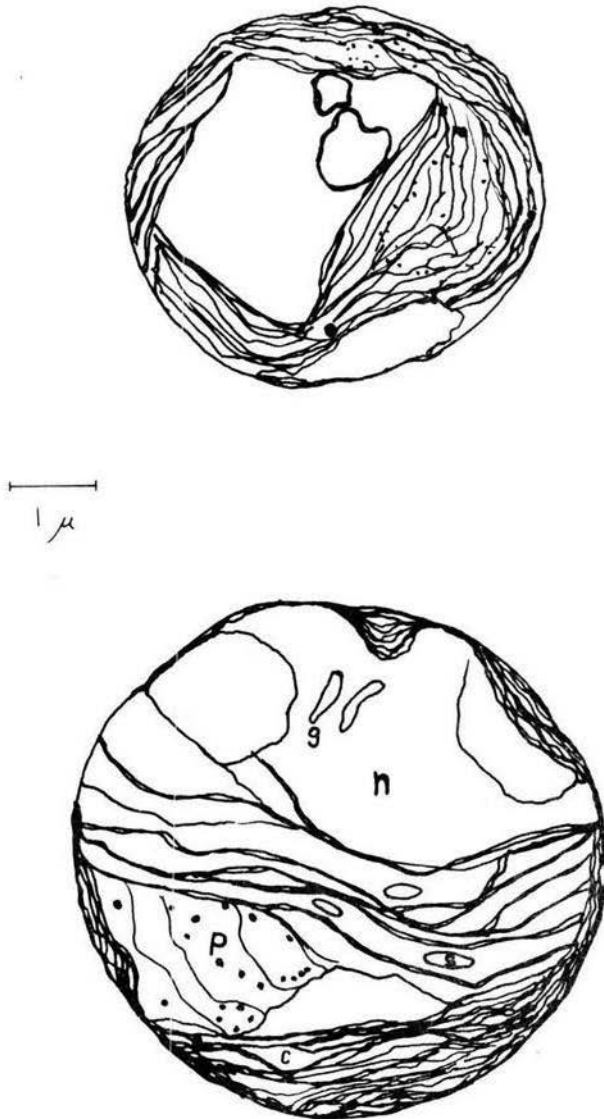


FIG. 1. Dos secciones de *Chlorella saccharophila* en diferentes estadios de crecimiento muestran la disposición del núcleo (n), el complejo de Golgi (g), el cloroplasto prominente y lobulado (c), el pirenoide penetrado por tilacoides y rodeado de glóbulos de almidón (p) y algunos gránulos osmofliccos (s).

por agotamiento de nutrientes, (Hirata, 1972,1975).

El cuadro básico fisiológico de este género (niveles óptimos de luz, temperatura, nutrientes, salinidad, pH, fotoperíodo, y la interacción entre estos) ha sido ampliamente investigado (Hirata, 1972, 1975, 1978, 1980; Hirokawa, 1975; Kessler, 1976,-- 1978; Pratt y Fong, 1940; Lorenzen y Ruppel, 1960; Myers, 1946; Ukeles, 1973).

Chlorella puede crecer en un intervalo de salinidad de 25‰ a 30‰ considerándose la salinidad óptima de 25‰; la división celular está relacionada al fotoperíodo siendo la intensidad más adecuada entre -- 2350 lux a 2500 lux con fotoperíodo continuo, observándose una sincronía del crecimiento con fotoperíodo solar; *Chlorella* es muy resistente a cambios de temperatura, hasta de 10°C como mínimo y con un máximo de 40°C, siendo la temperatura óptima de 25°C.

Las especies de *Chlorella* han sido cultivadas con nutrientes tanto inorgánicos como orgánicos. Pueden ser utilizados como fuente de Nitrógeno, sales de amonio, ácido úrico y la urea; con respecto a la utilización de fuentes de Fósforo, el Fósforo inorgánico es un buen recurso para todo el fitoplancton, generalmente las variaciones son pequeñas con respecto a la fuente siendo mayormente uti

lizados los ortofosfatos.

El agua de mar provee de bajas concentraciones de Na, K, Mg, Ca, etc., para obtener el balance iónico. Ni las vitaminas ni otros compuestos orgánicos son un factor limitante para el crecimiento de *Chlorella* en cultivo, por lo que puede considerarse a ésta como una verdadera alga autótrofa (Carlucci, 1970; Nishijima, et. al., 1979). La Tabla 1 resume la información sobre las condiciones ambientales--de cultivos de microalgas de género *Chlorella* y provee datos útiles sobre la fisiología del género.

Cuando se inició la producción masiva del rotífero, *Brachionus plicatilis* en Japón, inicialmente se cultivaron transfiriéndolos de un tanque a otro de *Chlorella* con una densidad entre 10 a 20×10^6 cel/ml. -- (SISFFA, 1964 a,b). Por lo impráctico de la técnica se iniciaron una serie de investigaciones tratando de encontrar un método adecuado para la producción continua de rotíferos sin depender de los cultivos masivos de *Chlorella*; una de éstas propuso el uso de la levadura de pan como alimento (*Saccharomyces cerevisiae*) (Hirata y Mori, 1967). Se pensó que ésta resolvería la producción de rotíferos ya que se producían densidades hasta de 100 rotíferos/ml. Después de la publicación de estos resultados, otros investigadores se interesaron en estu

diar los cultivos de rotíferos alimentados con levadura (Endo, 1978; Fukusho, *et. al.*, 1976; Furukawa y Hidaka, 1973; Hirata, 1977 a,b; Hirata, *et. al.*, 1980 a,b; Imada, 1980; Kawano, 1968, 1978; Mochizuki, *et. al.*, 1980; Osawa y Kawano, 1971; Ueki, --- 1975). Algunos se inclinaron por la utilización de la dieta mezclada de levadura y *Chlorella*, pero se observó que en las larvas de peces alimentados con rotíferos producidos a partir de la dieta de levadura o la mezcla 95% levadura y 5% *Chlorella*, ocurrían altas mortalidades, a raíz de este problema, las investigaciones se encaminaron a la identificación de la causa (Fukusho, *et. al.*, 1976; Kitajima, *et. al.*, 1980 a,b; Watanabe, 1978). La razón fue un desbalance nutricional por falta de ácidos grasos esenciales, planteándose la solución al problema mediante el enriquecimiento de los cultivos de rotíferos con una fuente de ácidos grasos del tipo W₃ altamente insaturados (AGAI W₃). Se probó una levadura mejorada con AGAI W₃ la cual fue llamada "Levadura Omega" (Imada, 1980; Watanabe, 1978; Kitajima, *et. al.*, 1980 a,b y otros).

Los estudios comparativos de la concentración de AGAI W₃ en el total de ácidos grasos que *Chlorella* (especies marinas) posee, es de 29%, la levadura de pan 1.3% y la levadura Omega el 34.7%. Actualmente la levadura Omega se produce comercialmente

en Japón, (Kitajima, 1980), pero su uso tiene la desventaja de ser de mayor costo. Aunado a esto se realizaron investigaciones para la determinación de una dieta adecuada para varias especies de Zooplancton (*Acartia clausi*, *tigriopus japonicus*, *Artemia* sp, y *Moina* sp.). Se probaron la levadura de pan, la levadura Omega y varias especies de fitoplancton entre ellas *Chlorella*. Se encontró que la abundancia y calidad de estas especies de zooplancton dependen de su nutrición y que utilizando *Chlorella* como alimento se obtiene un enriquecimiento en ácidos grasos de un 12.7 a un 18.8%. (Imada et. al., 1979; Imada, 1980; Watanabe, et. al., 1978, 1980).

En la actualidad es de gran popularidad el uso de la técnica llamada "Tratamiento Verde", que consiste en enriquecer los cultivos de Zooplancton durante 6 a 12 hrs. en *Chlorella* después de haber sido cultivados previamente con levadura *Saccharomyces cerevisiae*, antes de su utilización como alimento de larvas de peces, crustáceos y moluscos, de esta manera obtienen la fuente necesaria de ácidos grasos esenciales para su desarrollo. (Hirayama y Ogawa, 1972; Hirayama, et.al., 1973; Hirayama, et.al., 1978; Hirata, 1980; Imada, et.al., 1979; Kitajima, et.al., 1979; Teshima et.al., 1979, Watanabe, et.al., 1978 a,b; Watanabe, et.al., 1979; Watanabe, et.al., 1980). La tabla 2 resume la composición química de *Chlorella* (especies marinas), tomado de Imada et.al., 1979.

TABLA 1
 CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LOS CULTIVOS REPORTADOS
 DEL GENERO *Chlorella* (especies marinas)

Referencia	Lugar	Medio de cultivo	Especie	N µg	P at/1	N:P	Vit.	T°C	S°/oo
Parson, <i>et. al</i> , 1961	Canadá	?	<i>Chlorella sp.</i>	500	50.0	10:1	sf	20 _± 3	agua marina
SISFFA 1964, a,b	Yashima st. Japón	Yashima	<i>Chlorella saccharophila</i>	1,600 2,000	73.9 73.9	21:1 27:1	sf sf	20 _± 3 20 _± 3	a.m. a.m.
Hirayama y Ogawa, 1972	Tokyo Japón	Miguel enrique- sido (Allen- Nelson, 1910).	<i>Chlorella sp.</i>	166	11.2	14:1	sf	25 _± 1	a.m.
Ukeles, R. 1973	Milford, Conecticot, E.U.A.	?	<i>Chlorella autothrophica</i>	3,530	146.9	24:1	sf	19-23	a.m.
Hirata, 1974-1979	Kagoshima Japón	Hirata	<i>Chlorella saccharophila</i>	2,757	73.9	37:1	sf	20-25	a.m.
Hirata, 1979-1980	Kagoshima Japón	Yashima modificado	<i>Chlorella saccharophila</i>	1,666 2,000	73.5 73.5	22:1 27:1	no no	20-26 20-26	a.m. a.m.
Este trabajo	Kochi, Japón	Kochi	<i>Chlorella saccharophila</i>	3,180 3,850	250.0 343.0	13:1 11:1	no no	15.5-22.5 12.5-22.5	a.m. a.m.

Tabla 2. Composición Química de especies marinas de *Chlorella*, (Tomado de Imada, et. al.,- 1979).

Humedad (%)	75.8
Proteína Cruda (%)	12.2
Lípidos Crudos (%)	5.4
Cenizas (%)	2.3

MINERALES (peso seco)

Ca mg/g	1.20
Mg mg/g	3.43
P mg/g	25.41
Na mg/g	0.76
K mg/g	10.96
Fe ug/g	173.30
Zn ug/g	11.30
Mn ug/g	105.50
Cu ug/g	9.10

ACIDOS GRASOS (%)

14:0	4.8
16:0	20.2
16:1w7	29.5
18:0	t
18:1w9	8.6
18:2w6	4.1
18:2w3	-

20:1	-
20:3w3	2.4
20:4w6	
20:4w3	-
20:5w3	26.6
<hr/>	
ΣW_3	29.0
<hr/>	
Lípidos crudos	5.4
<hr/>	

III. MATERIALES Y METODOS

El trabajo que a continuación se describe fue llevado a cabo en las instalaciones de la Estación Experimental de Pesca de la Prefectura de Kochi, Japón.

El agua de mar utilizada fue obtenida del sistema general de agua de mar de la estación, bombeada -- desde la bahía de Uranouchi, Kochi-Ken.

La cepa de *Chlorella saccharophila* (Krüger), utilizada a lo largo de los experimentos ha sido ampliamente distribuida desde su aislamiento en la Estación Experimental Yashima (SISSFA, a b1964-1965), a todas las estaciones de pesca de Japón.

1. Cultivo estático

Antes de iniciar pruebas con el sistema Semicontinuo, se llevó a cabo un experimento preliminar con un cultivo estático, para establecer la concentración de nutrientes adecuada, establecer las diferentes etapas de crecimiento a fotoperfodo solar a la intemperie, para lo cual se registraron diariamente y por 30 días la densidad (cel./ml.) y la -- temperatura del medio de cultivo. La densidad inicial del inóculo fue de 5.5×10^6 cel./ml.

Se utilizó como recipiente de cultivo un tanque de vinil transparente de una capacidad de 1000 l. --- (500 l. de cultivo), con cinco aereadores distribuidos en la periferia, se utilizó como medio de cultivo agua de mar filtrada enriquecida con fertilizantes agrícolas (Medio de Kochi), a base de Sulfato de Amonio, Superfosfato de Calcio y Urea; sin vitaminas ni Clewatt 32 (microelementos) (Fig. 2).

2. Cultivos Semicontinuo.

Para el cultivo Continuo y Semicontinuo se han desarrollado dos tipos de aparatos automáticos: el Quemostato, que controla la densidad con la velocidad de lavado con medio nutritivo; y el Turbidostato que es un recipiente que mantiene una densidad de cultivo constante, regulada por un fotodetector que registra la densidad óptica, cuando ésta aumenta se diluye el cultivo. (Caperon, 1968; Carpenter, 1968; Droop, 1966, 1968, 1969, 1975; Ukeles, 1973).

Este tipo de sistemas son costosos y complicados porque requieren de sistemas complementarios, convirtiéndose en un sistema poco usual a pesar de que provee de una fuente constante del organismo cultivado y sobre todo no pueden utilizarse para fines de producción a gran escala.

Para este trabajo, tomando en cuenta los principios de estos dos sistemas, se realizó un cultivo semicontinuo para producción masiva, bajo condiciones ambientales y rudimentario, ya que no es un aparato automático. Consta de un recipiente de vinil transparente de 500 l. de capacidad, con cinco aereadores distribuidos en toda la periferia, alimentado con agua de mar filtrada y fertilizantes agrícolas disueltos (Medio de Kochi) mediante una manguera de 15 cm de diámetro, conectada a una bomba de 1/2 HP, diariamente es bombeado el medio nutritivo fresco, después de cosechar un volumen tal que mantenga el cultivo en una condición de equilibrio o cercana a él, reponiendo el volumen inicial, estos recipientes se cubren con láminas de polietileno, para proteger los cultivos en caso de lluvia. (Fig. 2).

2.1. Dilución o cosecha óptima.

Se utilizaron cinco recipientes de una capacidad de 500 l. con las características ya descritas en párrafos anteriores, se inocularon en ellos 500 l. de *Chlorella saccharophila* con una densidad de 35×10^6 cel/ml. (en fase exponencial); estos cultivos se sometieron a diferentes diluciones con el fin de determinar la tasa de dilución óptima expresada en volúmenes por día, particularmente 100 l/día, ----

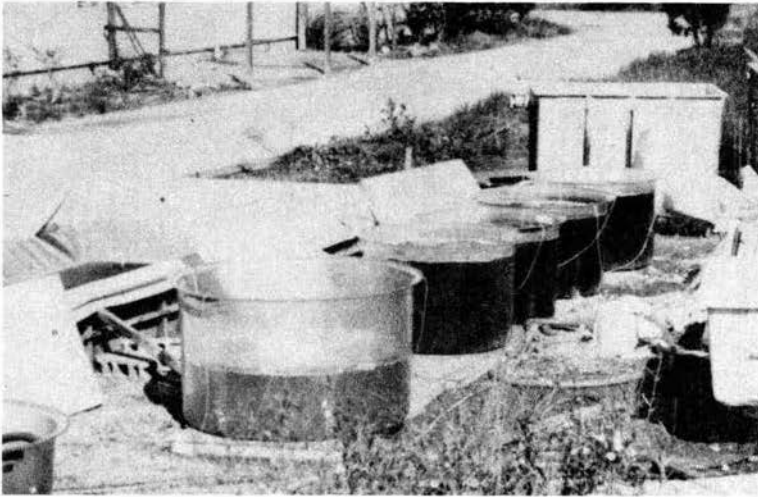


FIG. 2a. Sistema de cultivo semicontinuo de *Chlorella saccharophila* en condiciones ambientales (recipientes de vinil de 500 l).



FIG. 2b. Sistema de cultivo masivo de *Chlorella saccharophila* en condiciones ambientales (tanques de 50 ton.).

150 l/día, 200 l/día, 300 l/día, y 400 l/día, que equivalen a 20%, 30%, 40%, 60% y 80% del volumen total respectivamente, reponiendo siempre con medio nutritivo fresco de acuerdo a cada dilución el volumen inicial (500 l).

Se cosechó una vez al día por un período de 15 días, para cada dilución. La concentración de nutrientes utilizada se seleccionó de acuerdo al medio de Yashima modificado (Hirata, 1979) para producir de 30 a 40×10^6 cel/ml. Utilizando el medio de Kochi la concentración más adecuada para obtener dicha densidad resultó ser en el cultivo estático de 3180 $\mu\text{g-at/l}$ para la fuente de Nitrógeno y de 250 $\mu\text{g-at/l}$ para la fuente de Fósforo, cuya relación es de 13:1 (Nitrógeno:Fósforo).

Se monitoreó diariamente temperatura ($^{\circ}\text{C}$) con un termómetro de 50°C de 0.5°C de precisión, el pH con un potenciómetro (Corning pH meter), la densidad del medio de cultivo con un densímetro de balñes para agua de mar con la escala 1.000 a 1.030 (mod. A-419). Los datos climáticos fueron obtenidos de la Estación de Monitoreo Ambiental de la Prefectura de Kochi, Japón (Apéndice II).

2.2. Tasas de crecimiento.

La densidad de los cultivos (X) en cel/ml se deteru

minó por conteos celulares tomando alícuotas diariamente por la mañana, para ser cuantificadas en fresco al microscopio (contraste de fase Nikon), - en una cámara hemocitómetro (EDKS bright line) de 0.1 mm. de profundidad para reducir el error en el conteo se determinó el número de células promedio de cuatro conteos por muestra.

El valor de las tasas de crecimiento expresado en Divisiones celulares/día se determinó de acuerdo - al método de Guillard, (Guillard y Ryther, 1962;-- Guillard 1973) en la siguiente fórmula:

$$D = [\ln (Nt/No)] / t \ln 2$$

donde:

Nt = número de células al tiempo t

No = número de células al tiempo 0

t = tiempo transcurrido en días

$\ln 2$ = factor de duplicación

2.3 Producción máxima

Para la determinación de la producción máxima (p), se siguió el camino propuesto por Droop (1966), en el que se asume que el comportamiento de la densidad en función de la dilución es lineal, debido a que, si la dilución D es mayor que la densidad X-- en el recipiente de cultivo, entonces el cultivo--

es lavado.

Se obtuvo una regresión lineal de los datos graficados de densidad (X) contra dilución (D). La ecuación nos describe a X en función de D:

$$f(D) = X = A D + B$$

que nos permite obtener el producto $DX = P$ que tiene un máximo cuando $F(D)$ es igual a cero y describe la producción máxima para el sistema:

$$P = - A D^2 + B D$$

se realizó la prueba estadística de X^2 (con cuatro grados de libertad) para analizar las diferencias entre los resultados experimentales de producción y los calculados de acuerdo al modelo de Droop (1966).

IV. RESULTADOS

1. Cultivo estático

La tabla 3 resume las densidades celulares obtenidas en el cultivo estático, en el cual las densidades más altas fueron obtenidas utilizando la concentración 13:1 (Nitrógeno:Fósforo) esta densidad máxima en la fase exponencial fue de 40×10^6 cel/ml con una tasa de crecimiento promedio de 1.4 div. - cel/día. Fue difícil caracterizar las fases de crecimiento en este cultivo ya que la población está afectada por las variaciones de temperatura y los días nublados (Fig. 3).

2. Cultivo semicontinuo

La Tabla 4 resume las densidades diarias de la cosecha a lo largo de 15 días de observación de los cultivos sometidos a diferentes tasas de dilución, se considera que la condición de equilibrio entre la dilución y la densidad en el cultivo semicontinuo se encuentra entre las diluciones correspondientes al 30% y 40% (Fig. 4), cuyas densidades promedio fueron de 21.7×10^6 cel/ml y 14.4×10^6 cel/ml respectivamente. En estos cultivos la concentración de nutrientes es semejante a la del cultivo estático 13:1 (Nitrógeno:Fósforo).

2.1. Dilución o cosecha óptima

La dilución óptima en la cual la producción de *Chlorella saccharophila* es máxima por el método de Droop (1966) asumiendo la relación de X(cel/ml) con respecto a D (vol/día) como lineal (Fig. 5) obtenemos la regresión de mínimos cuadrados que está representada por la siguiente ecuación:

$$X = f(D) = - 97.2 \times 10^6 D + 36.9 \times 10^9$$

Construyendo ahora la función que nos permite obtener la producción del sistema multiplicando por D ambos lados de la ecuación:

$$P = 97.2 \times 10^6 D^2 + 36.9 \times 10^9 D$$

La gráfica de esta función es una parábola (Fig.6) y como D y P se encuentran en el primer cuadrante los valores de D óptima y P máxima son positivos.

2.2. Producción Máxima

Derivando a P con respecto a D e igualando a cero, seleccionamos la D óptima que hace a P máxima en particular para este sistema resulta ser $D_0 = 190$ l/día que equivale al 38% del volumen total con una P máx. = 36×10^{11} cel. de *Chlorella saccharophila* con un valor de $r = 0.9624$. La diferencia entre -

los resultados experimentales (tabla 5) y los calculados de acuerdo al modelo de Droop (1966) (tabla 6) según las pruebas estadísticas ($\chi^2 < 0.05$) no son significativas.

2.3. Tasas de crecimiento

Las tasas de crecimiento de *C. Saccharophila* expresadas en divisiones celulares/día, se encuentran resumidas en la Tabla 7. La tasa de crecimiento promedio más elevada fue obtenida con la dilución 30% y corresponde a 1.4416 div. cel./día.

3. Parámetros ambientales

3.1. Cultivo estático

Se determinaron las variaciones de temperatura en el cultivo estático a lo largo de 22 días con el objeto de analizar su influencia en la densidad de *Chlorella saccharophila* en condiciones ambientales.-- Como se puede observar en la Fig. 3, las fases de crecimiento están afectadas por las fluctuaciones de la temperatura que oscila en un rango de 12.5 a 20.5°C, que se encuentran dentro del rango que esta especie soporta a medida que la temperatura se acerca al rango óptimo (20-25°C), la población se recupera.

3.2. Cultivo semicontinuo

Analizando los parámetros ambientales ($T^{\circ}\text{C}$, pH, -- densidad del medio, y datos atmosféricos) a lo largo de los 15 días de observación como se muestran en los Apéndices 2 y 3 podemos afirmar en términos generales que su rango de fluctuación no es muy amplio (Fig. 7).

La temperatura es uno de los factores que mayormente influyen en el comportamiento de los cultivos-- en condiciones ambientales como ya se mencionó en párrafos anteriores y en estos cultivos osciló entre 15.5 a 23.5 $^{\circ}\text{C}$. Aunque estas variaciones de -- temperatura junto con los días nublados afectan a la población, ésta siempre se recuperó alcanzando su equilibrio.

Tabla 3. Densidad de *Chorella saccharophila* en cultivo estático, con la razón 13:1 (Nitrógeno:Fósforo) en el medio de cultivo y las variaciones de temperatura.

Días	Densidad (cel/mlx10 ⁶)	T°C
1	5.5	22.1
2	6.1	19.1
3	7.2	18.2
4	6.1	18.4
5	7.1	20.0
6	10.0	20.5
7	16.0	20.5
8	22.4	16.8
9	16.5	20.2
10	18.0	17.0
11	30.0	17.9
12	27.0	14.0
13	21.1	15.2
14	28.3	12.0
15	27.6	17.4
16	33.3	15.4
17	36.0	15.0
18	33.7	15.2
19	37.2	17.6
20	40.0	17.8
21	38.0	18.7
22	40.0	22.1

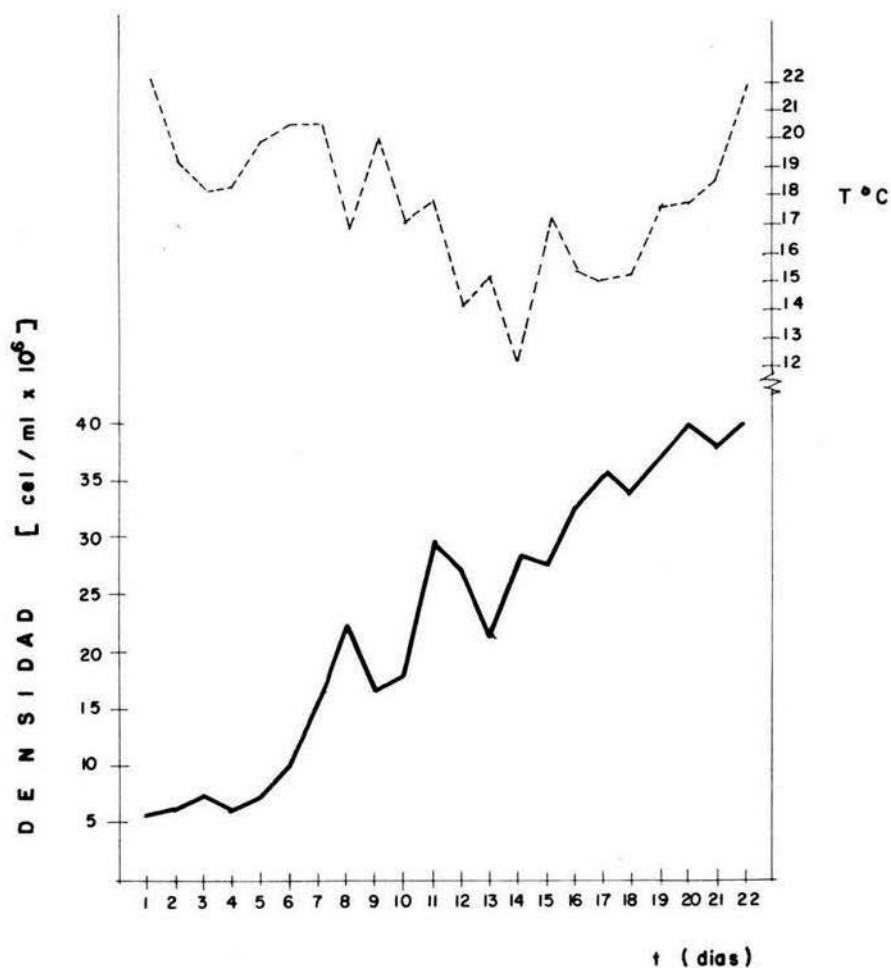


FIG. 3. Densidad de *Chlorella saccharophila* en cultivo estático con la razón 13:1 (Nitrógeno:Fósforo) en el medio de cultivo y las variaciones de temperatura.
 ----.----. temperatura ambiental
 _____.____ densidad (cel/ml).

Tabla 4. Densidades diarias de *Chlorella saccharophila* en cultivo semicontinuo a diferentes tasas de dilución.

DENSIDAD DE LA COSECHA (cel./ml. $\times 10^6$)					
Días	DILUCION				
	20%	30%	40%	60%	80%
1	18.1	17.8	17.9	15.0	5.2
2	21.6	19.0	15.8	11.0	5.5
3	26.8	22.8	18.3	12.6	3.5
4	23.0	20.3	10.8	10.2	2.3
5	20.9	12.0	10.6	7.2	1.5
6	22.8	16.0	10.3	4.6	0.7
7	25.6	19.3	15.3	4.4	0.8
8	33.3	21.6	15.3	3.2	0.3
9	36.0	28.7	16.0	2.0	0.3
10	33.7	23.6	9.7	0.7	-
11	37.2	21.4	13.4	0.2	-
12	40.0	26.9	16.8	-	-
13	38.0	24.4	10.6	-	-
14	40.0	24.6	17.3	-	-
15	37.0	27.6	18.4	-	-
\bar{X}	30.3	21.7	14.4	4.7	1.3

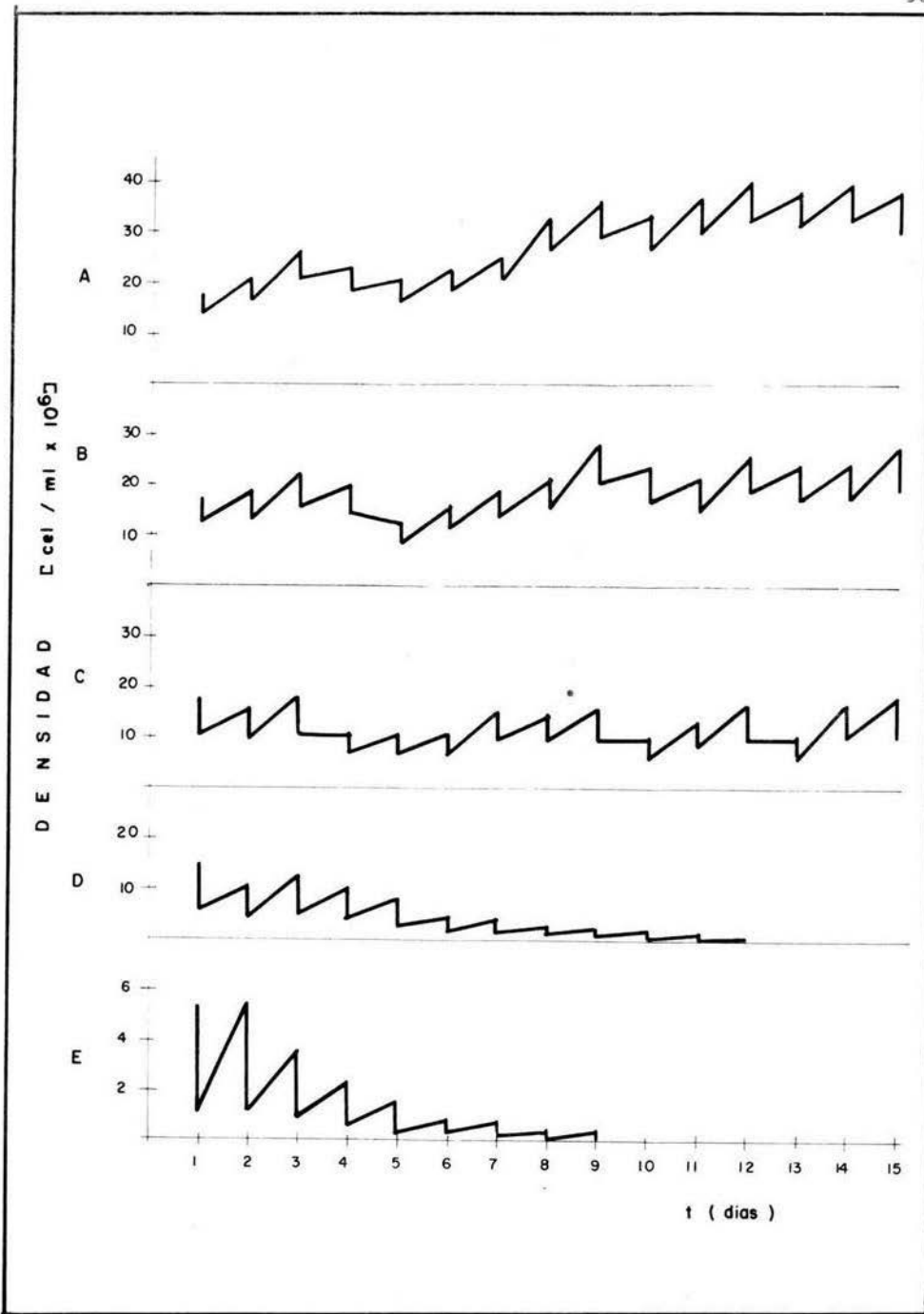


FIG. 4. Densidad de *Chlorella saccharophila* en cultivo semicontinuo. Comportamiento del cultivo a diferentes tasas de dilución.

- A.- Tasa de dilución 20%
- B.- Tasa de dilución 30%
- C.- Tasa de dilución 40%
- D.- Tasa de dilución 60%
- E.- Tasa de dilución 80%

Tabla 5. Producción de *Chlorella saccharophila* en--- cultivo semicontinuo de acuerdo a la densidad en función de la tasa de dilución.

Densidad de cosecha (cel/mlx10 ⁶)	Límites de confianza al 95% (cel/mlx10 ⁶)		tasa de dilución 1/día %		Producción (cel x 10 ¹¹)
30.3	27.2	34.7	100	20	30.3
21.7	19.4	24.0	150	30	32.6
14.4	12.8	16.0	200	40	28.8
4.7	2.1	7.3	300	60	14.1
1.3	0.3	2.3	400	80	5.2

Tabla 6. Producción de *Chlorella saccharophila* de -- acuerdo a los valores calculados de densidad en función de la dilución por el método de Droop (1966).

Densidad (cel/mlx10 ⁶)	Tasa de dilución (1/día)	%	Producción (celx10 ¹¹)
32.0	50	10	16.0
27.2	100	20	27.2
22.3	150	30	33.5
17.5	200	40	35.0
12.6	250	50	31.6
7.8	300	60	23.3
2.9	350	70	10.3

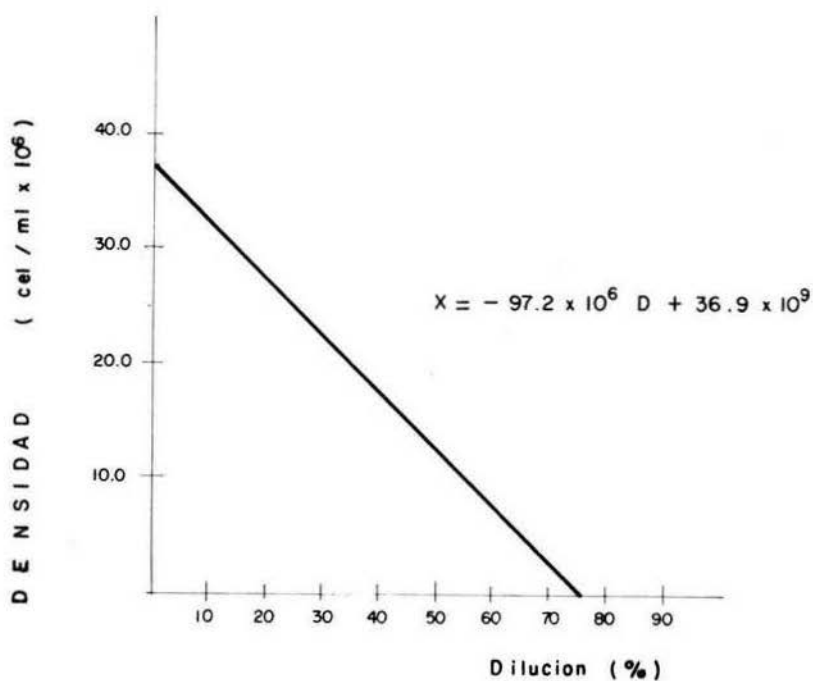


FIG. 5. Modelo de Droop (1966) que asume la distribución de los datos en forma lineal, de la densidad (X) de *Chlorella saccharophila* en función de la tasa de dilución (D).

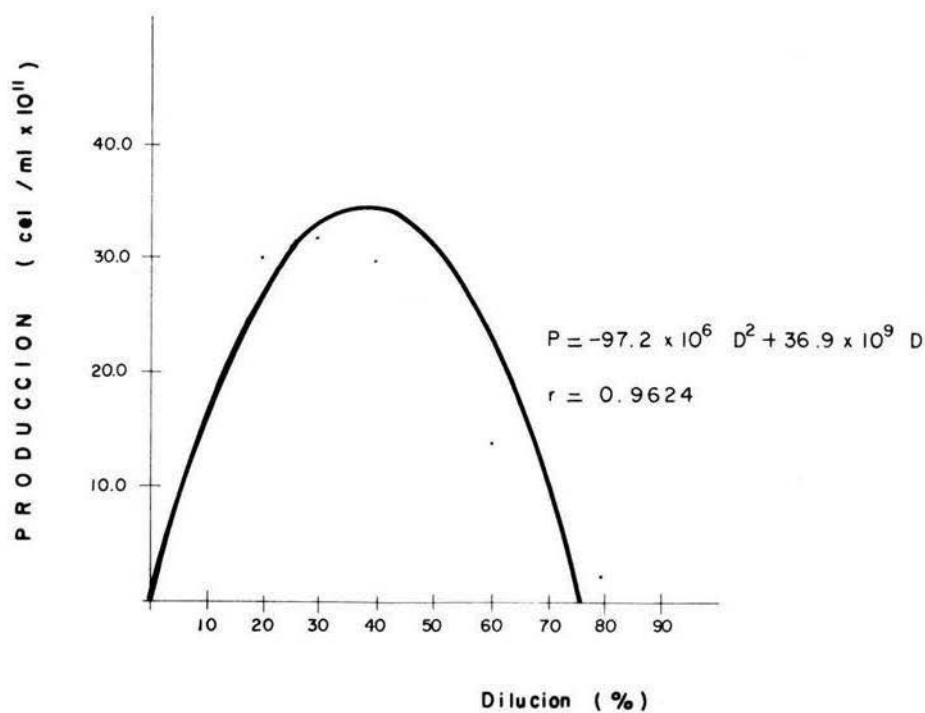


FIG. 6. Modelo de Producción de Droop, para *Chlorella saccharophila* basado en los datos de la regresión lineal.

Tabla 7. Tasas de crecimiento de *Chlorella saccharophila* en cultivo semicontinuo a diferentes tasas de dilución con la razón 13:1- (Nitrógeno:Fósforo) en el medio de cultivo.

TASA DE CRECIMIENTO (Div. Cel./dfa)			
DILUCION			
20%	30%	40%	días
1.1714	1.1646	1.1669	1
1.5308	1.4755	1.3803	2
1.5441	1.5321	1.5195	3
1.3756	1.3892	1.1810	4
1.3987	1.1908	1.4914	5
1.4840	1.6097	1.4252	6
1.4962	1.5404	1.6875	7
1.5598	1.4976	1.4427	8
1.4748	1.5762	1.4664	9
1.4116	1.3587	1.1823	10
1.4833	1.3981	1.6479	11
1.4717	1.5505	1.5684	12
1.3156	1.4000	1.2072	13
1.4631	1.4453	1.1742	14
1.4123	1.4958	1.4739	15
\bar{X} 1.4395	1.4416	1.4009	

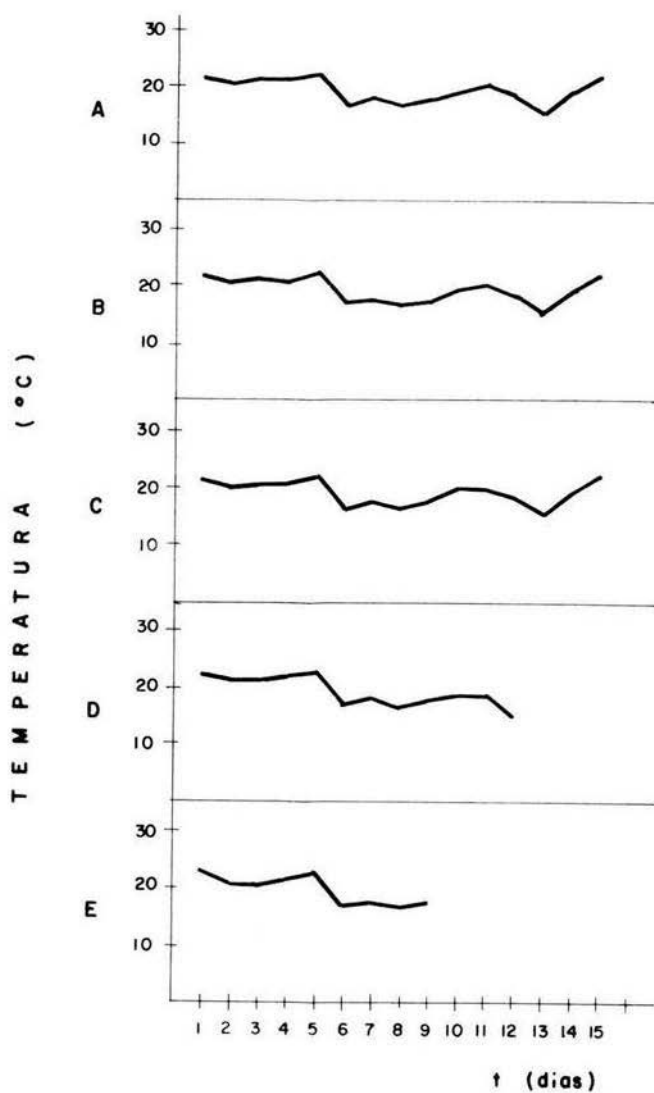


FIG. 7. Variación de la temperatura ($T^{\circ}\text{C}$) del cultivo semicontinuo de *Chlorella saccharophila* - a diferentes tasas de dilución.

- A.- Tasa de dilución 20%
- B.- Tasa de dilución 30%
- C.- Tasa de dilución 40%
- D.- Tasa de dilución 60%
- E.- Tasa de dilución 80%

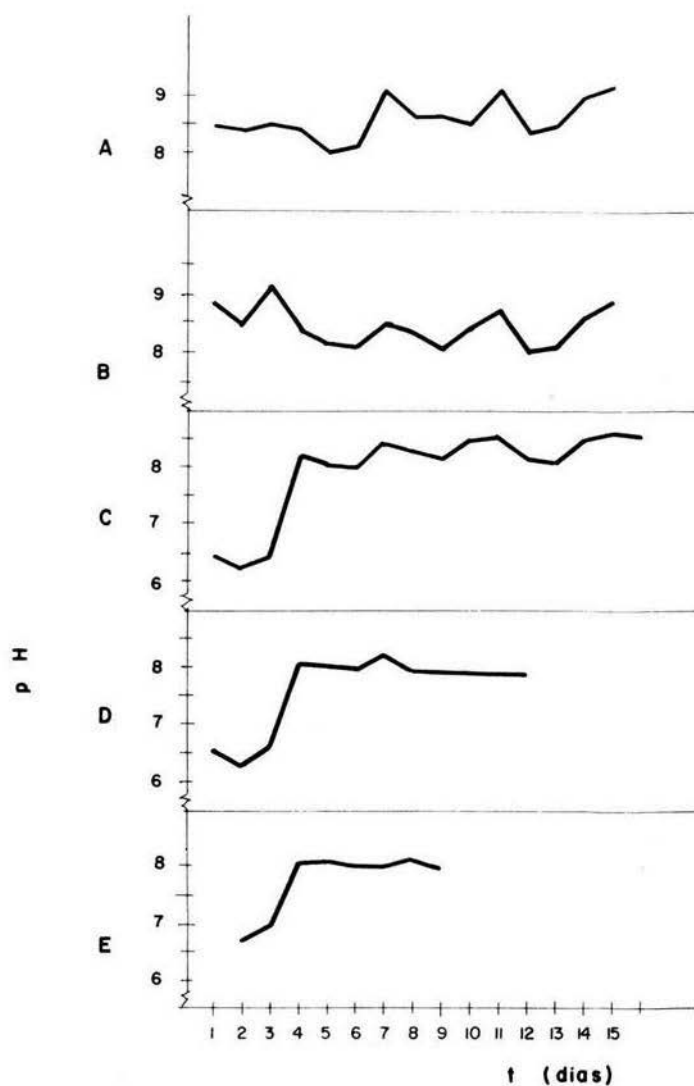


FIG. 8. Variación del pH del cultivo semicontinuo -- de *Chlorella saccharophila* a diferentes tasas de dilución.

- A.- Tasa de dilución 20%
- B.- Tasa de dilución 30%
- C.- Tasa de dilución 40%
- D.- Tasa de dilución 60%
- E.- Tasa de dilución 80%

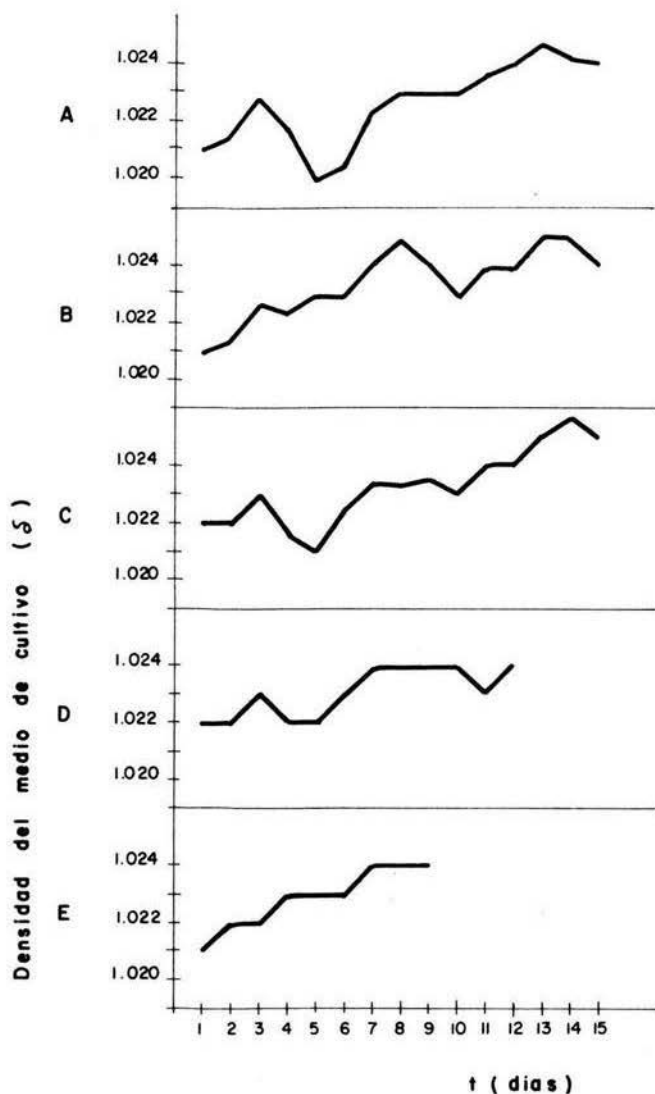


FIG. 9. Variación de la densidad del medio de *C. --- saccharophila* en cultivo semicontinuo a diferentes tasas de dilución.

- A.- Tasa de dilución 20%
- B.- Tasa de dilución 30%
- C.- Tasa de dilución 40%
- D.- Tasa de dilución 60%
- E.- Tasa de dilución 80%

V. DISCUSION

Producción del Sistema.

La producción del sistema masivo a largo plazo presenta dos puntos importantes; la cantidad de algas producidas y la constancia o variación de esa producción. En este trabajo el cálculo de la tasa óptima de dilución en la cual la producción es máxima, permitió el establecimiento del sistema de cultivo en forma semicontinua en el cual las células están suspendidas en un volumen cercanamente constante con la tendencia al equilibrio dinámico establecido por la remoción adecuada de cultivo y adición del medio nutritivo por unidad de tiempo.

Analizando las diferentes tasas de dilución obtenidas experimentalmente la tasa de 150 l/día que corresponde al 30% está cercana a la óptima con una densidad promedio de la cosecha diaria de 21.7×10^6 cel/ml que se traduce a una producción de 21.7×10^9 cel. de *C. saccharophila* por litro de cosecha por -- día y una producción máxima de 32.6×10^{11} células.- De acuerdo al modelo de Droop (1966) la tasa de dilución óptima corresponde a 190 l/día de cosecha-- que equivale al 38% en el cual la producción máxima por día es de 36.0×10^{11} células.

La diferencia entre los resultados experimentales y los calculados no es estadísticamente significativa ($\chi^2 < 0.05$), pero se atribuyen a que los re--sultados experimentales están afectados por las --

condiciones del cultivo (temperatura ambiente, --- días nublados, etc.). Es posible que si la temperatura se mantiene constante podamos obtener una-- mayor producción y el establecimiento del sistema-- en forma continua.

Uno de los objetivos del trabajo fue el de reali-- zar el cultivo bajo condiciones ambientales y en-- forma rudimentaria. A pesar de las fluctuaciones-- de temperatura este tipo de sistema es conveniente para proveer alimento en forma masiva con fines -- acuaculturales.

Los resultados de producción obtenidos se comparan favorablemente con otros trabajos en los cuales se ha utilizado el método de Droop en los que se han-- obtenido tasas de dilución entre el 30% y el 40%-- (Droop, 1975; Cáceres, 1979; Aguirre, 1981; Laing-- y Helm, 1981). Aunque las condiciones de estos -- cultivos son diferentes pues se trata de sistemas-- controlados y los volúmenes de cosecha son mucho-- menores.

Los sistemas automáticos (quemostatos o turbidostatos)- que se han venido utilizando para desarrollar culti-- vos continuos o semicontinuos de algas son funcio-- nales cuando se utilizan para fines de bioensayo (fisio-- logía, bioquímica, fotoperíodo, etc.) de las micro_

algas pues aunque su diseño es complicado ya que-- requieren de aparatos complementarios (unidades de esterilización, dosificadores, fotoceldas, distribuidores, fuente liminosa adecuada, etc.) que los hacen sofisticados se justifican cuando el sistema tiene que mantenerse libre de contaminantes.

La utilización de este tipo de sistemas para fines acuaculturales resulta impráctica por los factores anteriormente señalados y porque los volúmenes que se producen son muy bajos.

Davis y Ukeles (1961) estiman que para un cultivo estándar de lamelibranquios se requiere de 20 a 60 l./día de cultivos relativamente densos de microalgas. En este trabajo el sistema no sólo puede producir esta cantidad fácilmente, sino más del doble en un solo recipiente de cultivo. Los mismos autores señalan que para una planta comercial de producción de semilla de bivalvos se requiere de 389 a 3,890 l/día de microalgas, con este tipo de sistema se puede conseguir esa producción aumentando el número de recipientes de cultivo de una capacidad de 500 l. a 1,000 l. o bien un solo recipiente de una capacidad de 5 a 50 ton. del que se cosecharía de 1,900 a 19,000 l/día respectivamente.

Hirayama y Ogawa (1972) calculan que los rotíferos

alimentados con *Chlorella* requieren de un promedio de 28.8×10^4 cel/ind./día; para producir 30 rotíferos/ml. se requiere de 8.6×10^6 cel/ml. En este sistema se puede obtener cosechando el 30% de un recipiente de cultivo de 500 l. 21.7×10^6 cel/ml de *Chlorella saccharophila* suficiente para producir más de 30 rotíferos por mililitro.

VI. CONCLUSIONES

1. Este tipo de sistema es simple, económico y de fácil mantenimiento.
2. Puede utilizarse en regiones costeras de nuestro país pues las fluctuaciones de temperatura no son tan drásticas que puedan afectar el cultivo.
3. El modelo de Droop (1966) puede ser aplicado a trabajos en condiciones rudimentarias.
4. Este modelo ofrece la alternativa de obtener los valores de cosecha óptima y producción máxima y su exactitud depende de la precisión de las mediciones de densidad y dilución.
5. El cultivo semicontinuo de *Chlorella saccharophila* realizado es un ejemplo de sistema de producción a gran escala que produce un promedio de 32.6×10^{11} cel./día para proveer alimento con fines comerciales para organismos que se alimentan mediante filtración.
6. La utilización de fertilizantes agrícolas en este trabajo muestra las perspectivas de su utilización para cultivos de microalgas en nuestro país aunado a la determinación de los niveles

óptimos de luz, temperatura, fotoperíodo, concentración de nutrientes y la composición bioquímica del alga, sustitución de la luz artificial por luz solar, diseño de instalaciones de cultivo mayores, usandose materiales no tóxicos, analizando siempre la relación entre los puntos anteriores, la producción y los costos de ésta.

Apéndice I.- Densidades diarias de *Chlorella*
saccharophila en cultivo semi-
continuo y las variaciones de
temperatura, pH y densidad --
del medio de cultivo.

A.- Tasa de dilución 20%

DIA	COSECHA	DENSIDAD (cel./ml.x10 ⁶)			δ medio
		AL DILUIR	T°C	pH	
1	18.1	14.48	21.4	8.60	1.0210
2	21.6	17.28	21.0	8.50	1.0215
3	26.8	21.44	21.7	8.60	1.0228
4	23.0	18.40	21.8	8.50	1.0218
5	20.9	16.72	22.6	8.13	1.0195
6	22.8	18.24	16.9	8.20	1.0205
7	25.6	20.48	18.1	9.20	1.0224
8	33.3	26.64	17.9	8.70	1.0230
9	36.0	28.80	18.1	8.70	1.0230
10	33.7	26.96	19.4	8.61	1.0230
11	37.2	29.76	20.5	9.20	1.0236
12	40.0	32.00	18.7	8.48	1.0240
13	38.0	30.40	15.6	8.50	1.0247
14	40.0	32.00	19.2	9.02	1.0243
15	37.0	29.6	22.1	9.15	1.0241
\bar{X}	30.3	24.21	19.7	8.67	1.0226

B.- Tasa de dilución 30%

DIA	DENSIDAD (cel./ml.x10 ⁶)				
	COSECHA	AL DILUIR	T°C	pH	δ medio
1	17.8	12.46	21.6	8.92	1.0210
2	19.0	13.30	20.9	8.50	1.0215
3	22.8	15.96	21.6	9.18	1.0228
4	20.3	14.21	21.6	8.44	1.0224
5	12.0	8.40	22.7	8.15	1.0230
6	16.0	11.20	17.1	8.15	1.0230
7	19.3	13.51	17.9	8.58	1.0240
8	21.6	15.12	17.2	8.40	1.0250
9	28.7	20.09	17.9	8.32	1.0240
10	23.6	16.52	19.8	8.53	1.0240
11	21.4	14.98	20.2	8.88	1.0240
12	26.9	18.83	18.6	8.31	1.0240
13	24.4	17.08	15.5	8.18	1.0250
14	24.6	17.22	19.1	8.71	1.0250
15	27.6	19.32	22.1	8.95	1.0240
\bar{X}	21.7	15.21	19.6	8.54	1.0234

C.- Tasa de dilución 40%

DIA	DENSIDAD (cel./ml.x10 ⁶)				S medio
	COSECHA	AL DILUIR	T°C	pH	
1	17.9	10.74	22.0	6.52	1.0220
2	15.8	9.48	21.1	6.30	1.0220
3	18.3	10.98	21.8	6.50	1.0216
4	10.8	6.48	21.8	8.38	1.0216
5	10.6	6.36	22.7	8.15	1.0210
6	10.3	6.18	16.6	8.14	1.0225
7	15.3	9.18	18.0	8.51	1.0234
8	15.3	9.18	17.6	8.40	1.0234
9	16.0	9.60	18.3	8.25	1.0235
10	9.7	5.82	20.3	8.52	1.0230
11	13.4	8.04	20.0	8.68	1.0240
12	16.8	10.08	18.9	8.29	1.0242
13	10.6	6.36	15.8	8.22	1.0250
14	17.3	10.38	19.3	8.62	1.0249
15	18.4	11.04	22.0	8.70	1.0240
\bar{X}	14.4	8.66	19.7	8.01	1.0231

D.- Tasa de dilución 60%

DIA	COSECHA	DENSIDAD (cel./ml.x10 ⁶)			S medio
		AL DILUIR	T°C	pH	
1	15.0	6.0	22.8	6.64	1.0220
2	11.0	4.4	21.8	6.36	1.0220
3	12.6	5.0	21.7	6.70	1.0230
4	10.2	4.1	22.0	8.20	1.0220
5	7.2	2.9	23.0	8.18	1.0230
6	4.6	1.9	17.6	8.12	1.0230
7	4.4	1.8	18.4	8.07	1.0240
8	3.2	1.3	17.4	8.11	1.0240
9	2.0	0.8	18.4	8.10	1.0240
10	0.7	0.3	19.0	8.05	1.0240
11	0.2	0.0	19.0	8.05	1.0230
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
\bar{X}	4.7	1.9			

(-) Dilución de lavado.

E.- Tasa de dilución 80%

DIA	DENSIDAD (cel./ml.x10 ⁶)		T°C	pH	S medio
	COSECHA	AL DILUIR			
1	5.25	1.0	23.5	6.72	1.021
2	5.5	1.1	21.8	6.65	1.022
3	3.5	0.7	21.4	6.90	1.022
4	2.3	0.5	22.4	8.10	1.023
5	1.5	0.3	23.1	8.14	1.023
6	0.8	0.2	17.2	8.09	1.023
7	0.3	0.06	17.4	8.16	1.024
8	0.3	0.06	18.1	8.05	1.024
9	0.0	0.0	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
\bar{X}	1.3	0.27			

(-) Dilución de lavado.

Apéndice II.- Datos climáticos de la Prefectura
de Kochi, Japón, registrados en--
el mes de octubre de 1981.

DIA	PRESION ATMOSFERICA (promedio por día)		TEMPERATURA AMBIENTAL		
	OBSERVATO RIO (mb)	N.DEL MAR (mb)	T°C/ día	T°C Máx.	T°C Mín.
5	012.0	014.1	18.5	21.0	16.7
6	011.3	013.3	21.6	27.1	16.7
7	012.3	014.3	20.4	22.0	19.0
8	008.5	010.5	22.0	24.2	19.8
9	006.4	008.4	20.6	24.3	15.1
10	013.4	015.5	16.5	22.7	10.6
11	018.8	020.9	16.6	23.1	10.1
12	021.5	023.5	17.6	24.9	12.9
13	018.2	020.3	17.1	21.1	13.9
14	013.5	015.5	18.9	24.0	13.2
15	015.7	017.8	17.5	23.2	12.3
16	014.6	016.7	16.8	21.8	13.2
17	016.0	018.0	17.4	24.5	10.9
18	014.7	016.8	20.1	26.4	13.8
19	014.8	016.9	21.3	27.4	15.9
20	015.6	017.7	20.1	25.0	15.3

HUMEDAD RELATIVA			LUZ		
PRESION DE VA-- POR (mb)	HUMEDAD %	HUMEDAD % (mín.)	NUBOCIDAD (1-10 %)	HR/ DIA	INTEN- SIDAD (MJ/m ²)
19.0	89	76	9.8	-	2.4
18.7	73	44	5.8	6.4	16.0
20.0	83	77	10.0	-	5.2
24.9	95	88	10.0	-	2.5
16.7	64	48	10.0	0.1	5.1
11.6	63	37	2.5	9.8	18.9
11.4	62	23	8.3	8.3	15.5
12.4	64	31	5.0	7.4	15.4
16.1	85	63	9.5	0.1	3.7
12.4	56	27	6.3	9.1	18.4
12.4	64	30	5.3	10.0	17.8
13.8	71	41	6.8	2.2	6.6
12.7	66	35	4.8	10.2	17.8
15.3	66	46	5.8	9.4	17.2
15.8	64	42	0.3	9.2	15.3
14.7	62	40	3.8	9.0	15.6

PROMEDIO	VIENTO		PRECIPITACION		
	V=m/seg	m/10 mfn.	Dirección	(mm.) Máx.	(mm.) Mfn.
0.9	2.7	W	7.5	0.5	0.5
1.5	3.8	S	-	-	-
0.8	2.4	W	6.0	-	-
0.7	3.3	W S W	13.5	-	-
2.6	5.5	W S W	-	-	-
1.7	4.6	E	33.5	1.5	4.0
1.7	3.4	W	1.5	-	-
1.7	3.5	S	-	1.0	5.0
1.5	2.8	W S W	-	-	-
2.1	5.9	N N E	-	-	-
1.4	4.2	S S W	35.0	7.0	9.5
1.5	3.0	S S W	0.0	1.0	1.5
1.6	3.5	S S E	25.5	-	-
1.6	3.3	E S E	-	-	-
1.8	5.1	N N E	-	-	-
1.1	4.2	W	-	-	-

TEMPERATURA		HUMEDAD	
T°C Máx.	T°C Mfn.	Precipitación (mm)	%
	(9 hr-9 hr)		
27.8	17.3	6.0	68
24.5	14.5	0.0	70
24.3	12.0	22.0	74
22.5	16.7	19.0	80
27.1	16.7	0.0	75
22.0	19.0	-	71
25.2	19.8	-	68
23.5	20.9	-	67
22.7	10.6	25.5	72
23.1	10.1	-	67
24.9	12.9	0.0	66
21.4	13.9	0.0	68
24.0	16.2	-	67
23.2	12.3	-	67
21.8	14.9	-	66
24.5	10.9	-	65

LITERATURA CITADA.

- Aguirre, M.A. 1981. Estudios con un cultivo semicontinuo de *Tetraselmis suecica* (Kylin, 1935); Nutrientes, Vitaminas, Desinfección del medio con U.V. y producción del sistema a largo plazo. --- Tesis: Esc. Sup. de Ciencias Marinas, U.A. B.C.- 62 pp.
- Butlin, K.R. 1958. Some examples of continuous culture. Continuous cultivation of Microorganisms A symposium, Publ. House Czechoslov. Acad. Sc., Prague, p. 174.
- Burmaster, D.E. 1979 a. The unsteady continuous culture of phosphate limited *Monochrysis lutheri* Droop: experimental and theoretical analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 39(2): 167-186.
- Burmaster, D.E. and S.W. Chisholm. 1979 b. A comparison of two methods for measuring phosphate uptake by *Monochrysis lutheri* Droop grown in continuous culture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 39(2): 187-202.
- Cáceres M., C.J. 1979. Sistema de cultivo de *Monochrysis lutheri* bajo condiciones rudimentarias y el desarrollo de un nuevo método de aproximación a la ecuación de Monod (1950). Tesis: Esc. Sup. de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada Baja Califor-

nia, Méx. 49 pp.

- Carlucci, A.F. and Bowes P.M. 1970. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. J. Phycol. 6(4) 393-400.
- Caperon, J. 1967. Population growth in microorganisms limited by food supply. Ecology. 48: 715-722.
- Caperon, J. 1968. Population growth response of *Isochrysis galbana* to nitrate variation at limiting concentrations. Ecology. 49:866-872.
- Carpenter, E.J. 1968. A simple inexpensive algal chemostat. Limnol. Oceanogr. 13:720-721.
- Davis, H.C. and Ukeles. 1961. Mass Culture of phytoplankton as foods for metazoans. Science. 134:562-564.
- Droop, M.R. 1966. Vitamin B₁₂ and marine ecology. III. An experimental with a chemostat. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 46:659-671.
- Droop, M.R. 1968. Vitamin B₁₂ and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 48: 689-733.

- Droop, M.R. 1969. Algae. Methods in microbiology vol. 3 B. London; Academic Press, p. 269-313.
- Droop, M.R. 1970. Vitamin B₁₂ and marine ecology. V. Continuous culture as an approach to nutritional kinetics. Mlgolander wiissmeeresunters, 20:629-636.
- Droop, M.R. 1974. The nutrient status of algal cells in Continuous culture. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 54:825-855.
- Droop, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. In: G Persoone and Jasper (Eds), Proc. 10 th Europ. Symp. Mar. Biol. Ostend, Bel. sep. 1:17-23., 1975. Universa Press, Wetteren, p. 71-93.
- Dunstand, W.M. and Monzel D.W. 1971. Continuous culture of natural populations of phytoplankton in dilute treated sewage effluent. limnol. Oceanogr., 16:623-632.
- Endo, K. 1878. Cultivation of live food organisms for fish rearing. Yoshoku, 170:86-88.
- Fencl, Z. 1966. Theoretical analysis of continuous culture systems In: Málek and Fencl (Eds), Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms. Academic Press, New York and London. p. 69-102.

- Flassch, J.P. Salaun, G. and Normant Y. 1975. Viability of a phytoflagellate after freezing In: 6 th annual meeting world mariculture society, p. 423-428.
- Foot, B. and M. Novakova. 1969. A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh waters species. pp. 10-74. In: Foot, B. (Ed). Studies in phycology. Academia Prague.
- Fukusho, K, Hara, O., and Yoshino, J. 1976. Mass production of rotifer fed *Chlorella* and Yeast in the 40 t. tank. Aquiculture 24:(3), 96-101.
- Furukawa, I. 1972. Seed production of the prawn fed on marine yeast. Yoshoku, 9 (9), 38-42.
- Furukawa, I and Hidaka, K. 1973. Technical problems encountered in the mass culture of the rotifer using marine yeast as food organisms. Inf. Bull. Planktol. Japan, 20:61-71.
- Guillard, R.R.L. 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of marine invertebrates animals, New York; Plenum, 409 p.

- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates, In: J.R. Stein (Ed) Handbook of phycological methods. Culture methods and Growth measurements. Cambridge Univ. Press. pp. 289-311.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt. and *Detonula confervacea* Cleve. Gran Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Hirata, H. 1972. The growth of *Chlorella* cells in culture. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 21:(1), 15-21.
- Hirata, H. 1975. Preliminary report on the photoperiodic acclimation for growth of *Chlorella* cells in synchronized culture. Mem. Fac. Fish. Kagoshima, Univ. 24: 1-6.
- Hirata, H. 1977a. Zooplankton cultivation and prawn seed production in an artificial ecosystem. Helgolander wiss. meeresunters. 30:230-242.
- Hirata, H. 1974. An attempt to apply and experimental microcosms for the mass culture of marine rotifer, *Brachionus plicatilis*, O.F. Muller, Mem. Fac. Fish. Kagoshima, Univ. 23, 163-172.

- Hirata, H. 1977 b. Homeostatic problems of artificial ecosystem in Aquaculture. Proc. Japan-Soviet Joint. Symp. Aquacul. Tokyo-Sapporo, 5:49-64.
- Hirata, I. 1978. Species interactions between bacteria and rotifer in culture. M.S. Thesis, Fac. Fish. Kagoshima, Univ.
- Hirata, H. 1980. Culture Methods of the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*, Min. Rev. data file fish. res. 1,27-46.
- Hirata, H. and Mori, Y. 1967. Mass culture of the marine rotifer fed bakers yeast. Saibai-gyogyo, S. 5:36-40.
- Hirata, H., and Yamasaki. 1980. Steady state of zooplankton community in a feed - back culture system. Proc. VI Ser. Ecol. Symp; Microcosms in Ecol. Rest. Georgia (in print).
- Hirata, H. Kadowaki, S. Hirata, I. and Mae, K. 1979. Marine Zooplankton culture in a feedback system. Europ. Maricul. Soc. Special Publ. 4, 377-388.

- Hirayama, K., and Ogawa, S. 1972. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture - I,. Filter feeding of rotifer. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 38:1207-1214.
- Hirayama, K., Watanabe, K., and Kusano, T., 1973. Fundamental studies on physiology of rotifer for mass culture - III. Influence of phytoplankton density on population growth. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 39 (11) 1123-1127.
- Hirayama, K., Takagi, K., Kimura, H., 1978. Nutritional effect of eigh species of marine phyto plankton on population growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, Bull. Japan, Soc. Sci. Fish. 45 (1), 11-16.
- Hirokawa. 1975. In: Hirata, H. 1975. Preliminary report on the photoperiodic acclimation for growth of *Chlorella* cells in synchronized culture Mem. Fac. Fish. Kagoshima, Univ. 24: 1-6.
- Holm-Hansen, O. 1973. Preservation by freezing and frezidrying Hand book of phycological Methods. London; Cambridge U. Press, 448 p.
- Howell, J.A. Tsuchiya, H.M., Fredricson, A.G., 1966. Continuous Symcrhronuous culture of photosynthetic micro-organisms. Nature. 214: 582-584.

- Imada, O., Kageyama, Y., Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., Yone, Y. 1979. Development of a new yeast as a culture medium for living feeds used in the production of fish seed. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 45(8): 955-959.
- Imada, O. 1980. The yeast supplemented with fish liver oil as feeds for rotifer. Yoshoku, 17(5): 36-42.
- Ioku, S., Nakazono, T., Kasedo, T., Kadowaki, S. 1980. Rearing examinations on the scallop, *Chlamys nobililis*, fed a mixture diet of marine species of *Chlorella* and Yeast. Mini Rev. Data File Fish. Res., 1:117-126.
- Kawano, T. 1968. On the culture of marine yeast, *Zygosacharomyces marinus* as food for the larvae of marine fish. Aquiculture (Suisan Zoshoku), 15(4). 59-65.
- Kawano, T. 1978. Marine yeast for feeding of aquatic organisms with a description of some useful species. Tech. Rept. Microbiol project. Kuwait Inst. Sc. Res., 15, 1-7.
- Kessler, E. 1976. Comparative physiology, biochemistry and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). Plant. Syst. Evol. 125:129-238.

- Kessler, E. 1978. Phycological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella* XII. Starch hydrolysis and a key for the identification of 13 species. Arch. Microbiol. 119:13-16.
- Kinne, O. 1976. Marine Ecology, Vol. III Cultivation part. 1 and part. 2 Wiley, London.
- Kitajima, C.; Arakawa, T.; Oowa, F.; Fujita, S.; Imada, O.; Watanabe, T.; Yone, Y. 1980a. Dietary value for red sea bream larvae of rotifer *Brachionus plicatilis*, cultured with a new type of yeast. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 46(I), 43-46.
- Kitajima, C.; Yoshida, M.; Watanabe, T. 1980b. Dietary value for ayu *Plecoglossus altivelis* of rotifer *Brachionus plicatilis* cultured with bakers yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 46(1), 47-50.
- Kubitscheck, H.E. 1970. Introduction to research with continuous cultures. Prentice-Hall, Inc., Englewood cliffs, N.J. 195 pp.
- Laing, I. and M.M. Helm. 1981. Factors affecting the semicontinuous production of *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. in 200 l. vessels Aquaculture. 22:137-148.

- Lee, J. J.; Reidy, J. and Kessler, E. 1982. Symbiotic *Chlorella* species from larger Foraminifera. Botánica Marina. Vol. XXV, pp. 171-176.
- Lorenzen, H. and Ruppel, H.G. 1960. Versuche zur gliederung des Entwicklungsverlaufs der *Chlorella* Zelle. Planta, 54, 394-403.
- Mae, K. 1979. Recycling of marine *Chlorella* by biodeposits of *Brachionus plicatilis* in a feedback culture system. Ms. Thesis Fac. Kagoshima, Univ.
- Mochizuki, T. Shimizu, H.; Tanaka, M.; Endo, K. 1978. Studies of the growth of zooplankton-II. Continuous culture of *Brachionus plicatilis*, Aquaculture (Suisanzoshoku). 25, 138-141.
- Monod, J. 1942. Recherches sur la croissance de cultures bactériennes Hermann et. Cie., Paris. 210 pp.
- Monod, J. 1950. La technique de culture continue: Theorie et applications. Ann. Inst. Pasteur. Paris., 79:390-410.
- Myers, J. 1946. Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. III. Influence of light intensity on cellular characteristics of *Chlorella* J. Gen. Physiol. 29:429-440.

- Nishijima, T., Shiozaki, R. Hata, Y. 1979. Production of vitamin B₁₂, Thiamine, and Biotin by Freshwater phytoplankton. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 45 (2) 199-204.
- N6vick, A. and Szilard, L. 1950a. Description of the Chemostat. Science. 112-715.
- N6vick, A., and Szilard, L. 1950b. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 36:708.
- Osawa, T. and Kawano, T. 1971. Diagnosis of marine yeast, *Zygosaccharophila marinus*, and its culture methods. Kayo-Kaihatsu, 4(1), 1-8.
- Parsons, T.R. and Strickland, J.D.H. 1961. Discussions of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equation for ascertaining chlorophylls and carotenoids. J. Mar. Res. 21, 155-163.
- Rascio, N., and Csadoro, G. 1981. Ultrastructural characterization of marine *Chlorella*. V *Chlorella marina*. Botánica Marina. Vol. XXV, pp. 291-296.
- Retovsky, R. 1966. Continuous cultivation of algae. Theoretical and methodological basis of continuous cultures of microorganisms. London; Academic Press p 443-455.

- SISFFA. 1964a. Cultivation of live food organisms in the Yashima station. I. Fertilizers for marine Phytoplankton culture. Saibai-gyogyo news. 3,4: 1-8.
- SISFFA, 1964b. Cultivation of live food organisms in the Yashima station. II. Collections of single-celled green algae and its culture. Saibai-gyogyo news. 3,4: 9-18.
- SISFFA, 1965. Cultivation of live food organisms in the Yashima station. III. Mass culture of *Brachionus* and *Tigriopus*. Saibai-gyogyo news. 4,4: 1-6.
- Stein, J.R. 1979. Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge. Univ. Press. pp. 446.
- Sorgeloos, P. 1974. The influence of algal food preparation on its nutritional efficiency for *Artemia salina*, L. larvae. Thalassia jugoslavica, 10 (1/2): 313-320.
- Teshima, S. Kanasawa, A., Kamezaki, N., Hirata, H. 1979. Sterols of the rotifer. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 45(12), 1495-1501.

- Tsukada, O., Kawahara, T., Takeda, H., 1974. Good growth of *Chlorella saccharophila*, on the basis of dry weight under NaCl hypertonic condition. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 40:1007-1013.
- Turpin, D., Harrison, D. 1979. Limiting nutrient patchiness its role in phytoplankton ecology. J. esp. mar. Biol. Ecol. Vol. 39,151-166.
- Ueki, N., 1974. On the mass culture of mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis*, as food organisms. Rept. Okayama, Fish. Exp. St. 254-262.
- Ukeles, R. 1973. Continuous culture - a method for the production of unicelular algal foods. In: J.R. Stein (ed). Handbook of phycological methods. Culture methods and Measurements. Cambridge Univ. Press. pp. 233-254.
- Ukeles, R. 1976. Unicellular plants. In: O. Kinne (Ed)., Marine Ecology. vol. III., Cultivation, part. 1. Wiley London. pp. 367-466.
- Watanabe, T. 1978. Nutritive value of plankton for fish larvae in the view point of lipids. Fish. Ser. 22, pp. 93-III, Koseisha-Koseikaku, (Tokyo).

- Watanabe, T., Arakawa, T., Kitajima, K., Fukusho, K., Fujita, S., 1978. Nutritional quality of living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 44 (11), 1223-1227.
- Watanabe, T., Oowa F., Kitajima, C, Fujita, S, Yone, Y. 1979. Relationship the dietary of rotifer *Brachionus plicatilis* and their content of W_3 highly unsaturated fatty acids. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 45 (7) 883-889.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C. Fujita, S. 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia salina*, and their content of W_3 highly unsaturated fatty acids. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 46 (1), 35-41.