

**ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA MICROALGA
Ankistrodesmus gracilis (Bold & Wynne, 1985) (CHLOROPHYTA), CON
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN LABORATORIO**

LUIS CARLOS CORAL IBARRA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO- COLOMBIA
2006**

**ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA MICROALGA
Ankistrodesmus gracilis (Bold & Wynne, 1985) (CHLOROPHYTA), CON
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN LABORATORIO**

LUIS CARLOS CORAL IBARRA

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero en Producción Acuícola**

Presidente:

**LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES
Biol., MSc, PhD**

Copresidente:

**MARCO ANTONIO IMUÉZ FIGUEROA
Zoot., Esp.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO- COLOMBIA
2006**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Artículo 1° del acuerdo N° 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES
Presidente

MARCO ANTONIO IMUEZ FIGUEROA
Copresidente

ARIEL EMIRO GOMEZ CERÓN
Jurado delegado

JULBRINNER SALAS BENAVIDES
Jurado

San Juan de Pasto, 1 de noviembre de 2006.

DEDICO A:

Dios por darme la fe para vencer mis miedos y correr el riesgo de vivir mis sueños.

A mis padres Josefina e Israel por darme todo su amor, cariño y apoyo incondicional, enseñándome a ser cada día una mejor persona. A mis hermanos Cristina y Andrés por darme su amistad y compartir sus vidas conmigo. Y a todos mis familiares por sus constantes consejos para que esto sea una realidad.

Luis Carlos Coral Ibarra

“A vida não passa de um instante, mais este instante basta para emprendermos coisas eternas!”

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Lúcia Helena Sipaúba Tavares	Biol., MSc, PhD. Docente de Post-grado del Centro de Acuicultura de la Universidad Estatal Paulista. Brasil.
Marco Antonio Imuez Figueroa	Zoot., Esp. Profesor programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.
Carlos Solarte Portilla	Zoot., M.Sc, DV. Profesor Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño.
Rizal Alcides Robles	Zoot., MSc, PhD (c). Estudiante de Post-grado, Universidad Estatal Paulista, Brasil.
Adriana Muñoz Ramírez	Zoot., MSc, PhD. Profesora Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.
Antonio Francisco Da Silva	PhD. Universidad Estatal Paulista. Brasil
Tatiana Betioli Fioresi	Zoot., Universidad Estatal Paulista. Brasil.
Jorge Nelson López Macias	M.V.Z., Esp., M.Sc., Ph.D.(c) Director Programa de Ingeniería en Producción Acuícola. Universidad de Nariño.
Silvia De Guerreiro	Laboratorio de Limnología y Producción de Plancton, CAUNESP, Brasil.
Ariel Emiro Gómez Cerón	Biol., Profesor programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.
Julbrinner Salas Benavides	Biol., Profesor programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.

Alexandre Ondei Martins Marsigli	Zoot., Universidad Estatal Paulista. Brasil.
Rodrigo Millan	Zoot., Universidad Estatal Paulista. Brasil.
Joan Sebastián Salas	Ingeniero en Producción Acuícola.
Alexander Maigual	Ingeniero en Producción Acuícola.
Oscar Mejía Santacruz	Economista, Universidad de Nariño.
Luis Alfonso Solarte Potilla	Secretario Académico Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño.

Al programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño.

A todo el personal que labora en el Centro de Acuicultura de la Universidad Estatal Paulista, Brasil.

A Pedro Palacios, Camilo Guerrero, Felipe Collazos, María Isabel Rosero, Juan Carlos Revelo y a todas las personas que en una u otra forma apoyaron el desarrollo de esta investigación.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	23
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GENERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MARCO TEORICO	26
4.1 GENERALIDADES DE LA MICROALGA <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	26
4.2 HISTORIA DE PRODUCCIÓN DE ALGAS EN LABORATORIO	28
4.3 ENFOQUE FISIOLÓGICO	30
4.3.1 Fotosíntesis	30
4.3.2 Reproducción de las algas	30
4.3.3 Forma de las algas	33
4.4 DIVISIÓN DE LAS ALGAS	34
4.4.1 Cyanophyta (Algas verdeazuladas)	34
4.4.2 Rhodophyta (Algas rojas)	35
4.4.3 Phaeophyta (Algas pardas)	36
4.4.4 Bacillariophyta (Algas diatomeas)	36
4.4.5 Chlorophyta (algas verdes)	37
4.5 CONDICIONES DE LABORATORIO PARA CULTIVO DE ALGAS	39
4.5.1 Factores físicos	39
4.5.2 Factores de nutrición	41
4.5.3 Factores químicos	43
4.6 CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN ALGAL	44
4.7 MEDIOS DE CULTIVO	45
4.7.1 Macrófitas	46
4.7.2 Composición del medio de cultivo con extracto de macrófitas (<i>Eichhornia crassipes</i>)	47
4.7.3 Medio de cultivo NPK	48
4.7.4 Medio de cultivo CHU ₁₂	48
4.8 FORMAS DE CULTIVO	48
4.9 PROCEDIMIENTO GENERAL EN EL CULTIVO DE LAS MICROALGAS	49
4.10 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN	51
5. DISEÑO METODOLOGICO	55
5.1 LOCALIZACIÓN	55

	Pág.	
5.2	INSTALACIONES Y EQUIPOS	56
5.2.1	Laboratorios	56
5.2.2	Equipos y utensilios	56
5.3	PLAN DE MANEJO	58
5.3.1	Adecuación del laboratorio	58
5.3.2	Material biológico	58
5.3.3	Preparación del medio de cultivo a base de extracto de macrófitas	58
5.3.4	Preparación del medio de cultivo CHU ₁₂	59
5.3.5	Purificación del cultivo	60
5.3.6	Asepsia empleada en el cultivo	60
5.4	TRATAMIENTOS	61
5.5	DISEÑO EXPERIMENTAL	61
5.6	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	62
5.7	VARIABLES EVALUADAS	62
5.7.1	Crecimiento de <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	62
5.7.2	Clorofila <i>a</i>	62
5.7.3	Variables físico-químicas de los medios de cultivo	62
5.7.4	Valor nutricional de la microalga	63
5.7.5	Análisis parcial de costos	63
6.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64
6.1	CRECIMIENTO DEL ALGA	64
6.1.1	Fase de ajuste	65
6.1.2	Fase exponencial	66
6.1.3	Fase de reducción del crecimiento	68
6.1.4	Fase estacionaria y muerte	68
6.2	Curva de regresión para el crecimiento	69
6.3	COLOROFILA <i>a</i>	70
6.4	CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS DEL MEDIO DE CULTIVO	71
6.4.1	Oxígeno disuelto	72
6.4.2	Conductividad	73
6.4.3	Asociación entre las variables del medio de cultivo	73
6.5	VALOR NUTRICIONAL DE LA MICROALGA <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	78
6.5.1	Proteína	78
6.5.2	Energía bruta	80
6.5.3	Extracto etéreo	81
6.5.4	Fibra	82
6.6	ANÁLISIS PARCIAL DE COSTOS	84

	Pág.
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
7.1 CONCLUSIONES	86
7.2 RECOMENDACIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXOS	95

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición del medio de cultivo a base de extracto de macrófitas	48
Tabla 2. Conteos diarios promedios de la microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> en célulasx10 ⁵ /ml a lo largo del cultivo	64
Tabla 3. Tasas de crecimiento y duplicaciones diarias en las distintas fases del cultivo de <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	67
Tabla 4. Valores promedios y desviación estándar de las características limnológicas del medio de cultivo durante el periodo experimental	72
Tabla 5. Costos variables en el cultivo de microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	84
Tabla 6. Relación costo-beneficio	85

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Soluciones Stock para el medio de cultivo CHU ₁₂	60
Cuadro 2. Composición de un litro de medio CHU ₁₂	60
Cuadro 3. Variables analizadas en las muestras de cultivo y el método correspondiente	63

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	27
Figura 2. Reproducción asexual de las algas	31
Figura 3. Reproducción sexual de las algas	33
Figura 4. Formas comunes de las algas	34
Figura 5. Organización de un alga	38
Figura 6. Localización del centro de acuicultura en el contexto continental, nacional, estatal y local	55
Figura 7. Laboratorio de producción de plancton	56
Figura 8. Equipos del laboratorio de producción de plancton	57
Figura 9. Adecuación de los tratamientos en la sala de cultivo	58
Figura 10. Macrófitas (<i>Eichhornia crassipes</i>), como medio de cultivo	59
Figura 11. Cámara de asepsia	61
Figura 12. Curva de crecimiento promedio diario por tratamiento, de la microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> en células x 10 ⁵ /ml.	66
Figura 13. Regresión exponencial en el crecimiento de la microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	69
Figura 14. Contenido de clorofila <i>a</i> en el cultivo de la microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	70
Figura 15. Contenido de proteína de la microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	78
Figura 16. Energía bruta (kcal/kg) de la microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	80
Figura 17. Extracto Etéreo (%) de la microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	82
Figura 18. Fibra (%) de la microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	83

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Principales formulaciones para medios de cultivo utilizados en acuicultura	96
Anexo B. Método de extracción y calculo de clorofila <i>a</i>	103
Anexo C. Método químico para determinación de nutriente	104
Anexo D. Protocolo de análisis de alimentos adaptado por el laboratorio de bromatología de la Universidad Estatal Paulista	110
Anexo E. Valores promedios de cada variable evaluadas por tratamiento	113
Anexo F. Análisis de varianza, mediante el programa estadístico SAS System	115
Anexo G. Correlación de las variables en el crecimiento de la microalga	116

GLOSARIO

ALGAS: cada una de las plantas talofitas, unicelulares o pluricelulares, que viven de preferencia en el agua, tanto dulce como marina, y que, en general, están provistas de clorofila acompañada a veces de otros pigmentos de colores variados que la enmascaran. El talo de las pluricelulares tiene forma de filamento, de cinta o de lámina y puede ser ramificado.

AUTOTRÓFICO: significa autoalimentación, proceso en el cual predomina la fijación de energía luminosa (fotosíntesis) utilizando sustancias inorgánicas simples en la producción de sustancias complejas.

AUXOTRÓFICO: organismos fotosintéticos que requieren vitaminas, pueden ser fotoauxotróficos.

BIOMASA: peso vivo, incluido reservas alimentares por unidad de área.

CEPA: especie de microorganismos de carácter conocido, que se conservan cultivados en laboratorio, para determinados ensayos y experimentos.

CULTIVO: población de microorganismos que crecen en un medio.

EUTRÓFICO: medio rico en nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, responsables por el aumento de la productividad.

FICOLOGÍA: estudio de las comunidades algales.

FOTOPERÍODO: número de horas de claridad dentro de un periodo de 24 horas, el cual afecta las respuestas de las plantas y de otros organismos.

FOTOSÍNTESIS: proceso metabólico específico de ciertas células de los organismos autótrofos, por el que se sintetizan sustancias orgánicas a partir de otras inorgánicas, utilizando la energía luminosa.

HETEROTRÓFICOS: organismos que se alimentan de otros utilizando, reorganizando y descomponiendo las sustancias complejas que otros (autotróficos) sintetizaron. Son llamados consumidores.

INOCULO: individuo o conjunto de individuos que constituye el grupo de microorganismos fundadores de una colonia o de una población, recientemente establecida, en un cultivo experimental.

LIMNOLOGÍA: de origen griego, *limné* significa lago. La limnología puede ser definida como el estudio ecológico de todas las masas de aguas continentales, independientemente de sus orígenes, dimensiones y concentraciones salinas. Es resultante de la interacción de varias otras ciencias, como botánica, zoología, química, física, ecología, geología, meteorología, entre otras.

MACRÓFITAS: vegetales que habitan desde pantanos hasta ambientes verdaderamente acuáticos. Plantas herbáceas que crecen en el agua, en suelos cubiertos por agua o en suelos saturados con agua. Incluyen vegetales que varían de macroalgas, como el género *Chara*, a angiospermas, como el género *Typha*.

MACRONUTRIENTES: son considerados esenciales e imprescindibles, puesto que están relacionados con la fisiología y la bioquímica de cada especie. Sustancia química requerida por un organismo en gran cantidad, como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre, magnesio y silicio.

MATERIA INORGÁNICA: sustancia química de origen mineral, o más correctamente de estructura básicamente no carbónica.

MATERIA ORGÁNICA: sustancia química de origen animal o vegetal, o más genéricamente, sustancias que poseen estructura básicamente carbónica.

MEDIO DE CULTIVO: medio que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de cada especie. Para algas, estos nutrientes son divididos en micronutrientes y macronutrientes.

MEDIO ESTÉRIL: medio exento de bacterias o de otro tipo de organismo, excepto el que está siendo cultivado.

MICRONUTRIENTE: sustancia química requerida por un organismo en pequeñas cantidades, como hierro, boro, cobre, cobalto, zinc, cloro, vanadio, molibdeno, magnesio y sodio. Son utilizados metales trazas que ayudan en los mecanismos enzimáticos presentes en la célula.

NPK: Fertilizante compuesto por nitrógeno, fósforo y potasio.

NUTRIENTES: son compuestos de NH_3 y PO_4 , indispensables para el desarrollo de microorganismos, como las algas.

PLANCTON: son comunidades que viven suspendas en el agua, caracterizadas por su pequeño tamaño, que varía de algunos micrómetros hasta algunos milímetros, con limitado o ningún poder de locomoción. El término plancton viene del griego y significa errante. Cuanto a su naturaleza, se distinguen cuatro categorías: bacterioplancton, fitoplancton, zooplancton y protozooplancton. Los componentes más representativos del plancton de agua dulce son: bacterias,

algas, protozoarios, rotíferos, cladóceros, copépodos y larvas de pequeños insectos.

PRODUCCIÓN PRIMARIA: es el resultado del trabajo de los autótrofos (productores primarios) en la síntesis de la materia orgánica (fotosíntesis).

PROTEÍNA: es una clase especial de macromoléculas, constituida de aminoácidos y capaz de reconocer e interactuar con moléculas altamente diversas. Determina el padrón de las transformaciones químicas en las células.

VACUOLAS GASEOSAS: cavidades existentes en la célula, ópticamente vacías. En ciertos organismos funciona como un órgano que auxilia en la fluctuación.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo estudiar el efecto de dos medios de cultivo sobre el crecimiento de la microalga *Ankistrodesmus gracilis* a nivel de laboratorio, en cultivos tipo batch o estático. Este trabajo fue desarrollado en las instalaciones del laboratorio de Limnología y Producción de Plancton del Centro de Acuicultura de la Universidad Estatal Paulista (CAUNESP), en la ciudad de Jaboticabal, estado de São Paulo, Brasil. El experimento estuvo constituido por dos tratamientos, con 15 repeticiones cada uno. El tratamiento T1 consistió en utilizar un fertilizante comercial llamado CHU₁₂ y el tratamiento T2 con fertilizante a base de extracto de macrófitas (*Eichhornia crassipes*) mezclado con NPK (20:5:20).

El crecimiento de la microalga *Ankistrodesmus gracilis* en los dos tratamientos no obtuvo diferencias estadísticas significativas, por lo tanto los medios de cultivo comercial y alternativo generaron los mismos efectos sobre el crecimiento; estos resultados se reflejan en las concentraciones celulares, las cuales fueron de $301,91 \times 10^5 \pm 157,57$ cel/ml para el tratamiento T1 y de $332,89 \times 10^5 \pm 173,58$ cel/ml para el tratamiento T2, con una regresión de crecimiento de $R^2=0,7342$, representando el efecto de relación en el 73,42% de los casos; el resto de las variaciones se explica por otras razones que son desconocidas para este estudio.

Sin embargo el T1 obtuvo mayor velocidad de duplicaciones diarias (0,58 divisiones), prolongando la fase exponencial a ocho días, mientras que el T2 logró duplicaciones de 0,52 divisiones/día, aumentando el tiempo de la fase exponencial a nueve días, lo que significa mayor tiempo de disponibilidad de alimento vivo en una larvicultura.

Cabe resaltar que la interacción de las variables limnológicas en los dos tratamientos entre ellas las fuentes de nutrientes como amonio y nitrato, presentaron una correlación de 0,97, con valores promedios para amonio de 0,34 mg/L en el tratamiento T1 y de 0,09 mg/L para el tratamiento T2, y para nitrato, en el tratamiento T1 fue ausente mientras que en el tratamiento T2 fue de 0,53 mg/L.

Otra correlación importante fue el fosfato total con ortofosfato, de los cuales el fosfato total presentó una concentración promedio para el tratamiento T1 de 1,56 mg/L y para el tratamiento T2 de 0,386 mg/L, mientras que el contenido promedio de ortofosfato para el tratamiento T1 fue de 1,453 mg/L y para el tratamiento T2 de 0,309 mg/L, presentando una correlación de 0,99 siendo altamente significativo.

Entre alcalinidad y carbonatos presentaron una correlación de valor de Pearson de 0,96 ($p=0,0001$) y entre alcalinidad y bicarbonatos presento una correlación con un valor de pearson de 0,88 ($p=0,0001$) siendo estos altamente significativos, con concentraciones promedio de alcalinidad en el tratamiento T1 de 84,13 mg/L y en el tratamiento T2 de 31,33 mg/L y para bicarbonato obtuvo valores de 106,39 mg/L en el tratamiento T1 y para el T2 de 40,28mg/L, en cuanto a carbonato para el tratamiento T1 fue de 0,329 mg/L y para T2 de 0,035 mg/L

Por otro lado el contenido de clorofila *a* en la microalga no presento diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos a lo largo del crecimiento de esta microalga, cuyos valores fueron de 0,075 pg/Célula para el tratamiento T1 y de 0,076 pg/Célula para el tratamiento T2.

Cabe resaltar que la interacción de todas las variables influyeron en el valor nutricional de la microalga, la cual acumuló mayor contenido de proteína, puesto que mostró diferencias estadísticas altamente significativas, con valores de 41,7% para el T1 y de 45,0% para el T2. Para Energía bruta los valores promedios calculados en esta investigación fueron para el T1 de 5247,01 kcal/kg y para el tratamiento T2 de 5079,49 kcal/kg, los cuales no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Para extracto etéreo el tratamiento T1 presento valores de 25,56% y para el tratamiento T2 de 25,80%. Para fibra en esta investigación indicó que el tratamiento T1 contenía el 10,69% y el tratamiento T2 alcanzo 8,83%. Los cuales no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos.

En cuanto al análisis parcial de costos, los resultados demostraron que el mejor tratamiento fue el T2 (extracto de macrófitas mezclado con NPK (20:5:20), el cual indicó una relación costo-beneficio de 3,18, frente al T1 que fue de 0,63.

ABSTRACT

The present investigation had as objective to study the effect of two cultivation means on the growth of the microalgae *Ankistrodesmus gracilis* at laboratory level, in cultivations type batch or static. This work was developed in the facilities of the laboratory of Limnology and Production of Plankton of the Center of Aquiculture of the State University Paulista (CAUNESP), in the city of Jaboticabal, state of São Paulo, Brazil. The experiment was constituted by two treatments, with 15 repetitions each one. The treatment T1 consisted on using a commercial called fertilizer CHU₁₂ and the treatment T2 with fertilizer with the help of extract of blended macrófitas (*Eichhornia crassipes*) with NPK (20:5:20).

The growth of the microalgae *Ankistrodesmus gracilis* in the two treatment didn't obtain statistical significant differences, therefore the means of commercial and alternative cultivation generated the same effects on the growth; these results are reflected in the cellular concentrations, which were of $301,91 \times 10^5 \pm 157,57$ cell/ml for the treatment T1 and of $332,89 \times 10^5 \pm 173,58$ cell/ml for the treatment T2, with a regression of growth of $R^2=0,7342$, representing the relationship effect in 73,42% of the cases; the rest of the variations is explained by other reasons that they are ignored for this study.

However T1 obtained bigger speed of daily (0,58 divisions) duplications, prolonging the exponential phase to eight days, while T2 achieved duplications of 0,52 divisions/day, increasing the time from the exponential phase to nine days, what means bigger time of food readiness lives in a larviculture.

It is necessary to stand out that the interaction of the variable limnológicas in the two treatments among them the sources of nutritious as ammonium and nitrate, presented a correlation of 0,97, with values averages for ammonium of 0,34 mg/L in the treatment T1 and of 0,09 mg/L for the treatment T2, and it stops nitrate, in the treatment T1 was absent while in the treatment T2 was of 0,53 mg/L.

Another important correlation was the total phosphate with ortofosfato, of which the total phosphate presents a concentration average for the treatment T1 of 1,56 mg/L and for the treatment T2 of 0,386 mg/L, while the content ortofosfato average for the treatment T1 was of 1,453 mg/L and for the treatment T2 of 0,309 mg/L, presenting a correlation of 0,99 being highly significant.

Between alkalinity and carbonates they presented a correlation of value of Pearson 0,96 ($p=0,0001$) and between alkalinity and bicarbonates I present a correlation with a value of pearson of 0,88 ($p=0,0001$) being these highly significant ones, with concentrations average of alkalinity in the treatment T1 of 84,13 mg/L and in

the treatment T2 of 31,33 mg/L and it stops bicarbonate she obtained values of 106,39 mg/L in the treatment T1 and for T2 of 40,28 mg/L, as for carbonate for the treatment T1 was of 0,329 mg/L and T2 of 0,035 mg/L stops.

On the other hand the chlorophyll a content to in the microalgae I don't present statistical significant differences among the two treatments throughout the growth of these microalgae whose values were of 0,075 pg/Cell for the treatment T1 and of 0,076 pg/Cell for the treatment T2.

It is necessary to stand out that the interaction of all the variables influenced in the nutritional value of the microalgae, which accumulated bigger protein content, since it showed statistical highly significant differences, with values of 41,7% for T1 and of 45,0% for T2. For gross Energy the values averages calculated in this investigation were for T1 of 5247,01 kcal/kg and for the treatment T2 of 5079,49 kcal/kg, which didn't present statistical significant differences among the treatments. For ethereal extract the treatment T1 presents values of 25,56% and for the treatment T2 of 25,80%. For fiber in this investigation indicated that the treatment T1 contained 10,69% and the treatment T2 I reach 8,83%. This didn't present statistical significant differences among the two treatments.

As for the partial analysis of costs, the results demonstrated that the best treatment was T2 (extract of blended macrófitas with NPK (20:5:20), which indicated a relationship cost-benefit of 3,18, in front of T1 that was of 0,63.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la producción acuícola ha llevado a la necesidad de cultivar nuevas especies, las cuales implican la masiva producción de alimento vivo como es el caso de las microalgas, siendo estas de vital importancia para el cultivo de moluscos bivalvos, crustáceos y de especies de zooplancton como rotíferos, cladóceros y copépodos, que son a su vez la base de la alimentación de un buen número de larvas de especies piscícolas. Asimismo las microalgas pueden también jugar un papel importante como fuente de proteína de alta calidad e incluso como aditivos en los alimentos de peces adultos.

Por lo tanto, el desarrollo y supervivencia de larvas y juveniles depende de la presencia de organismos que conforman el fitoplancton y el zooplancton, quienes a su vez se subordinan a la presencia de nutrientes y condiciones medioambientales adecuadas.

Uno de los principales problemas del cultivo en masa de algas para la alimentación de organismo acuícolas es el costo de los agentes químicos necesarios para la preparación de los medios de cultivo. La necesidad de estudiar otras alternativas que puedan servir como sustituto para mejorar los medios tradicionales y comerciales se plantea mediante el uso de NPK (20:5:20) y nutrientes a base de macrófitas. En este sentido, Sipaúba y Rocha¹ afirman que fertilizantes de productos biológicos pueden ser importantes alternativas puesto que presentan gran concentración de nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de las algas y además son materiales de bajo costo que contribuyen en el reciclaje de productos biológicos.

Igualmente dentro de las algas de agua dulce cultivadas, las Chlorophytas unicelulares han sido ampliamente utilizadas en la alimentación de organismos planctónicos y particularmente las del género *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus* y *Chlamydomonas*, también se ha demostrado una gran aceptación por los organismos acuícolas, debido a su tamaño y forma, que permite su fácil captura e ingestión.

Es así que el organismo fitoplanctónico como la microalga *Ankistrodesmus gracilis*, es considerada una buena fuente de alimento vivo, de ahí el objetivo de este trabajo es estudiar el crecimiento, desarrollo y valor nutricional de esta microalga influenciada por un medio alternativo de cultivo y factores ambientales a nivel de laboratorio.

¹ SIPAÚBA TAVARES, Lúcia Helena; ODETE, Rocha. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos, São Carlos, Brasil, RiMa. 2003. p.4.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Las grandes mortalidades de larvas de las especies en cultivos es uno de los principales problemas que tiene la acuicultura, debido a la falta de investigaciones que desarrollen un alimento que esté en función directa con sus requerimientos nutricionales y aceptación por parte de las larvas. Por lo tanto, es primordial conocer y manejar las diferentes técnicas de cultivo de alimento vivo para establecer las condiciones más adecuadas, que permitan obtener un alimento con gran disponibilidad y alto contenido nutricional favoreciendo así el desarrollo y supervivencia de las diferentes especies de crustáceos, moluscos y peces que se obtienen por acuicultura.

En este enfoque, es de gran importancia evaluar otros tipos de fertilizantes, que pueden abaratar el costo de producción en el cultivo de microalgas, que hoy en día es una de las mejores opciones en términos de alimento vivo. Por esta razón, en el presente ensayo se evaluó el crecimiento y desarrollo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) en dos medios de bajo costo, como es el caso del producto comercial CHU₁₂ y un alternativo como extracto de macrófitas mas NPK, tendiente a determinar su potencial en la alimentación de organismos hidrobiológicos, mejorar su tasa de crecimiento y avanzar en el conocimiento sobre su biología, permitiendo la manipulación de las condiciones físico-químicas del medio de cultivo, de manera que se garantice el éxito y la rentabilidad.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La escasez de estudios sobre fertilizantes y el cultivo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis* ha llevado a plantear el siguiente problema:

¿Cuál es el fertilizante más adecuado, entre el producto comercial CHU₁₂ y un alternativo como extracto de macrófitas mas NPK (20:5:20), para mejorar el crecimiento y desarrollo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*, considerados como medios de cultivo de bajo costo, para la producción en masa de alimento de alto valor nutricional en la producción de organismos acuícolas?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dos fertilizantes (CHU₁₂ y extracto de macrófitas mas NPK) adicionados al medio de cultivo, en el crecimiento y desarrollo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la tasa de crecimiento a lo largo del ciclo de vida.
- Evaluar el efecto de los dos fertilizantes sobre las variables físicas y químicas del agua.
- Establecer la relación entre las diferentes variables evaluadas.
- Determinar el contenido nutricional de la microalga *Ankistrodesmus gracilis* en los dos tratamientos.
- Realizar un análisis parcial de costos, en cada uno de los tratamientos evaluados.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES DE LA MICROALGA *Ankistrodesmus gracilis*

Según Bold y Wynne² es un alga perteneciente a la clase Chlorophyta, orden: Chlorococcales, familia: Oocystaceae, género: *Ankistrodesmus* y a la especie *gracilis*.

Happey³ menciona que esta especie es característica de ambientes eutróficos, crece abundantemente y puede originar “blooms” o florecimientos y en ocasiones se la encuentra formando pequeños grupos.

Para Asselbom y Parodi⁴, esta especie presenta células de 12,5 a 17,5 µm de largo y de 2,5 a 5,0 µm de ancho, con forma de medialuna y con los extremos ligeramente aguazados (Figura 1). El cloroplasto es parietal y presenta tilacoides más o menos paralelamente dispuestos, separados a veces por gránulos de almidón o interrumpidos por la presencia de un pirenoide, penetrado sólo en su región periférica por los tilacoides. El núcleo ocupa una posición central en la célula y posee una pronunciada escotadura donde se aloja el dictiosoma. El citoplasma se caracteriza por su homogeneidad y por la presencia de abundante ribosomas libres.

En sus estudios Lemos⁵ encontró que esta microalga en su composición mineral posee niveles de nitrógeno de 7,0%, fósforo 2,7%, potasio 0,8%, calcio 2,6%, azufre 0,5%, hierro 0,9% y zinc 0,03%, mostrando una relación aproximada de 1:1 entre Ca y P.

² BOLD, H.C.; WYNNE, M. J. Introduction to the algae: structure e reproduction. New Jersey: Prentice Hall, 1985. p. 58.

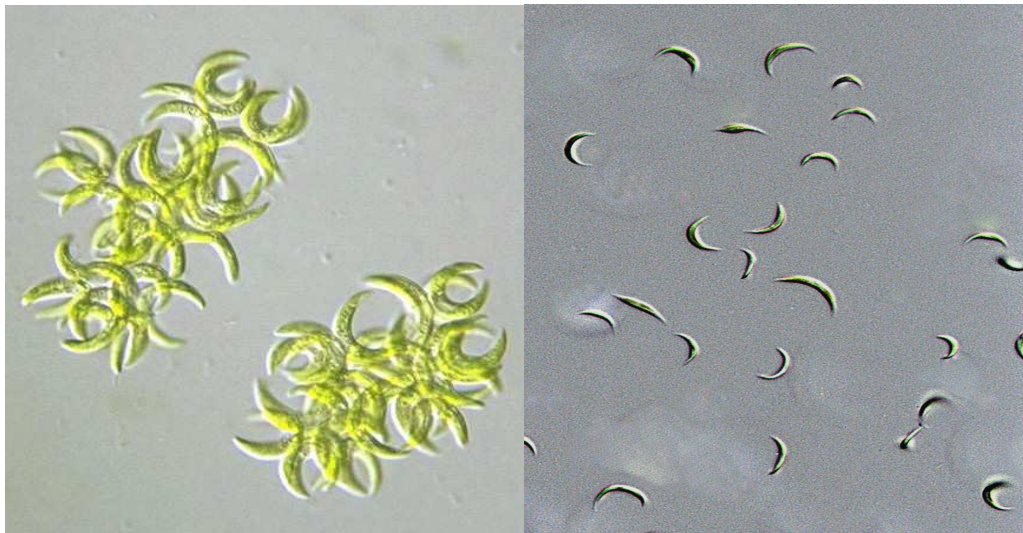
³ HAPPEY WOOD, C. M. Ecology of freshwater planktonic green algae. In: Sandgren, C.D. growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge: Syndicate of the University of Cambridge. Vol. 4, No.1 (ene.1988), p. 175.

⁴ ASSELBOM, V. M.; PARODI, E. R. Ficología. En: XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & XV reunión anual de la Sociedad Botánica de Chile. 2003. p. 38. 2004. (citado el 20 de febrero de 2006) Disponible en Internet <http://www.biologia.edu.ar/sab/boletin/38/145-ficologia.pdf>

⁵ LEMOS, Alitiene. Cultura em larga escala da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (CHLOROPHYCEAE), e do microcrustaceo *Diaphanosoma birgei* (KORINECK, 1981) (CLADOCERA) em laboratorio. Tese Doutor em Aqüicultura. Jaboticabal, Brasil: CAUNESP-UNESP, 2001. p. 55.

Asimismo, Sipaúba y Rocha⁶ hallaron que la microalga *Ankistrodesmus gracilis* ha dado buenos resultados como alimento para zooplancton y larvas de peces puesto que alcanza fases de crecimiento exponencial alrededor de ocho días de cultivo, además encontraron que *Ankistrodesmus gracilis* en la alimentación de *Ceriodaphnia dubia* aumentaba la tasa de reproducción en comparación a otros 16 tipos de algas.

Figura 1. Microalga *Ankistrodesmus gracilis*



Entre tanto, Macedo y Pinto⁷ desarrollaron experimentos en la acumulación de reservas lipídicas en dos especies comunes de cladóceros alimentados con *Scenedesmus quadricauda* y *Ankistrodesmus gracilis*. El cladócero *Daphania laevis* alimentado con la dieta de *Ankistrodesmus gracilis* acumuló una cantidad mayor de lípidos, siendo confirmada en una especie menor como *Moina micura*, este estudio también reveló que la mayor parte de lípidos almacenados en ambos cladóceros se refiere a triglicéridos.

⁶ SIPAÚBA, L. H. y ROCHA, O. cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I-algas Clorofíceas. : Biotemas. Jaboticabal, SP, Brasil. Vol. 6, No.1 (fevereiro,1993), p. 93.

⁷ MACEDO, C. F. y PINTO CARLHO, R. M. NUTRITIONAL STATUS RESPONSE OF *Daphnia laevis* AND *Moina micura* FROM A TROPICAL RESERVOIR TO DIFFERENT ALGAL DIETS: *Scenedesmus quadricauda* AND *Ankistrodesmus gracilis*. In: Brazilian Journal of Biology. São Carlos, Brazil. Vol. 61, N. 4 (Nov. 2001). p. 1.

En cuanto a cultivo en larga escala Lemos⁸ afirma que esta microalga tiene buenos resultados con volúmenes menores a 250 litros, produciendo grandes concentraciones celulares en corto periodo de tiempo.

4.2 HISTORIA DE PRODUCCIÓN DE ALGAS EN LABORATORIO

Actualmente la producción de algas ha tenido finalidades bastante variadas tales como la acuicultura, tratamiento de aguas residuales, producción química comercial, bioconservación de la energía solar, entre otras.

Sipaúba y Rocha⁹ mencionan que:

El cultivo en larga escala se inicio en la década de los 50, con la intención de producir proteína como fuente de alimento, es así que Spoehr y Milner en 1949 fueron los primeros en utilizar cultivos algales como potencial para la aplicación comercial.

De esta forma, entre los años 1955 y 1970 ocurrió un gran impulso de cultivo en masa, debido a la construcción de pequeños laboratorios que posteriormente fueron sustituidos por sistemas de cultivo en gran escala. Los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* fueron los primeros en investigarse puesto que son de fácil cultivo.

Asimismo, en los Estados Unidos entre 1960 y 1968 Oswald revolucionó la tecnología del cultivo en gran escala con la utilización de algas para tratamientos de aguas residuales y en la producción de proteína. En la década de los 70, Goldman y colaboradores aprovechando las técnicas ya existentes dieron un gran impulso en la tecnología de cultivo de algas marinas a gran escala, utilizando estanques de 15 m² y realizando experimentos con una duración entre 6 y 18 meses en la producción de diatomeas entorno a 10 g/m²/día.

En el Japón, los intereses por el cultivo en masa surgieron después de la segunda guerra mundial, con la introducción de aspectos de la bioingeniería en el cultivo de *Chlorella*. En este país el primer cultivo externo (outdoor) fue desarrollado en 1953, en tanques de 15 m², por Mitya, con una producción media de 3,5 g/m²/día, en esta misma época Morinaura elevó producciones hasta 16 a 17 g/m²/día, de esta manera al final de la década de los 50 fueron formadas pequeñas y grandes

⁸ LEMOS, Op. cit., p. 76.

⁹ SIPAÚBA y ROCHA, Op. cit., p. 17.

industrias para el cultivo de *Chlorella*, con una producción de 300 toneladas para un total de 10 compañías industriales.

Igualmente, Tailandia, en la época de los 60, presentó una tecnología para cultivos en grande escala utilizando circulaciones continuas con bombeo de agua o por medio de cascadas en cultivos mixtos, con áreas de 4.500 m². Asimismo el cultivo en gran escala de *Chlorella sp.*, es muy común con una producción de aproximadamente 800 toneladas por año, siendo realizada por productores particulares.

En Alemania, los primeros trabajos datan de la época de la segunda guerra mundial, cuando las algas eran cultivadas en masa para la producción de grasa. A partir de mediados de la década de los 50 las investigaciones tuvieron un gran impulso, siendo que cultivos continuos sofisticados en tanques de 4 a 80 m², con *Scenedesmus sp.* y *Coelastrum sp.*, produjeran 30 g/m³/día. De esta manera este país realizó convenios con Tailandia, India y Perú para la producción de *Scenedesmus sp.* y *Spirulina sp.*

Israel inicio el cultivo en la década de los 50, en pequeña escala, utilizando cultivos de *Chlorella sp.*, con adición de CO₂, circulación de agua y luz artificial, ya en la década de los 70, en sociedad con industrias privadas pasa a desarrollar cultivos en masa de algas verdes unicelulares.

Asimismo, Holanda inicio cultivos de *Chlorella sp.*, junto con Bélgica en la década de los 50 orientando sus estudios tanto para algas de agua dulce como marinas. Posteriormente en Rusia, la producción de *Anabaena variabilis*, *Spirulina platensis* y *Chlorella sp.*, alcanzó niveles de 10 a 20 g/m³/día, las cuales son bastante difundidas.

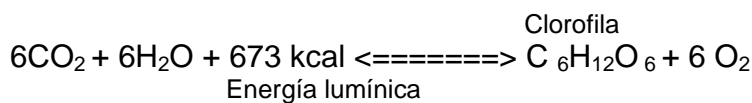
En Francia el interés voltease para *Spirulina sp.*, con el objetivo de obtener un pigmento excretado por esta alga. En el sentido de ampliar su producción, este país hizo un convenio con Argelia y Egipto para construir tanques de 2.000 a 5.000 m², de la misma manera hizo convenio con México, cuyas producciones fueron de aproximadamente 10 g/m³/día o de cinco toneladas al día, consecuentemente estos países vendían a los japoneses quienes utilizaban el pigmento en la coloración de pollos, huevos, peces tropicales y otros productos.

En el Brasil, el cultivo de algas marinas tuvo inicio en la década de los 80, con relación a las especies de agua dulce, estos trabajos se están inclinando para cultivos en laboratorio en pequeña escala.

4.3 ENFOQUE FISIOLÓGICO

4.3.1 Fotosíntesis. Para Álvarez, citando a Barnes:

Solamente una pequeña cantidad, 1 o 2%, de la energía lumínica llega a la tierra. El reino vegetal es uno de los principales utilizadores de esta energía mediante el proceso de la fotosíntesis, en donde la energía radiante es transformada en energía química mediante la reducción del anhídrido carbónico. Por ejemplo, la síntesis de un mol de glucosa a partir del CO₂ y el agua implica la utilización de 673 kcal (2.826,6 kj) de energía lumínica:



El mismo autor explica que esta energía está disponibles en los procesos biológicos, ya que cuando 1,0 mol de glucosa se oxida en la respiración, 673 kcal de energía es liberada. Es por medio de transferencias y transformaciones de la energía de compuestos químicos formados en un comienzo por la fotosíntesis que la fuerza está provista para las actividades de los organismos vivos. La fotosíntesis algal es básicamente el mismo proceso que ocurre en las plantas terrestres. La luz con 400 – 700 nm de longitud de onda que activa el primer paso del proceso es absorbido por varios pigmentos fotosintéticos responsables del color característico del fitoplancton, siendo el principal la clorofila a que puede absorber hasta un máximo de 670 a 695 nm de longitud de onda. El fitoplancton posee además otros pigmentos accesorios que absorben luz de más pequeña longitud, en parte usándola directamente para disociar moléculas de agua y en parte para pasar la energía lumínica a la clorofila a. La fijación fotosintética es responsable de la generación primaria (inicial) de los compuestos orgánicos. Los carbohidratos, las grasas y las proteínas son todos sintetizados y la cantidad total de carbono o de energía fijada forma la producción primaria bruta¹⁰.

4.3.2 Reproducción de las algas. La reproducción de las algas puede ser asexual o sexual.

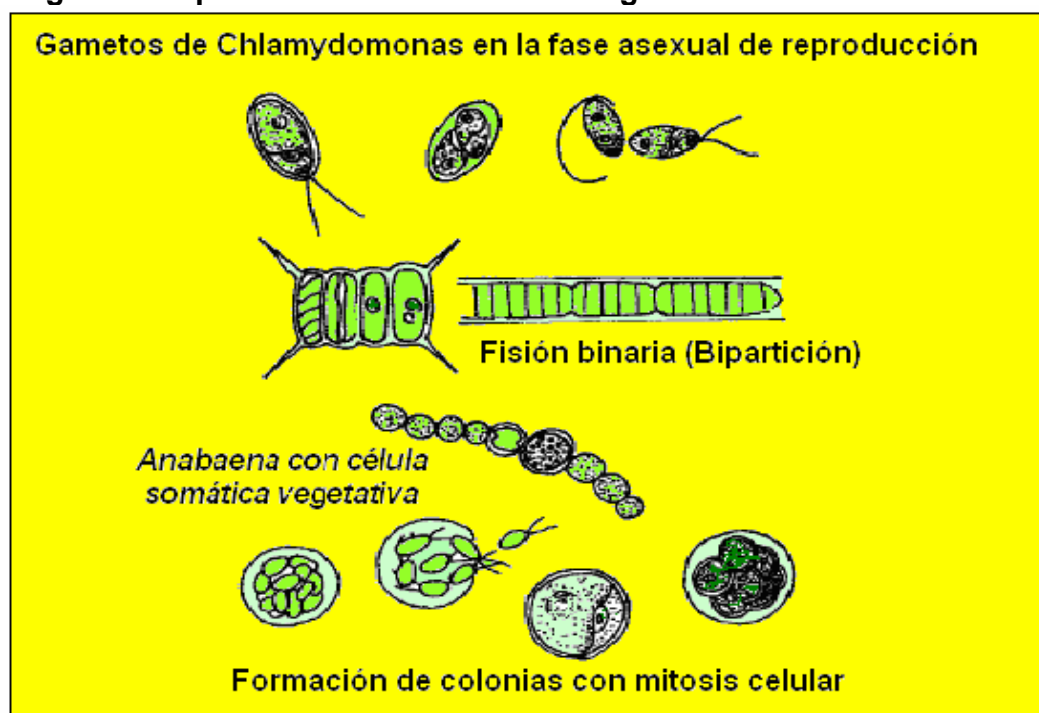
➤ **Reproducción asexual de las algas.** Álvarez¹¹ citando a Bold y Wynne sostiene:

¹⁰ ÁLVAREZ, Henry. Aspectos biológicos generales. Folleto de algas. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior politécnica del Litoral, 1994. p. 3.

¹¹Ibid., p. 5.

Las algas unicelulares se reproducen por simple división celular, lo que puede ser repetido en rápidas sucesiones o “bipartición repetida”, para formar nuevos individuos de iguales características a la progenitora. Este proceso se conoce también como fisión binaria (Figura 2). En algas que forman colonias y en aquellas de tipo multicelulares, la división celular y el consiguiente incremento resulta en crecimiento. Algas filamentosas y otras multicelulares se reproducen por fragmentación; aquí cada fragmento resultante mantiene la capacidad de seguir creciendo como individuos nuevos independientes.

Figura 2. Reproducción asexual de las algas



Ibid., p. 2.

En algunas especies existe la formación de brotes o gemaciones que se desprenden de su progenitor como agentes de propagación. La fragmentación no es un método de reproducción en algas coenóbicas (colonias o unidades de células no diferenciadas), al contrario, éstas sufren formación de autocolonias (una autocolonia es una colonia en miniatura producida por una colonia progenitora de igual parecido o semejante). Hay algas que producen agentes unicelulares de reproducción asexual o esporas; por ejemplo las esporas acinéticas (sin movimiento propio) de amplia distribución entre las algas verdes y azulverdosas. Una espora acinética es esencialmente una célula

somática vegetativa que ha engrosado su membrana para soportar condiciones adversas. Muchas algas verdes, amarillas y pardas producen agentes flagelados de reproducción asexual o zoosporas con movimiento propio. Otros tipos de esporas no móviles son producidas por varias algas, como son las autoesporas de las algas verdes, como la *Chlorella sp* y las amarillo-verdosas. Ellas, por su forma, son miniaturas que se asemejan a sus progenitoras y no tienen motilidad. Las esporas pueden ser producidas dentro de células vegetativas ordinarias o dentro de células especializadas; estas estructuras se conocen como esporangios.

➤ **Reproducción sexual de las algas.** Para Bold y Wynne¹²:

La reproducción sexual es común en muchas especies de algas. En ciertas algas las células reproductoras (flageladas) funcionan como zoosporas asexuales o como gametos, dependiendo de las condiciones ambientales.

Otras algas producen zoosporas con formas muy distintas de las células germinales, aunque en algunos casos los gametos diferenciados tienen capacidad para crecer como nuevos individuos sin unión sexual, es decir por partenogénesis (reproducción sin fertilización por célula macho), proceso que se muestra en la Figura 2.

Así mismo, en ciertas algas unicelulares como las *Chlamydomonas*, el mismo organismo participa como gameto. Los gametos pueden ser morfológicamente iguales o isógamos, uno de los dos puede ser más pequeño que el otro o anisógamos, ambos pueden ser diferentes en forma, uno móvil y el otro no, siendo esta forma de reproducción sexual llamada oogamia.

Heterogamia es un término más general que incluye anisogamia y oogamia. Los gametos pueden ser, morfológicamente iguales a las células vegetativas (en edad de reproducción)

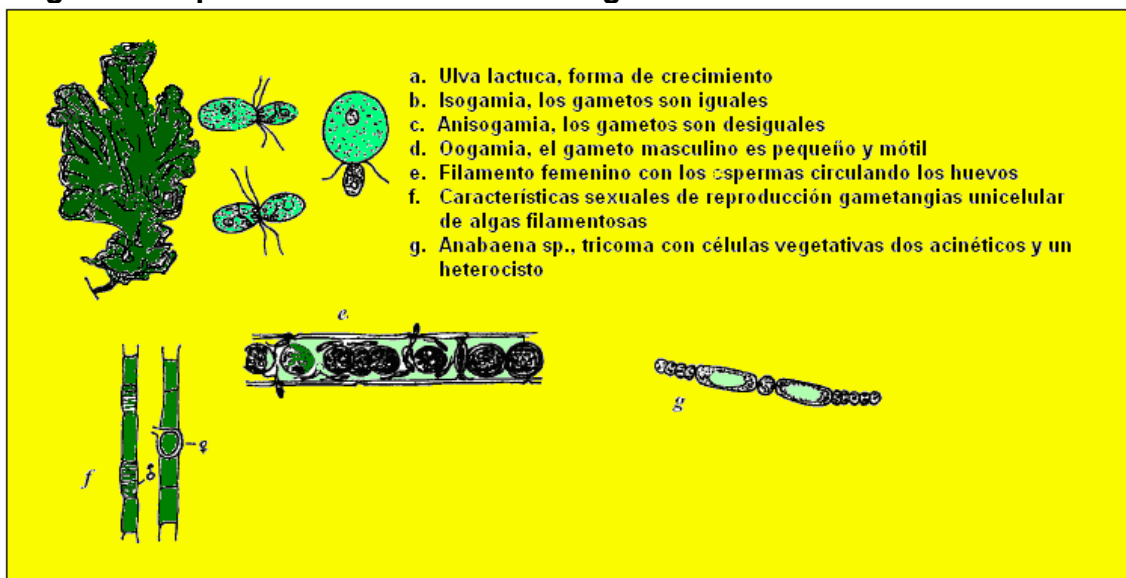
Como ocurre en las *Chlamydomonas* o en muchas algas multicelulares que difieren claramente de las células vegetativas. Estas pueden provenir de células vegetativas no modificadas que funcionan como gametangios, o de células morfológicamente especializadas (Figura 3)

Los gametos masculinos flagelados son producidos en gametangios especiales llamados ANTERIDIOS. En aquellas algas donde sus gametos están diferenciados en machos y hembras, los gametos de ambos sexos pueden existir en el mismo individuo al cual llamamos

¹² BOLD y WYNNE, Op. cit., p. 5.

bisexual, monoecio o hermafrodita. En otras especies de algas los gametos son producidos en dos diferentes individuos. A estas especies las llamamos dioecios.

Figura 3. Reproducción sexual de las algas.



ÁLVAREZ, Op. cit., p. 3.

4.3.3 Forma de las algas. Según Álvarez¹³, la revisión de las variadas formas de las algas microscópicas y macroscópicas se centra en aquellas que son más comunes a las actividades del acuicultor. Aquí se toman en cuenta algunas de esas especies solamente para fines de comparación. Las algas varían desde las más simples estructuras celulares como *Chlorella*, hasta las más complejas como la *Gracilaria sp.* que es ramificada (Figura 4). Así mismo hay una gran variedad de tamaños como las micromonas que pueden medir de 1 a 15 micras o las macroalgas marinas que llegan hasta 60 m de largo, esféricas y circulares planoconvexas como la *Chlorella sp.*

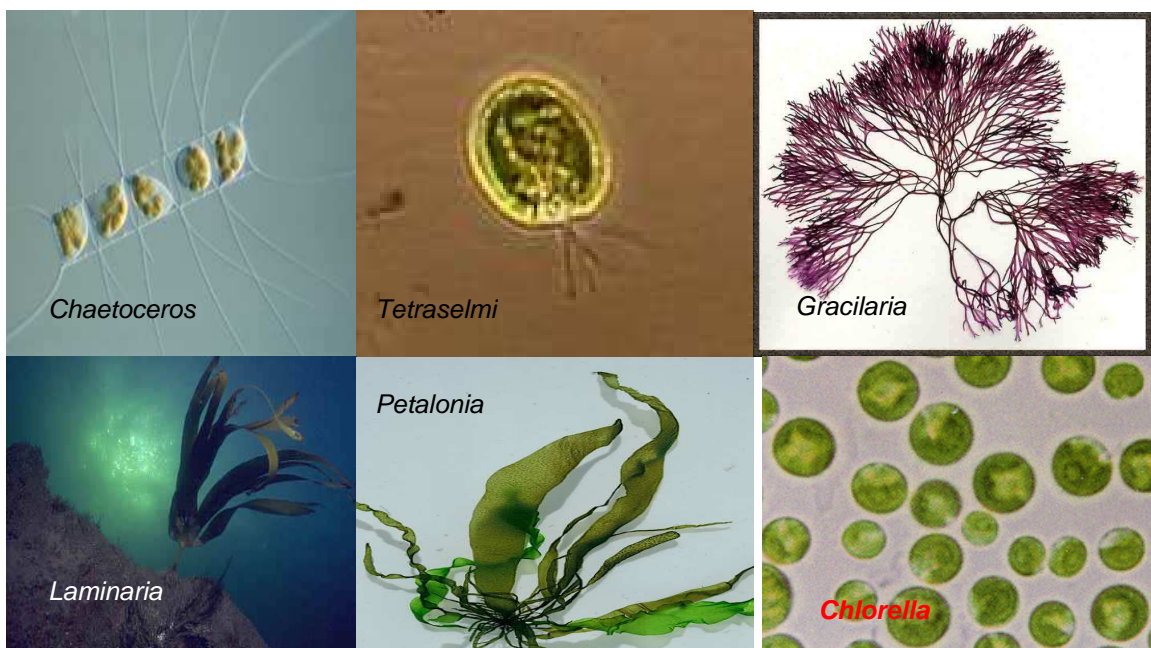
De acuerdo con Guersi:

Entre las formas más comunes están las microalgas unicelulares móviles, de forma oval como la *Tetraselmis*, las circulares como *Cocinodiscus sp.*, las prismáticas rectangulares como el *Chaetoceros sp.*, las de forma de hoja como el *Monostroma*, las foliares membranosas como la *Membranoptera*, las de forma filamentosa como

¹³ ÁLVAREZ, Henry. Componentes del agua importante en la ficología. Folleto de algas: Escuela Superior politécnica del Litoral, Ecuador, 1994. p. 3.

la *Enteromorpha* y las uniaxiales ramificadas como la *Gracilaria*. Estas formas son comunes, pero no representan el total de las existentes en los ambientes acuáticos. Las formas particulares externas que presentan sirven para reconocerlas con alguna facilidad cuando se las observa en el microscopio, sobre todo cuando el practicante no está familiarizado con ellas. Así se tiene que son características las setas (proyecciones en punta) que presenta el *Chaetoceros sp.*, en los cuatro vértices a los cuatro flagelos que le dan motilidad a la *Tetraselmis sp.*¹⁴

Figura 4. Formas comunes de las algas



HERAS, Francisico. Las algas. República Dominicana: Biblioteca Dominico-Virtual, 2006. (Citado el 20 de junio de 2006). Disponible en Internet, URL: <http://www.bibliotecavirtual.com.do/Biologia/LasAlgas.htm#top>

4.4 DIVISIÓN DE LAS ALGAS

4.4.1 Cyanophyta (Algas verdeazuladas). Según Marshall¹⁵:

¹⁴ GUERSI, José Luis. Aplicaciones de las microalgas. panorama da aqüicultura. Brasil (citado el 20 de Junio de 2006]: disponible en Internet URL: <http://www.mgar.net/mar/acuicult.htm>

¹⁵ MARSHALL, Darley. Biología de las algas: Enfoque fisiológico. México: Limusa, 1987. p. 16.

Las algas cianofitas se llaman también cianobacterias o bacterias verdeazuladas porque, como éstas, carecen de membrana nuclear. Sin embargo, la presencia de clorofila *a* y la fotosíntesis que libera O₂ separa a estas algas de otros procariotes fotoautótrofos y se cita como justificación para que se les siga considerando como algas.

Su color varía desde verdeazulado hasta rojo o púrpura y está determinado por la proporción de dos pigmentos fotosintéticos especiales: la *ficocianina* (azul) y la *ficoeritrina* (rojo), que tienden a enmascarar el color verde de la clorofila. Mientras que las plantas superiores presentan dos clases de clorofila llamadas *a* y *b*, las algas verdeazuladas contienen sólo la de tipo *a*. Se reproducen por escisión binaria, por esporas o por fragmentación de los filamentos pluricelulares. Al igual que las bacterias, estas algas están casi en todas partes: en los hábitats terrestres y acuáticos típicos, y en lugares tan extremos como pueden ser las fuentes termales (a temperaturas superiores a 73 °C) o en las grietas de rocas situadas en el desierto.

En condiciones favorables, algunas formas planctónicas de algas verdeazuladas dulceacuícolas se pueden multiplicar en cantidades masivas, floraciones, y producen unas toxinas que pueden envenenar a los organismos que la consumen.

Hoff y Snell¹⁶ mencionan que los géneros *Spirulina*, *Oscillatoria* y *Anabaena* son los más utilizados como alimento en acuicultura, puesto que poseen un alto nivel de proteína.

4.4.2 Rhodophyta (Algas rojas). Marshall¹⁷ menciona:

La mayoría de las algas rojas son algas marinas macroscópicas que comparten las aguas de las costas rocosas con algas verdes y pardas. Por lo común son más pequeñas y más delicadas que las algas pardas. Las algas rojas tienden a ser más abundantes en aguas subtropicales y tropicales que en agua templadas y polares y suelen ser más abundantes en aguas profundas que las algas pardas y verdes, las que prefieren generalmente aguas más frías y la zona intermareal. Además de las formas membranosas o carnosas, las algas rojas aparecen también como unicélulas, pequeños filamentos ramificados, formas costrosas y pequeños parásitos de otras algas rojas. Las paredes celulares de cierto

¹⁶ HOFF, Frank. y SNELL, Terry. Plankton culture manual. United States. Sixth edition. 2004. p. 16.

¹⁷ MARSHALL, Op. cit., p. 27.

número de algas rojas están marcadamente impregnadas de CaCO_3 . Aunque se piensa que estas algas son algas marinas, también son bastante comunes en aguas dulces; sin embargo, tienden a limitarse al agua corriente. No por el simple hecho de que las algas rojas se estudian al último en muchos cursos y textos de ficología se debe suponer que este grupo de algas sea el más evolucionado. A pesar de su tamaño y ciclos de vida bastante complejos, las algas rojas tienen cierto número de características que se pueden considerar como primitivas, incluyendo la falta de células flageladas, la estructura simple del cloroplasto y la presencia de ficobilinas. En la mayoría de las especies, el talo consta de una agregación de filamentos, más que de un parénquima verdadero.

Hoff y Snell¹⁸ manifiesta que el género *Porphyridium* es el de más fácil cultivo para la utilización como alimento en acuicultura.

4.4.3 Phaeophyta (Algas pardas). Marshall¹⁹ afirma que:

Las algas pardas, como las algas rojas, se encuentran principalmente en hábitats marinos. También carecen de clorofila *b*, pero tienen otro tipo llamado clorofila *c* y pigmentos fotosintéticos especiales cuya coloración oscila entre amarillo y rojo intenso. Sus células reproductoras suelen tener flagelos. Las algas pardas se conocen por su crecimiento rápido, su inmenso tamaño y por sus tejidos relativamente complejos. Ciertas laminarias alcanzan una longitud de 30 m y tienen un tejido conductor primitivo. Especies de un género habitual de aguas templadas son famosas por flotar en masa en el mar de los Sargazos, al norte del océano Atlántico.

El alginato, un polisacárido que se obtiene de los feofitos, se usa y comercializa del mismo modo que el agar o el carraguín. Las algas pardas son también fuente de vitaminas y minerales y se utilizan como fertilizantes. Algunas especies (como el *kobu*) constituyen un aporte alimenticio importante.

4.4.4 Bacillariophyta (Algas diatomeas). Según Álvarez²⁰.

Las diatomeas en general tienen un citoplasma provisto de núcleo, vacuolas, cloroplastos y a menudo pirenoideos. Los cromatóforos varían en número y en forma, se presentan de color amarillo pardo y, a veces,

¹⁸ HOFF y SNELL, Op. cit., p. 18.

¹⁹ MARSHALL, Op. cit., p. 24.

²⁰ ÁLVAREZ, Op. cit., p. 6.

en tono verdoso, características todas que están supeditadas a factores del medio externo como la intensidad de luz solar, clase y cantidad de nutrientes y minerales. Los pigmentos principales encerrados en los cromatóforos son las clorofilas, xantofilas y los carotenoides. La pared celular de las diatomeas es celulósica e impregnada con silicio. Muchas diatomeas son mótilas y también se desplazan con el movimiento de las corrientes marinas, vertical y horizontalmente. Su reproducción puede ser por división celular directa, por auxosporas-cigote formado por la unión, conjugación de dos células disminuidas al punto crítico y por microsporas (esporas desarrolladas en un microsporangio).

Este mismo autor, menciona que casi todas las especies marinas son formas bénticas que se presentan accidentalmente en el plancton, ya que muchas de estas especies de diatomeas viven sobre sustratos o fondos, se desprenden y van a la superficie en medio de la corriente. A esta división corresponden un gran número de especies de algas unicelulares microscópicas (diatomeas) de gran uso en los laboratorios marinos comerciales, como son la *Melosira sp.*, *Stephanopyxis sp.*, *Podosira sp.*, *Skeletonema sp.*, *Thalassiosira sp.*, *Rhizosolenia sp.*, *Chaetoceros sp.*, *Bidulphia sp.*, *Amphora sp.*, *Nitzschia sp.*, *Navicula sp.*, *Pleurosigma sp.*, *Gyrosigma sp.*, *Surirella sp.*, Las diatomeas bénticas revisten importancia nutricional cuando son empleadas directamente como alimento para postlarvas y juveniles de camarón y peces.

4.4.5 Chlorophyta (algas verdes). De acuerdo con Jiménez²¹:

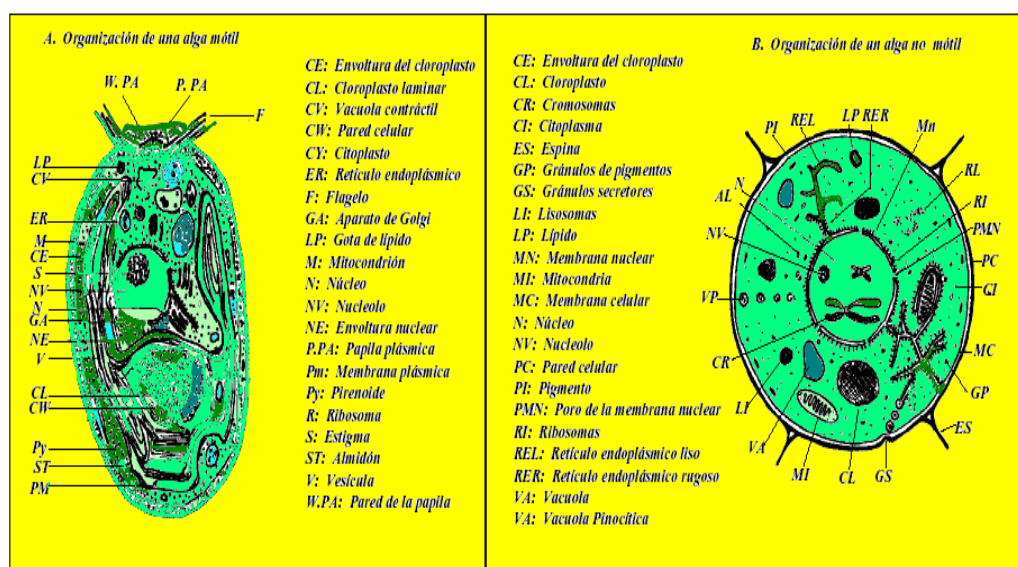
A pesar de las diferencias entre las divisiones de algas todas comparten un grupo de características comunes: poseen clorofila y son fotosintéticas. Todas requieren oxígeno para la respiración y lo producen en la fotosíntesis. Todas se diferencian de las plantas superiores por cuanto no poseen ramas, frutos, etc., con la excepción de las Laminarias "kelp", que se fijan con raíces y presentan ramificaciones. Ninguna de las algas desarrolla sistemas de conducción. La estructura básica de las algas verdes es semejante al de las plantas superiores, por lo que se cree que éstas evolucionaron a partir de las primeras. Las algas verdes poseen un protoplasma que contiene un núcleo, nucleolo, vacuolas, ribosomas, mitocondrias, cloroplastos y retículo sarcoplásmico. Sus cloroplastos contienen abundante clorofila *a*, propio de las células eucarióticas fotosintéticas y clorofila *b* que también está presente en

²¹ JIMÉNEZ, R. Acta oceanográfica del pacífico. En: INOCAR. Ecuador. Vol. 2, No. 2 (Junio.1983). p. 8.

plantas superiores. También poseen xantófilas (pigmento amarillo) y carotenoides (pigmentos anaranjados) que son accesorios.

Las algas verdes poseen pirenoides que funcionan como depósitos de almidón y yacen dentro de los cloroplastos. Las manchas oculares se las encuentran en las algas verdes mótils y las conforman gránulos compactados de carotenoides. Posiblemente estas manchas tienen respuesta positiva a la luz. Su motilidad se debe a la presencia de flagelos que están en número de 2 - 4 y de igual tamaño (Figura 5).

Figura 5. Organización de un alga.



ÁLVAREZ, Op. cit., p. 3.

Las formas de las células son múltiples y los modos de reproducción son variados. En muchas clorofitas multicelulares la reproducción asexual es por fragmentación de colonias.

Las esporas asexuales también se dan en muchas algas verdes, siendo las mitosporas aquellas producidas por mitosis. Si las esporas son mótils (flageladas) se llaman zoosporas. La reproducción sexual también ocurre en casi todas las clorofitas, siendo una excepción la *Chlorella sp* en la que no se ha visto sexualidad. En lo que respecta a la reproducción sexual de las clorofitas se dan tres variaciones en base a los gametos: *Isogamia*, *Anisogamia* y *Oogamia*. La anisogamia y la oogamia son características en plantas más desarrolladas.

Este autor además afirma que en todos los casos los gametos son producidos en células llamadas gametangias, que cuando son liberados, si son móviles, nadan en el agua antes de combinarse con sus parejas para formar los cigotos. Las algas verdes presentan tres grandes grupos en base a su organización celular:

- Células móviles individuales o colonias.
- Colonias compuestas de células no móviles.
- Algas de organización multinucleada tubular.

Un ejemplo del primer grupo está representado por el género *Chlamydomonas*, alga unicelular biflagelada de agua dulce con una tremenda velocidad de multiplicación (asexual) cuando los nutrientes, la luz y la temperatura son óptimos. Una sola célula puede dividirse hasta ocho veces en un día. El segundo grupo incluye formas unicelulares y filamentosas multicelulares, un ejemplo es el género *Chlorococcum*, alga unicelular de agua dulce que se reproduce asexualmente por formación de zoosporas. Un ejemplo del tercer grupo lo constituye la *Acetabularia*, que es un alga de agua salada multicelular. Su reproducción asexual ocurre con la formación de zoosporas que dan origen a un cigote y finalmente la planta.

Hoff y Snell²² mencionan algunas Clorofitas utilizadas como alimento en acuicultura: *Tetraselmis*, *Chlamydomonas*, *Nannochloris*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus* y *Selenastrum*.

4.5 CONDICIONES DE LABORATORIO PARA CULTIVO DE ALGAS

4.5.1 Factores físicos. Los principales factores físicos a tener en cuenta en el cultivo de algas, son descritos por Sipaúba y Rocha²³ de la siguiente manera:

➤ **Luz.** La condición óptima para el crecimiento del fitoplancton dependerá de la intensidad de luz, de la duración y de la longitud de onda a las cuales las células algales están expuestas. Para esto, salas con luminosidad controlada pueden ser utilizadas para el crecimiento de los cultivos y en la ausencia de luz los cultivos deben ser colocados junto a las ventanas.

Estos mismos autores agregan que para la preservación de las algas, lo ideal es una fluorescencia entre 530 y 1.000 lux para crecimiento lento,

²² HOFF y SNELL, Op. cit., p. 15.

²³ SIPÚBA y ROCHA, Op. cit., p. 18.

no habiendo necesidad de replicar por un periodo de tres meses a un año, dependiendo de la especie. De esta manera, la luz blanca fluorescente es la más utilizada en estos casos, puesto que la luz incandescente o solar directa puede causar problemas a los cultivos debido al calor que liberan.

Es así que esta misma autora recomienda que el fotoperíodo sea de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz o 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz, dependiendo de las líneas de cultivo y el fotoperíodo al cual estuvieron previamente aclimatadas.

De acuerdo con el tipo de cultivo deseado, puede ser empleado las siguientes intensidades luminosas:

- Cultivo Stock 1.000 lux
- Trabajos de fisiología 3.500 lux
- Cultivos en larga escala (10L) 5.200 lux

➤ **Temperatura.** Es uno de los factores que mas afecta la tasa metabólica de los organismos. los óptimos de temperatura para el crecimiento de muchos de los organismos del fitoplancton, marinos y de agua dulce, están dentro del límite de 18 a 25°C, a unque las formas de aguas frías tienen generalmente óptimas menores. Cuando se pretende transferir el inóculo algal de la sala de cultivo para un cultivo en larga escala, se recomienda que la transferencia sea realizada en horas de la mañana, con el fin de evitar el estrés que podría ser causado por los cambios de temperatura. por lo tanto la temperatura constante es deseable para realizar un cultivo y puede ser obtenida por la instalación de aire acondicionado, el cual mantienen una temperatura aproximadamente constante, con variaciones de más o menos 1 °C.

➤ **Aireación.** Se debe utilizar aireación directa con aire comprimido para volúmenes mayores que un litro, siendo que, para volúmenes menores, los intercambios gaseosos entre el tamaño de la tapa y la superficie del cultivo son suficientes. En erlenmeyers de 1,0 L el volumen ideal del cultivo es de aproximadamente 400 ml, con un máximo de 500 ml.

Los cultivos en stock no deben ser aireados o agitados, sin embargo deben ser mantenidos vivos. Obteniéndose así, un crecimiento moderado, evitándose la replicación constante. Para cultivos de gran escala, la aireación directa del medio es indispensable, puesto que la corriente de aire enriquece al medio con CO₂, sin embargo el aire contiene solo 0,03% de carbono. Así las células son mantenidas en suspensión, el suministro de carbono inorgánico es asegurado y el pH, estabilizado. La agitación producida por un flujo gaseoso permite la

manutención de las células en suspensión, asegurando condiciones idénticas de crecimiento para todas.

4.5.2 Factores de nutrición. Según, Krauss citado por Guerrero y Villegas²⁴, el medio químico es definido como una solución diluida, de la cual es extraída por las algas todo el materia bruto necesario para la estructura y la síntesis protoplasmática.

Varios son los nutrientes requeridos por las algas, unos son denominados macronutrientes o nutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas, generalmente encontrados en cantidades significativas (carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, silicio, calcio, magnesio, hidrogeno, oxígeno y azufre), otros son denominados micronutrientes o nutrientes requeridos en pequeñas cantidades por los organismos.

➤ **Carbono.** Según Fiala²⁵, la mayoría de las especies fototrópicas utilizan alguna fuente de carbono o gas carbónico, en la forma de gas libre o bicarbonato, dependiendo del pH del medio. Estas algas constituyen la mayoría de las especies del fitoplancton.

Ab'Saber establece:

Especies del fitoplancton y las algas desprovistas de pigmentos fotosintéticos, en algunos casos, utilizan el CO₂ y frecuentemente, obtienen energía de la oxidación de sustrato orgánico, como carbohidratos, sustituyendo heterotroficamente por largos periodos. Muchas algas cultivadas en laboratorio son capaces de oxidar el carbono orgánico y tener capacidades fotosintéticas, esa alga puede ser considerada desde el punto de vista fisiológico, como quimiotróficas facultativas²⁶.

➤ **Nitrógeno.** Para Boyd, citado por Álvarez²⁷:

²⁴ GUERRERO, R. D. y VILLEGAS, C.T. Report of the training course on growing food organism for fish hatcheries. Philippines, South China: Sea Fisheries Development/Coordinating Programam, 1982. p. 45

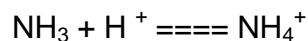
²⁵ FIALA, M. Phytoplankton: biomasse, production, numération et culture. Jacques, Antillas Francesas: UNESCO, 1979. p. 54.

²⁶ AB'SABER, A. N.; FORNERIS, L.; MARINO, M. C.; ROCHA, O.; MATSUMURA, T.; SCHAEFFER, Y.; VUONO, Y. S. e WATANABE, S. Glosario de ecología. São Paulo: Editora da ACIESP, 1987. p. 71.

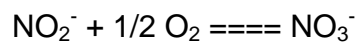
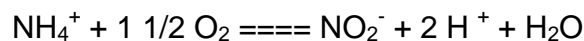
²⁷ ÁLVAREZ, Op. cit., p. 13.

La fijación del nitrógeno molecular (N₂) atmosférico por procesos biológicos, meteorológicos o industriales es el principal recursos de nitrógeno inorgánico para los sistemas acuáticos. El nitrógeno está combinado en el agua en la forma de nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻), amonio (NH₄⁺) y trazas de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno. La mayoría del nitrógeno de los compuestos orgánicos existe como grupos aminos en las proteínas que provienen de los alimentos no ingeridos, excretas, organismos en descomposición, etc. y a través de los constantes procesos microbiológicos.

Estas proteínas son deaminadas con formación de NH₄⁺-N como resultado. Este proceso se conoce como amonificación. Este amonio es liberado al ambiente para su mineralización o es asimilado por los tejidos microbianos. La amonificación es un proceso heterotrófico que ocurre bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas:



Este NH₄-N puede ser usado por plantas acuáticas, o nitrificado (NO₃⁻) y también utilizado por las algas. En la nitrificación tenemos:



La oxidación del NH₄⁺-N a NO₃⁻ es realizado por las bacterias quimo-autotróficas, las nitrosomonas y las nitrobacter, que emplean el NO₂⁻ como fuente energética y CO₂ como fuente de carbono. Este proceso es acelerado cuando el pH del agua está entre 7 y 8, y la temperatura entre 25 y 35 °C.

➤ **Fósforo.** De igual manera Álvarez argumenta:

El fósforo se encuentra en el agua casi completamente como iones ortofosfato (PO₄H₂⁻ y PO₄H₂⁻) con pequeñísimas concentraciones de fósforo orgánico. Este elemento al igual que el nitrógeno es importante para el crecimiento de las algas, los que junto a otros constituyentes esenciales son comúnmente conocidos como “nutrientes”. La concentración de estos nutrientes es mayor en la profundidad que en las aguas superficiales donde se da un rango de 1 a 120 µg/l de NO₃ - N y de 0 a 20 µg/l de PO₄-P. En las aguas profundas estas concentraciones pueden llegar a 200 µg/l de NO₃-N y 40 µg/l de PO₄-P debido a la producción de nutrientes por descomposición bacteriana de la materia orgánica depositada en el fondo. Las concentraciones relativas de nitrato y fosfato permanecen constantes. El radio N:P normalmente es de 7:1 en

peso y de 15:1 en iones. Esta estrecha relación indica que los iones son absorbidos por los organismos vegetales (algas) y animales (zooplankton). En el caso del fósforo las aguas naturales responden a la adición de este elemento con una mayor producción de plantas. Experiencias con fertilización de estanques también sugieren que la aplicación de fosfatos incrementa la productividad primaria de los mismos. Aunque el fósforo es un constituyente menor del agua, sin embargo tiene gran importancia biológica, sobre todo si lo analizamos dentro de la acuicultura donde lo consideramos como el elemento que más frecuentemente limita la productividad en un ecosistema acuático natural o en un estanque²⁸.

- **Potasio.** De igual manera el mismo autor manifiesta que es un nutriente esencial para todas las algas, las cuales lo requieren en altas cantidades para su crecimiento y desarrollo. Por esto el potasio es un macronutriente o nutriente primario al igual que el nitrógeno y el fósforo. Asimismo el potasio es un elemento nutritivo que participa de manera importante en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos vitales en el metabolismo. Fomenta la fotosíntesis activando las enzimas que promueven la transferencia de energía, la generación ATP y estimula la síntesis de los azúcares, almidón, proteínas y otros compuestos orgánicos.
- **Micronutrientes.** Marshall²⁹ menciona que aunque no se consideran factores limitantes tan importantes como el N, P, K, en ocasiones aparecen otros elementos inorgánicos en concentraciones limitantes, ya sea como deficiencia o a niveles tóxicos. Los elementos que se requieren en cantidades muy pequeñas aparecen por lo general a niveles suficientes en las aguas eutróficas, pero pueden ser deficientes en las oligotróficas. Los experimentos de enriquecimiento han demostrado que la productividad se intensifica al añadir magnesio, cobre, zinc, cobalto, molibdeno, entre otros. Además de estos compuestos también pueden ser requeridas algunas vitaminas como B₁₂, B₁ (tiamina) y biotina.

4.5.3 Factores químicos. De acuerdo con Cole³⁰:

El aumento del pH conlleva a la decantación del hierro (Fe(OH)₃) y puede ocasionar la aglomeración de algas absorbidas al precipitado. Además del hierro, sales de calcio y aluminio decantan fácilmente y es necesario tamponar el pH bajo del medio, o utilizar CO₂ puro en vez de aire

²⁸ Ibid., p. 13.

²⁹ MARSHALL, Op. cit., p. 68.

³⁰ COLE, G.A. Textbook of limnology. London: CV Mosby, Canada 1979. p. 26.

comprimido en la aireación. El CO₂ disuelto en el agua disminuye el pH entre 4,5 y 6,3, punto en el que el agua alcanza el pH 6,35, formando así HCO₃⁻ que en estas condiciones desempeña acción tampón controlando la variación del pH.

4.6 CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN ALGAL

Según Álvarez³¹ el crecimiento de las algas puede darse en:

- **Fase de ajuste.** Es la etapa de adaptación que sufren las algas a las nuevas condiciones del cultivo. Esta fase es corta y no hay incremento neto de la población.
- **Fase exponencial.** Aquí las células se duplican sucesivamente en intervalos iguales de tiempo. En esta fase, K es constante.

$$K = (\log_2 N_2 - \log_2 N_1) / (T_2 - T_1)$$

Donde K es la constante de reacción o tasa específica de crecimiento (1/días), log es el logaritmo en base 2, N es la medida de la biomasa o número de células y T es el tiempo.

- **Fase de retardo o declinación.** En esta etapa el tiempo requerido para duplicar la población aumenta, reduciéndose la tasa de crecimiento. Esto se debe a que los nutrientes están disminuidos en el medio, hay un aumento en la concentración de los metabolitos y una reducción de la actividad fotosintética por el incremento de la densidad de la población, que reduce la disponibilidad de luz por unidad de célula.
- **Fase estacionaria.** Esta fase es corta y no hay un incremento neto de la población. La tasa de crecimiento se compensa con la de mortalidad celular, de tal modo que $\mu = d$, donde μ es la tasa de crecimiento y d es la tasa de mortalidad.
- **Fase de muerte.** Aquí la tasa de mortalidad supera a la tasa de multiplicación celular, es decir que $d > \mu$. El crecimiento sostenido de una población depende de la interacción mutua de factores físicos, químicos y biológicos; dicho crecimiento se expresa gráficamente como el incremento en función del tiempo de la biomasa o número de células dentro de un cultivo. El cambio diferencial se representa como:

$$dN / dT = F (N)$$

³¹ ÁLVAREZ, Op. cit., p. 6.

Donde F (N) expresa la tasa de cambio de la población en el tiempo. Como esta función depende de los factores físicos y químicos del medio externo, el resultado cuando el espacio disponible y los nutrientes son limitados es una curva sigmoidea. En condiciones constantes de crecimiento cuando la luz y los nutrientes no cambian en el tiempo F (N) es proporcional al número de organismos:

$$F(N) = N K = N (\mu - d)$$

4.7 MEDIOS DE CULTIVO

Según Tacon³², varias formulaciones de medios de cultivo han sido utilizadas para el cultivo de algas, dependiendo de la necesidad de nutrientes de las especies algales cultivadas. Generalmente, la composición química de los medios definidos es derivada y modificada a partir de formulaciones básicas de medios pioneros en la ficología. Los cambios han sido adoptados a partir de resultados obtenidos en experimentos realizados con requerimientos o limitaciones de nutrientes. Estas investigaciones son básicas en la ficología, no solo para propuestas académicas, si no que también para producción en masa, la cual es necesaria en prácticas de acuicultura.

Para Álvarez³³, los medios generalmente son preparados a partir de soluciones stock previamente mezcladas. Las alícuotas de estas soluciones son medidas y agregadas a un volumen dado de agua. En algunos casos los componentes indicados son pesados y agregados directamente al volumen de agua, quedando así preparado el medio. Los procedimientos incorrectos pueden causar precipitaciones, especialmente nitratos y fosfatos. Las soluciones stock pueden prepararse y almacenarse en frío por largo tiempo, para lo cual se recomienda el uso de recipientes con tapa de vidrio. Todas estas soluciones deben prepararse con agua destilada.

Según la FAO³⁴, las principales fórmulas utilizadas van desde el agua de Miguel, que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de End-Schreiber de 1934, hasta fórmulas específicas para familias como la fórmula del laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas, Provasoli *et al.*, 1975; Matthiesen &

³² TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual II: Nutrient sources and composition. Brasíla: FAO, 1987. p. 20.

³³ ÁLVAREZ, Op. cit., p. 30.

³⁴ ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura [online]. Roma: FAO, 2005 (citado el 15 de febrero de 2006). Disponible en Internet: <http://www.fao.org/docrep/003/AB4735/AB73s01.htm>.

Thorner, 1966; Mclachlan, 1973; Guillard F., 1973; Droop, 1975, 1979; Schoene, 1982, etc. Las principales formulaciones de los medios de cultivo, tanto de mantenimiento de cepas como de producción masiva (minerales, enriquecidos y orgánicos), se describen en Anexo A.

Según Sipaúba³⁵, hay otros medios que incluyen en su composición sustancias orgánicas (vitaminas y aminoácidos) necesarias para especies de algas auxotróficas, ósea que no sintetizan por medio de la fotosíntesis estos compuestos, lo que resultan factores que pueden limitar el crecimiento, como es el caso de las Chrysophyceae y de algunas Bacillariophyceae.

Para Sipaúba³⁶, los medios de cultivo se pueden describir como:

- **Indefinidos.** Medios de cultivo compuestos a partir de agua dulce, enriquecidos con sustancias orgánicas e inorgánicas no determinadas, como por ejemplo extracto de suelo.
- **Semidefinidos.** Semejantes al anterior, entretanto, la composición de las sustancias inorgánicas es conocida.
- **Definidos.** Medios preparados a partir de agua destilada, a la cual son adicionados los nutrientes, de acuerdo con los diferentes medios existentes.

4.7.1 Macrófitas. Trabajos realizados por Rodrigues y Rodrigues³⁷ vienen evaluando la posibilidad del aprovechamiento de las macrófitas acuáticas en actividades económicas. Utilizando *Eichhornia crassipes* en el tratamiento de efluentes provenientes de lavaderos de caña de azúcar, la biomasa excedente es aprovechada como abono orgánico en el propio cultivo de la caña de azúcar y como suplemento alimenticio para bovinos.

En relación con la utilización de plantas acuáticas en la alimentación de peces, Sayed³⁸ estudió *Azolla pinnata* como sustituto de harina de pescado en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), constatando un incremento de peso de esta especie. Resultados semejantes fueron obtenidos para tilapia rendalli alimentada

³⁵ SIPÚBA y ROCHA, Op. cit., p. 50.

³⁶ Ibid., p. 50.

³⁷ RODRIGUES, N. S. y RODRIGUES, M. M. Fito-depuração de água de lavagem de cana pelo aguapé. Brasil. STAB, 1989. p. 49.

³⁸ SAYED, E. Effects of substituting fish meal with *Azolla pinnata* in practical diets for fingerling and adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Brazil: Aquaculture Fish Management, 1992. p. 67.

con *Azolla microphylla*. Entretanto, Naegel³⁹ demostró que más de 30% de la dieta a base de harina de pescado para tilapia nilotica puede ser sustituida por harina de *Azolla* seca. En cuanto Appler⁴⁰ halló que cerca del 20% de harina de pescado utilizada en la dieta alimenticia de *Oreochromis niloticus* y *Tilapia zillii* puede ser sustituida por la planta acuática *Hydrodictyon reticulatum*, sin efecto adverso sobre el crecimiento de los peces.

Estudios realizados por Ganzaga⁴¹ demostraron que *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* y *Salvinia molesta* presenta valores superiores a 90% de agua en sus tejidos, proporcionando una reducción del aprovechamiento de este vegetal después del secado. Además el uso separado y único de cualquiera de las especies de macrófitas, probablemente no irán a suplir las necesidades de proteína, siendo indicadas como un suplemento alimenticio o como un ítem mas en la formulación del alimento concentrado.

Este mismo autor, según los resultados de la composición química, sugiere la remoción de las raíces y rizomas de *Eichhornia crassipes* y *salvinia molesta*, visualizando apenas el aprovechamiento de sus laminas foliares, puesto que es allí en donde hay mayor actividad enzimática de estructuras fotosintéticas y por lo tanto hay mayor concentración de proteína, carbohidratos y lípidos.

Según Strano⁴² la parte sumergida de estas especies de macrófitas puede ser utilizada en la producción de biogás o en el abonado de suelos. Asimismo el autor manifiesta que la separación de la raíz con la parte foliar no es necesario puesto que no trae ningún efecto negativo en la preparación de fertilizantes o concentrados.

4.7.2 Composición del medio de cultivo con extracto de macrófitas (*Eichhornia crassipes*). Según Ganzaga⁴³, en diferentes investigaciones realizadas, presenta las concentraciones que se indican en la Tabla 1.

³⁹ NAEGEL, L. C. *Azolla meal* as a supplemental feed ingredient for tilapia. In: International conference on Wetland system for water Pollution Control, 6th. Águas de São Pedro, Brazil: Preceedings, 1998. p. 609.

⁴⁰ APPLER, H.N. Evaluation of *Hydrodictyon retilatium* as a protein source in feeds for *Oreochromis* (*Tilapia*) *niloticus* and *Zillii*. In: Jornal Fish Biology. Brazil. Vol. 27, No. 5 (April. 1895). p. 327.

⁴¹ GANZAGA, Henry Gustavo. Utilização de macrófitas aquáticas fluctuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) no tratamento de efluentes de piscicultura e possibilidades de aproveitamento da biomassa vegetal. Tese Mestrado. Jaboticabal, Brasil: Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2001. p. 46.

⁴² STRANO, H.C. Obtenção e caracterização do cencentrado protéico de aguapé (*Eichhornia crassipes*): Piracicaba. Tese (Mestrado em Agronomia). Brasil: Universidade de São Paulo, 1987.p 47.

⁴³ GANZAGA, Op. cit., p. 30.

4.7.3 Medio de cultivo NPK. De acuerdo con Sipaúba⁴⁴, una de las formas de reducir los costos de producción en el cultivo de algas, consiste en la utilización de medios de cultivo alternativos como es el uso de abono químico. La misma autora en investigaciones de crecimiento de algas chlorophyceae, con medios de cultivo inorgánicos como NPK en proporciones de 20:5:20, 4:14:8, 12:6:12 y 10:10:10, encontró que la mejor proporción para el crecimiento vigoroso de algas es 20:5:20, cuyos resultados fueron adoptados en esta investigación.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo a base de extracto de macrófitas

Composición	Concentración en mg/L
Nitrógeno total	95,0
Fósforo	91,0
Carbono	199,0
Manganeso	60,0
Magnesio	3,9
Hierro	2.127,5
Potasio	56,0
Calcio	1,7
Cobre	0,05

4.7.4 Medio de cultivo CHU₁₂. CHU⁴⁵ menciona que este medio es compuesto por varias sustancias que agregadas en proporciones definidas generan un buen crecimiento y desarrollo de algas (Cuadro 1), probablemente pueda estar relacionado con los nutrientes de nitrógeno, fósforo y potasio en proporciones de 6:1:12, siendo el más efectivo en la mayoría de los laboratorios de fitoplancton.

4.8 FORMAS DE CULTIVO

Según Alvarez⁴⁶, las formas de cultivos se pueden clasificar de la siguiente manera:

- **Por su naturaleza.** Pueden ser:

⁴⁴ SIPAÚBA, Lúcia. Op. cit., p. 51.

⁴⁵ CHU, S. P. The influence of mineral composition of the medium of the grown of the planktonic algae. In: J. Ecol. Brazil. Vol. 30, No. 6 (July. 1942). p. 30.

⁴⁶ ALVAREZ, Op. cit., p. 35.

- **Cultivo intensivo.** Aquí los factores de crecimiento se mantienen bajo un sistema controlado, de tal manera que se pueda obtener una máxima respuesta en la producción.

- **Cultivo extensivo.** En esta clase de cultivo sólo se controla las variables más accesibles en su manejo, tales como las características del medio y la densidad del cultivo.

➤ **Por la forma de cosechar.** Se clasifican en:

- **Cultivos continuos.** La población algal, las características químicas del medio, la temperatura y finalmente la luz son mantenidas en un valor constante por períodos prolongados, procurando un flujo sostenido de requerimientos del producto.

- **Cultivos batch.** Estos cultivos son intermitentes, se implementan de una sola vez y son cosechados completamente después de que la producción algal alcance un nivel apropiado, medido en número de células por ml. En el momento de la cosecha el cultivo debe estar en la fase exponencial.

- **Cultivos semicontinuos.** Aquí se cosecha una parte del medio según la producción y se renueva el volumen cosechado por medio de un cultivo fresco.

➤ **Por la pureza del cultivo.** Entre estos estarían:

- **Cultivos axénicos.** Son cultivos libres de bacterias y estériles, para mantener la productividad por un período prolongado de tiempo. Estos cultivos son delicados y de cuidado. Requieren todo el tiempo de material estéril y asepsia.

- **Cultivos monoespecíficos (clónales).** Aquí la población de microalgas está parcialmente contaminada por otros microorganismos como bacterias y protozoarios. Son empleados en cultivos del tipo batch y extensivos.

4.9 PROCEDIMIENTO GENERAL EN EL CULTIVO DE LAS MICROALGAS.

Janet⁴⁷ menciona algunos procedimientos para el cultivo de microalgas:

⁴⁷ JANET, R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. In: J. Ecol. Brazil. Vol. 30, No. 6 (ene.-feb. 1993). p. 20.

- **Mantenimiento de cepas.** En esta etapa las cepas (stocks) de algas se mantienen en fiolas o matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo y/o en placas con agar. El medio de cultivo se prepara según el procedimiento descrito para cada caso y según la especie, sea ésta de mar o de agua dulce. Esta etapa tiene carácter de cultivo axénico por lo que un máximo de cuidado se debe tener para no contaminar las cepas. La intensidad de luz debe estar entre 500 y 1.000 lux y la temperatura de 15 °C constante. La cepa se mantiene en una incubadora que brinda todas estas facilidades. Las cepas también se mantienen en tubos de ensayo con tapa rosca o de algodón de 20 centímetros cúbicos.

- **Cultivo inicial.** El cultivo inicial se desarrolla en fiolas o matraces de 500 cc con 250 ml de medio. La inoculación de las algas se realiza cuando las fiolas esterilizadas han alcanzado la temperatura ambiente, transfiriendo asépticamente bajo una campana de luz UV, un volumen de 1 a 5 ml de cepa al medio fresco. La boca de estos recipientes se debe flamear para “quemar” microorganismos que pueden ingresar al interior. Luego de la inoculación las fiolas son puestas en la estantería iluminada junto a uno de los matraces viejos para observar luego de uno a dos días el crecimiento rápido del nuevo cultivo. Estos cultivos deben agitarse manualmente en forma periódica y suavemente, a fin de variar la posición de las células. La intensidad de luz debe estar entre 1.500 y 2.000 lux.

- **Cultivo intermedio.** Esta etapa se desarrolla en fiolas o matraces de 1.000 a 2.000 cc, con medios del 60 al 65% de la capacidad total. Se transfieren los antiguos cultivos que hacen de stock (cultivo inicial) de 4 a 7 días. Esta inoculación se hace bajo el mismo esquema del caso anterior evitando que las algas sedimentadas pasen al nuevo medio. Se transfieren aproximadamente del 80 al 90% del volumen total. Los nuevos recipientes son agitados con aire filtrado a máximo 1,0 µm. La temperatura se puede mantener a 18 °C, igual que para la etapa anterior. La intensidad de luz puede ajustarse entre 2.000 y 2.500 lux.

- **Cultivo de 10 a 20 L (Carboys).** Los cultivos intermedios son empleados como inóculo para los recipientes de 10 a 20 litros. El agua antes de ser enriquecida con los nutrientes es bien filtrada a 1µm y esterilizada con UV. Dejar en reposo el agua por una hora para reducir los peróxidos generados, fertilizar e inocular. Estos peróxidos afectan los pigmentos fotosintéticos de las algas. Flamear la boca de cada recipiente y tomar las precauciones del caso para prevenir la contaminación, evitando además transferir las algas sedimentadas de los cultivos intermedios. La intensidad luminosa se ajusta entre 2.000 y 5.000 lux. La temperatura se mantiene entre 18 y 20 °C en cultivos batch, las poblaciones algales alcanzan densidades mayores a los cuatro millones de células por mililitro. Filtrar el aire como en el caso anterior.

➤ **Cultivo masivo.** El grado de contaminación bacteriana es mayor en esta etapa. La iluminación por lo general se coloca en la parte superior de los recipientes y la intensidad puede estar entre 4.000 y 5.000 lux. Los recipientes para estos cultivos son blancos en su parte interior o son transparentes en su totalidad. Los inóculos son obtenidos de la etapa anterior que presentan un crecimiento rápido y carecen de sedimento. En los cultivos masivos la aireación no es filtrada y generalmente se desarrolla externamente, aprovechando la iluminación del sol.

4.10 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Álvarez⁴⁸ citando a Uribe menciona:

La aplicación de los siguientes métodos para una colecta natural de algas microscópicas produce cultivos monoespecíficos o axénicos. Aunque tales métodos son sencillos sin embargo, la preparación de cultivos axénicos requiere paciencia y perseverancia.

El autor hace referencia, que entre los métodos de aislamiento más usados se nombran:

- Pipeta capilar (simplificado)
- Rallado en agar
- Aislamiento en agar
- Rociado en plato

Así mismo, los métodos de purificación más conocidos son:

- Lavado
- Antibióticos
- Potasio telurito

El autor asegura que los métodos de aislamiento y purificación a describirse son generales y aplicables a muchas especies algales, no están dirigidos para especies específicas. Las fuentes de algas para aislamiento sólo incluyen muestras planctónicas y se refieren a colecciones naturales.

➤ **Métodos de aislamiento**

Es necesario el aislamiento de una unidad algal y la colocación de la misma en un medio de cultivo adecuado para su multiplicación, a fin de establecer un cultivo unialgal (monoespecífico). El término "unidad" se

⁴⁸ ALVAREZ, Op. cit., p. 37.

refiere a cualquier célula, colonia, filamento, pieza o parte del talo y cuerpo reproductivo. Un cultivo unialgal establecido es necesario para preparar un cultivo axénico. De todos los métodos nombrados para aislamiento el de pipeta capilar y el de rayado en agar son los más empleados para este fin. Las algas menores a 10 μ difícilmente son aisladas con pipeta capilar. Las filamentosas pueden aislarse con pipeta capilar.

- **Pipeta capilar (simplificado).** La tapa de una caja Petri invertida se emplea como área para aislamiento:

a) Coloque de 10 a 15 gotas de una colección natural en el centro de la tapa invertida.

b) Coloque ocho gotas de un medio de cultivo adecuado en ocho posiciones rodeando la colección natural. Marque primero con número la posición de cada gota por la cara interior de la tapa.

c) Usando una pipeta Pasteur nueva estirada y estéril, transfiera las algas deseadas de la colección natural a la gota número uno del medio de cultivo.

d) Transfiera una sola alga desde la gota número uno hasta la gota número dos.

e) Repita este proceso de transferencia con el resto de las gotas del medio de cultivo hasta asegurarse que una sola unidad algal requerida está presente en una gota.

f) Transfiera esta unidad algal a tubos de ensayos que contienen el medio de cultivo esterilizado. Como precaución, esta unidad algal en una gota puede ser transferida primero a un fragmento de un cubreobjeto que descansa en un portaobjeto, para examinarla con el microscopio compuesto. El fragmento con la gota y la unidad es entonces transferido al tubo de ensayo con el medio de cultivo para su desarrollo. De esta manera se asegura que una sola unidad algal es aislada y que efectivamente va al medio de cultivo.

g) Coloque los tubos bajo condiciones favorables para crecimiento.

- **Rayado en agar.** Este método brinda mayor facilidad para aislar algas de tamaño igual o menor a 10 μ m de diámetro. También produce cultivos axénicos.

- a) Prepare cajas Petri (vidrio o plástico) de 100 x 15 mm, conteniendo medio de cultivo solidificado con 1,0 a 1,5% de agar.
- b) Coloque dos gotas de colección natural cerca de la periferia en el medio solidificado. Con el asa de platino (punta esterilizada sumergida en alcohol y quemada), bajo criterio de asepsia, rayar en paralelo la muestra de la colección en el agar.
- c) Cubra el plato, inviértalo e incubar de 4 a 8 días bajo adecuada condición de crecimiento.
- d) Pasado este tiempo observar directamente en el estéreomicroscopio el rayado y seleccione las colonias deseadas que están libres de otros organismos.
- e) Remueva las colonias seleccionadas usando una pipeta Pasteur estirada estéril o el asa de platino y colóquelas en una gota de medio de cultivo estéril sobre un cubreobjeto. En un microscopio compuesto observe las unidades de algas deseadas y que sean de la misma especie.
- f) Repita el procedimiento de rayado de una sola zona, constatar y nuevamente incubar para que se formen las colonias. Este segundo rayado reduce la contaminación por bacterias y asegura agrupaciones de unidades algales de la misma especie.
- g) Transfiera las unidades algales de una colonia a un medio líquido (tubo de ensayo) o solidificado.
- **Métodos de purificación.** Unidades algales aisladas con pipeta capilar pueden presentar contaminantes asociados como bacterias. También el manejo prolongado de cepas de algas puede contaminarse en un momento con microorganismos que utilizan los mismos nutrientes del medio y cuando se desarrollan pueden afectar las algas. La presencia de microorganismos y bacterias contaminantes pueden detectarse con el microscopio compuesto o mediante prueba y análisis microbiológico conocido. Entonces es necesario eliminar o inhibir el crecimiento de dichos microorganismos *in situ* mediante procedimientos químicos. Se asume que todo aparato, equipo, implemento o medio de cultivo están esterilizados antes de ser usados.

• **Tratamiento con antibióticos.** Stein⁴⁹ menciona que se puede usar un antibiótico o una combinación de éstos para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos que se adhieren a las células algales. Para ello se sigue este procedimiento:

a) Preparar la solución de antibióticos, disolviendo primero 100 mg de penicilina G y 50 mg de sulfato de estreptomina juntos en 10 ml de agua destilada. Agregar a este preparado 10 mg de cloranfenicol que ha sido disuelto primero en 1,0 ml de etanol al 95% y agitar bien.

b) Filtrar esta solución rápidamente con filtro de membrana (0,2–0,45 μ).

c) Colocar 1,0 ml de cultivo algal contaminado en cada uno de los seis erlenmeyer (fiolas) de 125 ml que contienen 50 ml de medio de cultivo estéril.

d) Agregar uno de los siguientes volúmenes de la solución de antibiótico en cada erlenmeyer: 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 ml. Esto provee concentraciones de penicilina de aproximadamente 20 a 500 mg/L y los niveles que corresponden a los otros dos antibióticos.

e) Los erlenmeyers debidamente tapados son puestos bajo condiciones favorables de crecimiento.

f) Después de 24-48 horas asépticamente transfiera algunas unidades algales de cada erlenmeyer a tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo estéril y libre de antibióticos. Hacer esto por triplicado en cada intervalo de tiempo.

g) Colocar estos tubos en condiciones favorables de crecimiento. Chequear los tubos y hacer pruebas de contaminación bacteriológica después de 2 y 3 semanas. En ocasiones las algas pueden contaminarse con otras especies algales como las verde-azules y estas pueden ser eliminadas usando antibióticos. Medios de cultivo conteniendo 25 ppm de estreptomina pueden resultar efectivos. El uso de antibióticos requiere cuidado en la concentración de los agentes químicos y en la duración del tiempo en que las algas son expuestas al tratamiento.

⁴⁹ STEIN, J. Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements. Cambridge: University press, 1973. p. 103.

5. DISEÑO METODOLOGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Limnología y Producción de Plancton, del Centro de Acuicultura de la Universidad Estatal Paulista (CAUNESP), ubicado en la ciudad de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil (Figura 6) en las coordenadas geográficas 21°15'22" latitud sur, 48°18'58" longitud oeste, a una altitud de 575 m.s.n.m, precipitación anual 1.430 mm, temperatura promedio en el mes mas calido (Enero) de 23,8°C y en el mes mas frío (Junio) de 17,4°C.

Figura 6. Localización del centro de acuicultura en el contexto continental, nacional, estatal y local.



5.2 INSTALACIONES Y EQUIPOS

5.2.1 Laboratorios. El cultivo se realizó en el laboratorio de producción de plancton comprendiendo un área total de 28,43 m² de los cuales 16,05 m² son destinados para cultivo en gran escala y 12,38 m² para mantenimiento de cepas y almacenamiento de material estéril. Los pisos, paredes y mesones son de concreto cubiertos de cerámica blanca y dispuesto de una línea central de drenaje en la sala de cultivo a gran escala (Figura 7).

Figura 7. Laboratorio de producción de plancton



5.2.2 Equipos y utensilios. Para desarrollar la fase experimental del proyecto se emplearon los siguientes equipos:

- Balanza analítica, 0,0001 a 120 g, marca OHAUS, modelo TS1210
- Compresor de 4 HP.
- Aire acondicionado
- Desnatadora
- Liofilizadora
- Termómetro ambiental
- Manguera de aire

- Tubería de conducción de aire de dos pulgadas
- Autoclave
- Cámara de asepsia con luz ultravioleta
- Mechero de bunsen
- Microscopios
- Cámara de Neubauer
- Unidad de filtración al vacío
- pHmetro
- Oxímetro
- Termómetro
- Lámparas fluorescentes
- Luxómetro
- Desecador
- Erlenmeyers
- Tubos de ensayo
- Cajas de petri
- Balones volumétricos
- Pipetas de Pasteur
- Probetas
- Bastones de vidrio
- Pinzas
- Micropipetas
- Papel aluminio

Figura 8. Equipos del laboratorio de producción de plancton



5.3 PLAN DE MANEJO

5.3.1 Adecuación del laboratorio. Para la ejecución del proyecto se dispuso de una sala con 12,38 m² adecuada con estantes construidos con ángulos y mallas metálicas con cobertura epoxica, aire acondicionado con temperatura de 24°C, líneas de aire con filtros en la salida del compresor y un sistema de iluminación con lámparas fluorescentes (intensidad 3.700 lux) en la parte superior e inferior del cultivo (Figura 9).

Figura 9. Adecuación de los tratamientos en la sala de cultivo.



5.3.2 Material biológico. La microalga *Ankistrodesmus gracilis*, se colectó de las cepas del laboratorio de fisiología de algas del Departamento de Botánica de la Universidad Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. Esta microalga fue aclimatada en tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo CHU₁₂, después es trasferida a volúmenes de 400, 1.500 y 3.000 ml dejando pasar 10 días para cada volumen.

5.3.3 Preparación del medio de cultivo a base de extracto de macrófitas. Macrófitas (*Eichhornia crassipes*) fueron tomadas de los estanque aledaños al

laboratorio, estas plantas son previamente lavadas y puestas al horno a 60°C por 24 horas, posteriormente son molidas hasta pulverizar y luego este polvo es trasferido a un recipiente con 2,5 litros de agua destilada y puesto a hervir por una hora. El sobrenadante resultado de esta actividad fue utilizado como medio de cultivo y por cada litro de extracto se adicionó 0,4 g de NaPO₄ con el objetivo de estabilizar el pH, luego el medio de cultivo fue autoclavado a 120°C durante 20 minutos (Figura 10).

Figura 10. Macrófitas (*Eichhornia crassipes*), como medio de cultivo



Para la preparación de cada unidad experimental se adicionó a un erlenmeyer de 2,0 litros de capacidad 1.400 ml de agua destilada previamente autoclavada, posteriormente se agregaron 97,5 ml de extracto de macrófitas y 2,5 ml de abono NPK (20:5:20), a este medio de cultivo se adiciono 100 ml de inóculo de la microalga con 0,5 g de vitamina B₁₂.

5.3.4 Preparación del medio de cultivo CHU₁₂. De acuerdo con Knie y Lopes⁵⁰ este medio esta compuesto por varias soluciones descritas en el Cuadro 1, las cuales pueden ser conservadas en un refrigerador por seis meses.

Para la preparación de un litro de medio CHU₁₂ se colocó aproximadamente 500 ml de agua destilada en un erlenmeyer y se adicionó las soluciones stock en el orden y en los volúmenes indicados en el Cuadro 2, posteriormente se homogenizaron por 20 minutos y luego se completó el recipiente con agua destilada hasta 1.000 ml.

⁵⁰ KNIE, Joachim. LOPES, Ester. Teste ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis, Brasil: FATMA/ GTZ, 2004. p. 148.

Cuadro 1. Soluciones Stock para el medio de cultivo CHU₁₂

Solución	Reactivo	Formula	Conc./L
1	Nitrato de sodio	NaNO ₃	25 g
2	Cloruro de calcio di-hidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g
3	Sulfato de magnesio hepta-hidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g
4	Fosfato de potasio dibásico	K ₂ HPO ₄	7,5g
5	Fosfato de potasio monobásico	K H ₂ PO ₄	17,5 g
6	Cloruro de sodio	NaCl	2,5 g
7	Titriplex III	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	50 g
	Hidróxido de potasio	KOH	31 g
8	Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98 g
9	Acido bórico	H ₃ BO ₃	11,42 g
10	Sulfato de zinc hepta-hidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 mg
	Cloruro de manganeso tetra-hidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 mg
	Oxido de molibdeno	MoO ₃	0,71 mg
	Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57 mg
	Nitrato de cobalto hexa-hidratado	Co (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49 mg

Nota. Disolver con agua destilada separadamente los reactivos de cada una de las soluciones y diluir en 1.000 ml.

Cuadro 2. Composición de un litro de medio CHU₁₂

Solución	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volumen (ml)	10	10	10	10	10	10	1	1	1	1

Para preparar cada unidad experimental se adicionó a un erlenmeyer de 2,0 litros de capacidad 1.500 ml de fertilizante CHU₁₂ y previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos, cuando alcanzó la temperatura optima de cultivo se adicionó 100 ml de inóculo de la microalga con 0,5 g de vitamina B₁₂.

5.3.5 Purificación del cultivo. Una vez realizada la siembra de las microalgas, las unidades experimentales fueron purificadas en la cámara de asepsia (Figura 11). Un ángstrom de 2.750 UV es colocado a 25 cm encima del cultivo, con una irradiación por 15 minutos, puesto que muchas algas son resistentes a los efectos de luz UV que las bacterias.

5.3.6 Asepsia empleada en el cultivo. Todos los utensilios empleados para el cultivo son específicos para este fin, los cuales no deben ser usados con diversos materiales químicos y biológicos. Antes de utilizarlos son dejados en detergente neutro y después en ácido clorhídrico al 10% por 24 horas, posteriormente son lavados con agua corriente y en seguida con abundante agua destilada.

En el laboratorio fue restringido el paso a las personas que no estuvieron directamente involucradas con el cultivo, asimismo todo el personal que laboró estuvo prohibida la entrada con zapatos, además se debió lavar las manos con alcohol al 90% y entrar protegido con tapa bocas y delantal blanco.

Figura 11. Cámara de asepsia



5.4 TRATAMIENTOS

Se evaluaron dos tratamientos y quince replicas por tratamiento. Donde cada unidad experimental estuvo constituida por 1.600 ml de cultivo de microalgas en erlenmeyers de dos litros.

Los tratamientos evaluados fueron:

T1: Medio de cultivo a base de fertilizante CHU_{12}

T2: Medio de cultivo a base extracto de macrófitas (*Eichhornia crassipes*), mezclado con NPK (20:5:20)

5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) aplicando el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}, \text{ donde:}$$

Y_{ij} = respuesta de la i-ésima unidad experimental que recibe el j-ésimo tratamiento.

μ = media

τ_j = efecto del j-ésimo tratamiento

j = tratamiento 1, 2

i = replica 1, 2, 3...15

ϵ_{ij} = error experimental asociado a la i-ésima unidad experimental sometida al j-ésimo tratamiento.

Para determinar la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, se realizó una prueba de "T" de student con $\alpha=0,05$, aplicando una prueba de "F" para establecer igualdad de varianzas, para cada una de las variables incluidas en el estudio. Luego se realizó una prueba de correlación múltiple en cada tratamiento y un análisis de regresión para la variable crecimiento, utilizando el paquete estadístico S.A.S.

5.6 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

H₀: $\mu_1 = \mu_2$. Los tratamientos aplicados no presentaron diferencias en el efecto medio sobre el crecimiento y desarrollo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*.

H₁: $\mu_1 \neq \mu_2$. Uno de los tratamientos presentó un efecto medio superior sobre el crecimiento y desarrollo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*.

5.7 VARIABLES EVALUADAS

5.7.1 Crecimiento de *Ankistrodesmus gracilis*. Se tomaron muestras diarias de 1,0 ml, a lo largo de los quince días de cultivo, las cuales fueron contadas utilizando el hemocitometro de Neubauer para determinar el número de células por mililitro.

5.7.2 Clorofila a. La determinación fue realizada filtrando 10 ml de muestra en filtros de fibra de vidrio GFC de 0,7 μm de tamaño de poro. Luego se extrajo la clorofila a de cada muestra cortando el filtro en pequeños trozos y colocándolos en acetona al 90% a baja temperatura y luminosidad por 24 horas. El extracto de los 10 ml fue centrifugado a 3.000 r.p.m por un periodo de 10 minutos y la absorbancia del sobrenadante fue determinada en un espectrofotómetro Shimadzu UV-210 A (Anexo B).

5.7.3 Variables físico-químicas de los medios de cultivo. Para el acompañamiento del efecto de los medios de cultivo en el crecimiento y desarrollo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*, se realizaron análisis a lo largo de 15 días de experimento, en los cuales las variables como pH, temperatura, conductividad, alcalinidad, nitrato, nitrito, amonio, ortofosfato, fósforo total, clorofila a, se determinaran cada tres días y las variables como oxígeno, carbonato, bicarbonato,

CO₂ libre y CO₂ total se determinaron cada cinco, debido a la cantidad de volumen gastado en cada análisis (Cuadro 3).

Cuadro 3. Variables analizadas en las muestras de cultivo y el método correspondiente

Características Limnológicas	Método
Oxígeno disuelto	Winkler, Golterman et al. (1978)
Temperatura	Termómetro digital Corning PS16
Conductividad	Conductímetro digital Corning PS17
pH	pHmetro digital Corning PS15
Alcalinidad total	Mackereth et al. (1978)
Amonio, Nitrito, nitrato, ortofosfato y fósforo total	Koroleff (1976) (Anexo C)

5.7.4 Valor nutricional de la microalga. Los análisis de proteína, extracto etéreo, energía y fibra se determinaron de acuerdo a la metodología propuesta por Silva y Queiroz⁵¹ (anexo D).

Para la realización de estas variables las algas previamente fueron separadas de los medios de cultivo por centrifugación mediante el uso de la desnatadora, posteriormente se congelaron a -5 °C y a continuación se liofilizaron dejándolas listas para los correspondientes estudios.

5.7.5 Análisis parcial de costos. Para el análisis parcial de costos en esta investigación solo se tuvo en cuenta los costos variables.

⁵¹ SILVA, Dirceu y QUEIROZ, Augusto de. Análise de alimento: Métodos químicos e biológicos. Viçosa, Brasil: Universidade federal de Viçosa, Editora UFV, 2002. p. 39.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 CRECIMIENTO DEL ALGA

Para determinar el crecimiento se utilizaron las concentraciones medias de los conteos diarios a lo largo del tiempo de cultivo, cuyos resultados se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Conteos diarios promedios de la microalga *Ankistrodesmus gracilis* en célulasx10⁵/ml a lo largo del cultivo.

Días	T1	T2
1	29,59	21,80
2	42,66	44,71
3	106,17	95,95
4	114,75	156,74
5	209,01	270,30
6	285,15	336,61
7	380,43	366,49
8	425,22	395,55
9	429,60	429,91
10	444,35	435,48
11	447,93	475,57
12	424,54	525,02
13	420,80	514,32
14	415,60	495,32
15	352,89	429,67
Media	301,91	332,89
Desviación estándar	157,57	173,58

Los datos promedios obtenidos en el crecimiento de los dos tratamientos, fueron para el tratamiento T1 de $301,91 \times 10^5 \pm 157,57$ cel/ml y para el tratamiento T2 de $332,89 \times 10^5 \pm 173,58$ cel/ml (Anexo E).

De acuerdo con los resultados de prueba "T" students ($\alpha = 0,05$) para varianzas iguales, se encontró que no existen diferencias estadísticas significativas entre los

tratamientos T1 y T2, (Anexo F) por lo tanto ambos medios de cultivo, el comercial y el alternativo, generan los mismos efectos sobre el crecimiento.

Estos valores se encuentran de acuerdo a los reportados por Bachion⁵², quien encontró densidades de 508×10^5 cel/ml y superiores a los obtenidos por Sipaúba⁵³ con densidades de 240×10^5 cel/ml para la misma especie. Los mismos autores afirman que la densidad de cultivo depende de la especie y del tipo de fertilizante utilizado, interactuando con las variables físico-químicas en el desarrollo y crecimiento del alga.

Por su parte Sipaúba y Rocha⁵⁴ agregan que materiales obtenidos de los mismos estanques sirven como fertilizantes para cultivos de algas, los cuales hacen más fácil y económico la producción de alimento vivo, garantizando así una buena rentabilidad en los cultivos acuícolas y además contribuyen en el reciclaje de productos biológicos.

Para facilitar esta discusión es ventajoso dividir la curva de crecimiento mostrada en la Figura 12, según lo establecido por Álvarez⁵⁵, en cinco fases: fase de ajuste, fase exponencial, fase de reducción del crecimiento, fase estacionaria y muerte.

6.1.1 Fase de ajuste. En la curva de crecimiento es posible identificar una fase de ajuste entre el día 0 (día de la siembra) y el día 2, lapso en el que el número de algas no aumenta significativamente en relación al día inicial, obteniendo así una tasa de crecimiento para el tratamiento T1 de $k=0,29$ y para el tratamiento T2 de $k=0,56$, que es equivalente respectivamente a 0,42 y 0,81 divisiones de células por día (Tabla 3).

Los valores reportados por Carrera⁵⁶ son comparables a los obtenidos en esta investigación quien encontró divisiones diarias de 0,45 a 0,85, en la adaptación de

⁵² BACHION, M. A. Estudo do crescimento e desenvolvimento de três espécies zooplanctônicas submetidas a diferentes dietas alimentares. Tese de Mestrado. Jaboticabal: SP, Brasil: Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 26.

⁵³ SIPAÚBA, Lúcia Helena. Estudo do crescimento populacional de três espécies zooplanctônicas em laboratório e uso do plâncton na alimentação de alevinos de *Oreochromis niloticus* e *Astynax scabripinis paranae* (lambari). Em: Rev. UNIMAR, Marília, Brasil. Vol.16, No. 3 (21, maio. 1994), p.195.

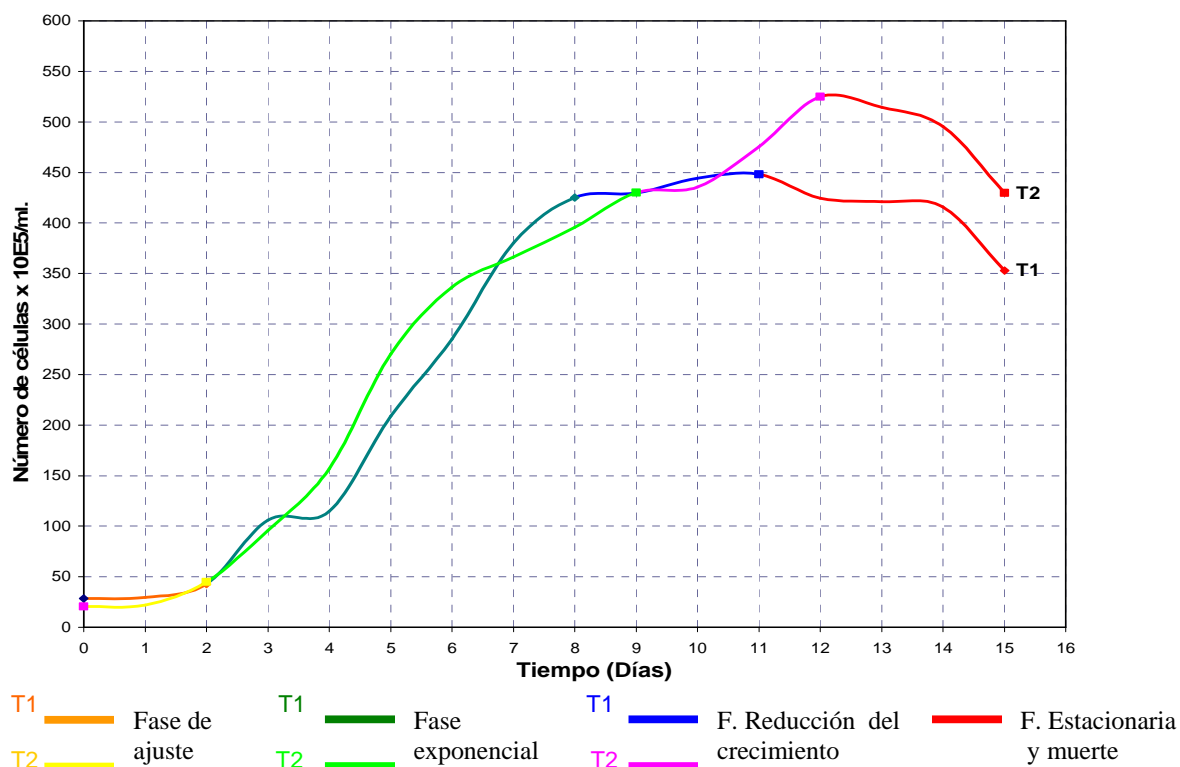
⁵⁴ SIPAÚBA y ROCHA, Op. cit., p. 15.

⁵⁵ ALVAREZ, Op. cit., p. 1.

⁵⁶ CARRERA CÁRDENAS, Jenny. Cultivo de *Tetraselmis suecica* en aguas de baja salinidad, en presencia de producto zeolítico ZEBEN-56.CIVA. 2003.(citado el 20 de febrero de 2006) Disponible en Internet (<http://www.civa2003.org>)

varias especies de microalgas marinas, entre ellas *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros sp.*, enriquecidas con productos de naturaleza zeolítica (ZEBEN-56).

Figura 12. Curva de crecimiento promedio diario por tratamiento, de la microalga *Ankistrodesmus gracilis* en células x 10⁵/ml.



Por su parte Sipaúba y Rocha⁵⁷ manifiestan que en esta fase la mayoría de las células son viables, más no están en condiciones de dividirse inmediatamente, especialmente si vienen de un medio más antiguo. Puesto que las enzimas pueden haber sido inactivadas y los metabolitos disminuidos a niveles insuficientes para permitir que ocurra una división celular, debido a que hay necesidad de un equilibrio de ácido glicólico en el medio, para que los productos de fijación del carbono se tornen disponibles al crecimiento.

6.1.2 Fase exponencial. En esta fase las células algales empiezan a dividirse regularmente a una tasa constante, reportando en esta investigación una tasa de crecimiento exponencial de $k= 0,40$ en ocho días para el tratamiento T1 y de $k= 0,36$ para el tratamiento T2 prolongándolo a nueve días, lo que es equivalente en

⁵⁷ SIPAÚBA y ROCHA, Op. cit., p. 39.

esta fase a 0,58 y 0,52 divisiones de células por día para los tratamientos T1 y T2 respectivamente.

Tabla 3. Tasas de crecimiento y duplicaciones diarias en las distintas fases del cultivo de *Ankistrodesmus gracilis*.

Fases	Tasa de crecimiento K		Duplicación diaria	
	T1	T2	T1	T2
Ajuste	0,29	0,56	0,42	0,81
Exponencial	0,40	0,36	0,58	0,52
Reducción del crecimiento	0,03	0,13	0,04	0,19
Estacionaria y muerte	-0,09	-0,13	-0,13	-0,19

De acuerdo con Dionísio⁵⁸, quien realizó investigaciones de crecimiento con *Tetraselmis suecica*, las duplicaciones celulares diarias superiores a 0,10 son óptimas y positivas, las cuales aprovechan todos los nutrientes disponibles en sus requerimientos fisiológicos, duplicándose en intervalos de tiempo sucesivos dando como resultado una buena producción de material celular.

Además Nieves⁵⁹ reporta datos de cultivo de *Monoraphidium sp.* (Chlorophyceae), quien logra incrementar el número de días utilizando diferentes medios de cultivos teniendo como fuente el nitrógeno y el fósforo, por lo tanto cabe resaltar que el tratamiento T2 logro aumentar un día mas que el tratamiento T1 a una duplicación celular menor. De esta forma Sipaúba⁶⁰ agrega que esta es una fase ideal para tomar inóculos y alimentar especies acuícolas, puesto que las algas están en constante crecimiento logrando obtener mayores procesos fotosintéticos y el principal producto de la fotosíntesis es la proteína.

⁵⁸ DIONÍSIO, Gisela. Sistemas de Produção em Acuicultura, Curso de Biología marinha e pesca. 2004. p.3.

⁵⁹ NIEVES, Soto. Phytoplankton productivity low cast. 1. Isolated and culture of monoraphidium sp.(chlorophyceae) in a static system of a control culture "f" medium and four alternative culture media with agricultural fertilizers.2004. (citado el 20 de febrero de 2006) Disponible en Internet <http://www.Journal/aquaculture/mexico/articulo443.htm>

⁶⁰ SIPAÚBA, Lucia. Utilização do plâncton na alimentação de larvas e Alevinos de peixes. Tese de Doutor em ciências. São Carlos,SP. Brasil. 1988. p.126.

6.1.3 Fase de reducción del crecimiento. La tasa de crecimiento disminuye a $k=0,03$ para el T1 y a $k=0,13$ para el tratamiento T2, lo que es equivalente en división celular diario a 0,04 y 0,19 para cada tratamiento respectivamente, notándose en la figura 12, que el tratamiento T2 logra alcanzar un valor máximo de concentración celular de $525,02 \times 10^5$ cel/ml hasta el día 12, mientras que el tratamiento T1 obtuvo una concentración celular máxima de $447,93 \times 10^5$ cel/ml en el día 11 a menor divisiones de células por día.

Según Sipaúba y Rocha⁶¹ aclara que esta reducción de la tasa de crecimiento puede ocurrir debido a la disminución de la disponibilidad de nutrientes en el medio, al aumento de la concentración de metabolitos y a las alteraciones en diversos factores ambientales, como el pH, temperatura, entre otros, que puede reducir la actividad fotosintética, también puede ser resultante de la elevación de la densidad poblacional y de la consecuente disminución de la disponibilidad de luz por unidad celular (autosombreamiento).

6.1.4 Fase estacionaria y muerte. En la fase estacionaria la población no aumenta en virtud de la tasa de crecimiento al ser compensada por la tasas de mortalidad. Obteniendo valores para el T1 de $k= -0,09$ y para el tratamiento T2 de $k= -0,13$ lo que es equivalente a -0,13 y -0,19 divisiones de células diarias, para el tratamiento T1 y T2 respectivamente.

Esto lo explica Sipaúba y Rocha⁶² al afirmar que por estar en un medio limitado, hay factores que aumentan en este sentido, ocasionando que la tasa de mortalidad de las células sea mayor que la tasa de reproducción o formación de nuevas células, en la cual el número de células viables decrece geométricamente.

En la fase de mortalidad de las algas, la tasa de reproducción y el número de células viables decrece rigurosamente (Figura 12).

De esta forma, en la presente investigación se puede observar un ligero declino entre los días 14 y 15 probablemente debido al tiempo de duración del experimento, en el cual no se puede verificar una fase de muerte mas pronunciada.

Según Noronha⁶³, si se deja más tiempo esta fase puede generar toxicidad en el medio.

⁶¹ SIPAÚBA Y ROCHA, Op. cit., p. 39.

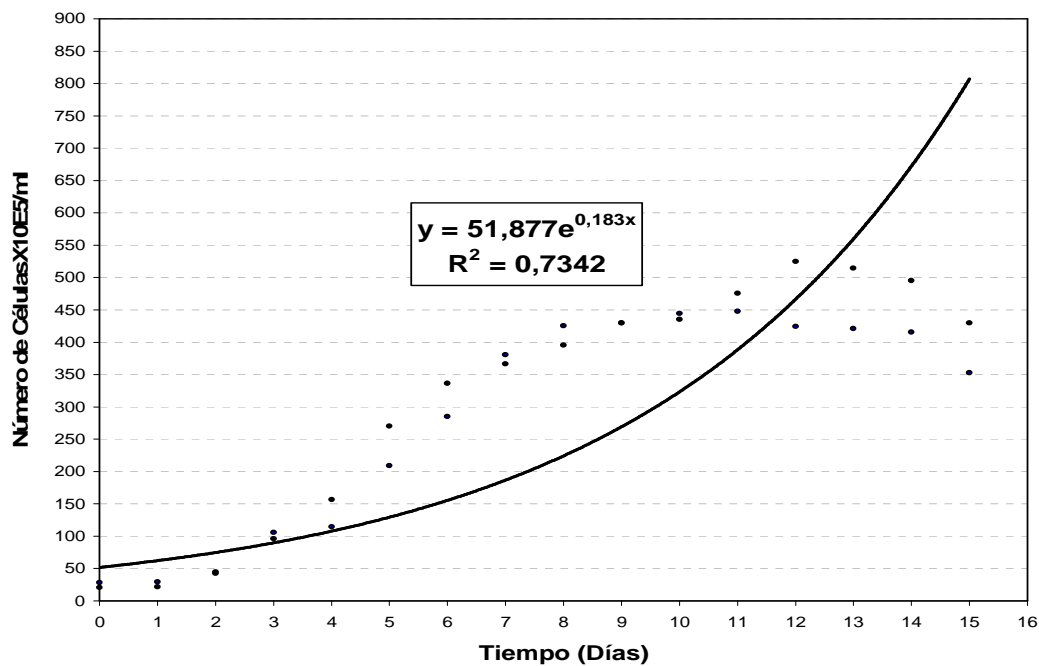
⁶² Ibid., p. 40.

⁶³ NORONHA, M. F. Produção e caracterização de Microalgas para fins de Aquacultura. Relatório de estágio do curso de licenciatura em biologia marinha e pesca. Universidade do Algarbe, Faro. 1989. p. 4.

Además Sipaúba y Rocha⁶⁴ agrega que el valor nutritivo puede alterarse, debido a la insuficiencia de nutrientes y muerte excesiva de algas.

6.2 Curva de regresión para el crecimiento. Debido a la naturaleza de la especie en cuanto a desarrollo y adaptación fisiológica, la concentración absoluta de células algales muestran un crecimiento de forma exponencial, expresado por el modelo regresional $Y = 51,87e^{0,183X}$, con un $R^2=0,7342$ (Figura 13), lo cual indica que por cada unidad que varíe el tiempo, la producción algal variará en $51,87e^{0,183x}$ unidades celulares, modelo que representa a esta relación en el 73,42% de los casos; el resto de las variaciones se explica por otras razones que son desconocidas para este estudio.

Figura 13. Regresión exponencial en el crecimiento de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*



Estos resultados son comparables con los de Noronha⁶⁵ quien realizó estudios de crecimiento con *Dunaliella salina* y *Tetraselmis suecica*, el cual obtuvo un R^2 de

⁶⁴ SIPAÚBA y ROCHA, Op. cit., p. 39.

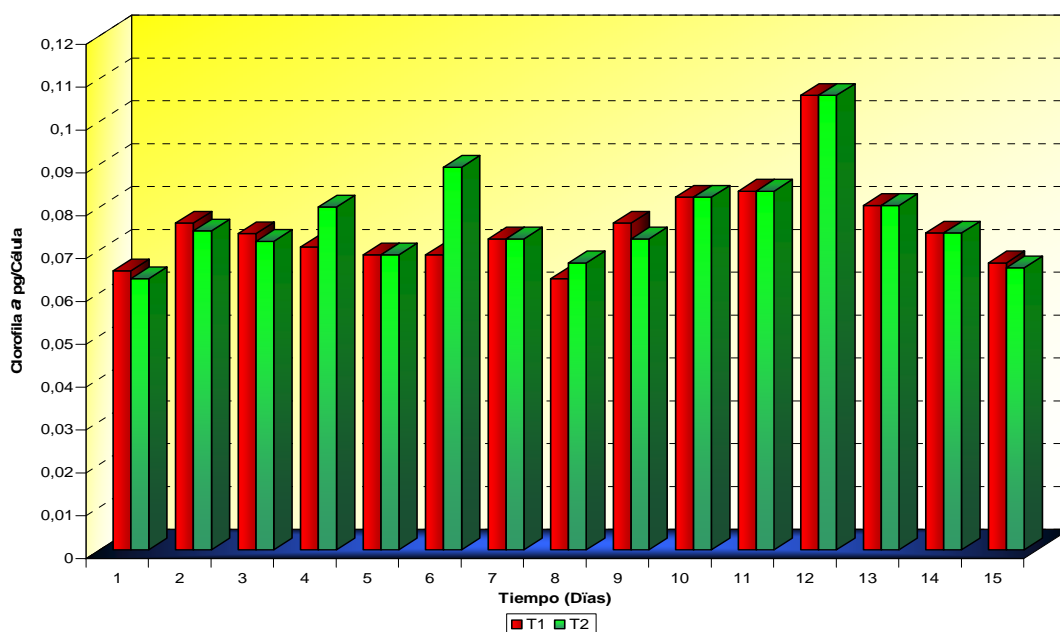
⁶⁵ NORONHA. M.F. Estudo comparativo de crescimento e comparação bioquímica das microalgas *Dunaliella salina* e *Tetraselmis suecica* em dois meios de cultura. Relatório (Estágio do curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pesca). Brasil: Universidade do Algarve, 1996. p. 4.

0,75, afirmando que cultivos por encima de 0,70 generan una buena respuesta del crecimiento y asimilación de los nutrientes interactuando con las variables físico-químicas y es probable que tales condiciones les fuera mas fácil contribuir en su rendimiento nutricional.

6.3 CLOROFILA a

Las concentraciones medias de clorofila a calculadas en esta investigación fueron de $0,075 \pm 0,0104$ pg/célula para el tratamiento T1 y de $0,076 \pm 0,0108$ pg/célula para el tratamiento T2 (Figura 14).

Figura 14. Contenido de clorofila a en el cultivo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*



De acuerdo con los resultados de la prueba "T" students con un $\alpha=0,05$ para varianzas desiguales, se encontró que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T1 y T2 (ANEXO F).

Sin embargo el presente ensayo muestra valores máximos de clorofila a de 0,106 pg/célula, para el tratamiento T1 y T2, en el día 12, punto en el cual, el cultivo de algas esta en el tope máximo de crecimiento.

Estos valores son normalmente esperados, al estar de acuerdo con Tzovenis⁶⁶ quien afirma que esta variable puede ser influenciada por factores como la temperatura, intensidad lumínica o deficiencia de nutrientes, determinando así el rendimiento y la productividad de las biomásas.

Sipaúba y Rocha⁶⁷ por su parte determinó clorofila *a* para *Chlamydomonas sp.* y encontró un valor de 0,64 pg/célula, para *Ankistrodesmus gracilis* de 0,12 pg/célula y para *Scenedesmus bijugus* de 0,10 pg/célula. Afirmando que las mayores producciones promedias están en la fase exponencial, puesto que en esta fase hay un mayor metabolismo e interacción de las variables temperatura y luminosidad.

Es así que el empleo de la intensidad lumínica en esta investigación fue de 3.700 lux y un fotoperíodo de 24:0 horas luz/oscuridad, los resultados sobre el rendimiento de esta alga están directamente relacionados a estas condiciones lumínicas y su combinación con la temperatura en el laboratorio.

Marshall⁶⁸ explica, que estos altos y bajos de fotosíntesis a nivel de laboratorio, inhiben la fotosíntesis por unidad de biomasa, dicha inhibición parece deberse a la fotooxidación de las reacciones tanto fotoquímicas como enzimáticas y aumenta más con las exposiciones prolongadas a altas intensidades, a altas temperaturas, deficiencia en el metabolismo y deficiencia de nutrimentos.

En este sentido Tzovenis⁶⁹ afirma que una comparación directa de diferentes fotoperíodos y temperatura óptima hace necesaria para decidir sobre el más eficiente régimen de luz para propósitos industriales.

6.4 CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS DEL MEDIO DE CULTIVO

Los valores promedio encontrados en los dos tratamientos, para las diferentes variables limnológicas, se encuentran consignados en la Tabla 4.

⁶⁶ TZOVENIS, I.; DE PAUW, N. and SORGELOOS, P. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I: Effect of different light regimes on growth and biomass production. In: Aquaculture, Vol. 10, No. 216, (May, 2003). p. 203.

⁶⁷ SIPAÚBA Y ROCHA. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: algas clorófitas. Em: Revista Biometas. Jaboticabal, Brasil: FCAVJ-UNESP, Vol. 6, No.1 (16,abril. 1993). p. 104.

⁶⁸ MARSHALL, Op. cit., p. 211.

⁶⁹ Tzovenis, Op. Cit., p. 552.

6.4.1 Oxígeno disuelto. El oxígeno disuelto presentó un valor promedio para el tratamiento T1 de $5,86 \pm 1,34$ mg/L y para el tratamiento T2 de $4,73 \pm 1,57$ mg/L (Tabla 4).

Según la prueba de "T" students ($\alpha=0,05$), para varianzas iguales, no hay diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos. Esto se debe a que los cultivos están en función a la aireación proporcionada por el compresor, la cual fue distribuida uniformemente en cada unidad experimental.

Tabla 4. Valores promedios y desviación estándar de las características limnológicas del medio de cultivo durante el periodo experimental.

Variable	Unidad	Tratamiento T1	Tratamiento T2
Oxígeno	mg/L	$5,86 \pm 1,342$	$4,73 \pm 1,57$
Temperatura	°C	$24,80 \pm 1,69$	$24,46 \pm 1,92$
pH		$7,50 \pm 0,36$	$6,90 \pm 0,43$
Conductividad	$\mu.S/cm$	$230,66 \pm 67,97$	$381,33 \pm 44,86$
Alcalinidad	mg/L	$84,13 \pm 37,17$	$31,33 \pm 8,70$
Nitrato	mg/L	-	$0,53 \pm 0,35$
Amonio	mg/L	$0,34 \pm 0,37$	$0,09 \pm 0,10$
Ortofosfato	mg/L	$1,45 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,40$
Fósforo total	mg/L	$1,56 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,42$
Carbonato	mg/L	$0,329 \pm 0,32$	$0,035 \pm 0,02$
Bicarbonato	mg/L	$106,39 \pm 48,22$	$40,28 \pm 11,95$
CO ₂ libre	mg/L	$4,97 \pm 3,17$	$20,13 \pm 25,01$
CO ₂ Total	mg/L	$111,69 \pm 48,02$	$60,49 \pm 35,92$

Trabajos realizados por Lemos⁷⁰ en cultivos a grande escala con *Ankistrodesmus gracilis* son comparables con esta investigación, encontrando valores por encima de 6 mg/L.

Según Álvarez⁷¹, las algas al estar en constante exposición de luz producen oxígeno disuelto en mayor grado que el que es consumido en los procesos respiratorios. Entre tanto Marshall⁷² menciona que el oxígeno liberado por las algas es aprovechado por las bacterias, esta asociación mutualista elimina en gran parte la necesidad de ventilación.

⁷⁰ LEMOS, Op. cit., p. 52.

⁷¹ ALVAREZ, Op. cit., p. 6.

⁷² MARSHALL, Op. cit., p. 52.

Eliach⁷³ agrega que los cultivos en constante aireación permite que las células algales no se estratifiquen y formen coágulos o grumos, que impiden el paso de la luz hacia el interior del medio de cultivo, además el mismo autor afirma que hay mayor intercambio gaseoso entre el medio ambiente y el medio de cultivo.

6.4.2 Conductividad. Para esta variable, el tratamiento T1 presentó un valor promedio de $230,66 \pm 67,97 \mu\text{S/cm}$ y para el tratamiento T2 de $381,33 \pm 44,86 \mu\text{S/cm}$.

La prueba "T" students ($\alpha=0,05$), cuando se calculó para varianzas iguales, indicó que existen diferencias estadísticas altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre los dos tratamientos.

A este respecto, Sipaúba⁷⁴ menciona que la conductividad esta en función a los macronutrientes, los cuales se encuentran en iones desasociables y por lo tanto son buenos conductores de electricidad en solución, es así, que en aguas puras mayor será la resistencia y menor la conductividad.

En este sentido, se corrobora lo encontrado en esta investigación, en el cual, el tratamiento T2 posee un valor medio mas alto que el tratamiento T1, debido a que el T2 esta en función directa con el fertilizante a base de extracto de macrófitas y NPK, los cuales pueden contener otras sustancias nutritivas que se encuentren desasociables en sus iones ocasionando una elevación de esta variable, además Sipaúba⁷⁵ aclara que entre mas eutrófico es el sistema, mayor será la conductividad del medio.

6.4.3 Asociación entre las variables del medio de cultivo. Para el estudio del efecto de asociación de las distintas variables en el crecimiento del alga, se realizó un análisis de correlación entre las variables (Anexo G), cuyos resultados se exponen a continuación.

➤ **Temperatura y crecimiento.** La temperatura media para el tratamiento T1 fue de $24,8 \pm 1,6 \text{ }^\circ\text{C}$ y para el tratamiento T2 fue de $24,4 \pm 1,9 \text{ }^\circ\text{C}$ (Anexo E). Según la prueba de "T"students para varianzas iguales, se encontró que no hay deferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos.

⁷³ ELIACH, Jorge. Incidencia de la agitación en el crecimiento microalgal en birreactores. Argentina: Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Exactas Ingeniería y Agrimensura. (Reporte técnico). RT-ID-0.15/2004.(citado el 18 de mayo de 2006) Disponible en Internet, <http://www.fceia.unr.edu.ar/secyt>

⁷⁴ SIPAÚBA TAVARES, L. H. Limnologia aplicada à Aqüicultura. Jaboticabal, Brasil: FUNEP. Boletim Técnico do CAUNESP No. 1. 1994. p. 19.

⁷⁵ Ibid., p. 19.

Debido a que estos valores fueron influenciados por la temperatura directa ocasionada por el aire acondicionado de la sala, quien tiene un control permanente de la temperatura ambiental. Así se demostró, al calcular el coeficiente de correlación de Pearson de 0,73 ($p < 0,0001$), el cual incide una correlación directamente proporcional con el crecimiento.

Esta correlación es corroborada por Kerby⁷⁶ quien manifiesta que la temperatura influye en la mayor y en la menor abundancia de los organismos en las distintas fases de crecimiento, ocasionando un correcto metabolismo en temperaturas ideales para cada especie, permitiendo priorizar el gasto energético en el crecimiento y la reproducción.

Entre tanto Graeff⁷⁷ menciona que muchas especies de fitoplancton, entre ellas las *Ankistrodesmus* exigen temperaturas del agua entre 22 a 26 °C para un rápido crecimiento, de esta manera, las temperaturas del presente trabajo, están dentro de lo recomendado, asimismo Coutteau⁷⁸ afirma que algunas especies de microalgas clorófitas pueden tolerar niveles de temperatura variando de 16 a 27 °C, siendo la temperatura óptima para cultivo de estas entre 22 y 24 °C.

➤ **pH y CO₂.** El promedio de pH para el tratamiento T1 proporcionó un valor de $7,5 \pm 0,36$ y en el tratamiento T2 una media ligeramente ácida de $6,9 \pm 0,43$. Para el CO₂ libre se obtuvo en el tratamiento T1 $4,97 \pm 3,17$ mg/L y para el tratamiento T2 fue de $20,12 \pm 25,07$ mg/L.

De acuerdo con los resultados de prueba "T" students con un $\alpha = 0,05$ para varianzas iguales en pH, se encontró que existen diferencias estadísticas altamente significativas ($p \leq 0,0003$) entre los tratamientos T1 y T2, y para CO₂ con varianzas desiguales no existen diferencias estadísticas significativas.

Según Sipaúba⁷⁹, el pH del medio está en función del CO₂ y del fertilizante, corroborando lo encontrado en esta investigación, por cuanto el tratamiento T1

⁷⁶ KERBY NW, STEWART DP. The biotechnology of microalgae and cyanobacteria. En: ROGERS LJ, GALLON JR. (eds). Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe-28. Oxford Scientific Publications. 2003. (citado el 20 de febrero de 2006) Disponible en Internet (<http://www.civa2003.org>)

⁷⁷ GRAEFF, Alvaro. Método para multiplicação da alga (*Chlorella minutissima*) para alimentação inicial de um sistema de produção de peixes fitoplantofagos. Espana: CIVA, 2003. (citado el 15 de mayo de 2006). Disponible en Internet: <http://www.civa2003.org>

⁷⁸ COUTTEAU, P. Microalgae. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Rome: FAO-Fisheries Technical Paper, 1996. p. 86.

⁷⁹ SIPAÚBA, Op. cit., p. 23.

tuvo una media más alcalina que T2, ocasionado una ligera acidez, debido al compuesto del extracto de macrófitas al adicionarle 0,4 g de NaPO₄.

El análisis de correlación del pH demuestra una asociación inversamente proporcional con el CO₂ con un valor de Pearson de -0,83 (p=0,001), coincidiendo lo afirmado por Cole⁸⁰ quien dice que el pH es influenciado por la acidez producida por el CO₂, formando así HCO₃⁻, que en estas condiciones desempeña acción tampón, controlando la variación de pH.

Por otra parte Marshall⁸¹ menciona que la correlación existente entre estas dos variables hace que la disponibilidad del CO₂ libre disminuya conforme aumenta el pH, asimilando las algas el HCO₃⁻ como fuente de carbono en ambientes alcalinos, mientras que las que crecen en aguas ácidas quizá están restringidas para utilizar el CO₂ libre como fuente del mismo.

➤ **Amonio y nitrato.** El valor medio determinado de amonio para el tratamiento T1 fue de 0,34 ± 0,37 mg/L y para el tratamiento T2 de 0,09 ± 0,10 mg/L. para nitrato en el tratamiento T1 fue ausente mientras que el tratamiento T2 de 0,53 ± 0,35 mg/L.

De acuerdo con los resultados de la prueba "T" students con un α=0,05, considerando varianzas desiguales en amonio, se encontró que existen diferencias estadísticas significativas (p=0,0231) entre los tratamientos T1 y T2, y para nitrato con varianza desiguales, existen diferencias estadísticas (p=0,05) entre los dos tratamientos.

El análisis de correlación de amonio demuestra una asociación directamente proporcional con el nitrato con un valor del coeficiente de Pearson de 0,97 (p=0,03).

Esto puede explicarse según Marshall⁸², quien menciona que las algas pueden utilizar NO₃⁻, NO₂⁻ o NH₄⁺ como fuente de nitrógeno, las cuales prefieren mas el amonio que NO₃⁻ al grado de que las concentraciones de NH₄⁺ por arriba de 0,5 a 1,0 μmoles x 10⁻¹ inhiben la absorción de NO₃⁻, por lo tanto en esta investigación se puede deducir que las algas tomaron como fuente de nitrógeno el amonio, sobretodo en el tratamiento T1 en el cual no fue detectado la presencia de nitrato, estando este variando su concentración en función al fertilizante utilizado.

⁸⁰ COLE, Op. cit., p. 35.

⁸¹ MARSHALL, Op. cit., p. 74.

⁸² Ibid., p. 66.

Sipaúba⁸³ citando a Delincé menciona que el amonio presenta una ventaja sobre los nitratos, pues no necesita la reducción para su asimilación, siendo, por lo tanto, energéticamente mas económico.

Marshall⁸⁴ agrega que las algas quizá conservan energía al utilizar el NH_4^+ debido a que el NO_3^- debe ser reducido por la célula hasta NH_4^+ antes de incorporarla en los aminoácidos.

Abalde, *et al*,⁸⁵ coincide con esta investigación al afirmar que la actividad específica de la nitrato reductasa, la enzima que reduce el NO_3^- hasta NO_2^- , es muy baja o indetectable en células que crecen con NH_4^+ .

Según Beker⁸⁶ la ventaja es evidente en cultivos tipo batch, puesto que las concentraciones de amonio son más altas. Es concebible que el crecimiento rápido de los cultivos en los dos tratamientos en las primeras fases sea un reflejo de un efecto positivo de la presencia de amonio en los medios, con respecto a las concentraciones de nitritos y nitratos. Permitiendo obtener tasas de crecimiento y duplicaciones diarias altas con respecto a la fase de crecimiento.

➤ **Fosfato total y Ortofosfato.** La concentración promedio de fosfato total para el tratamiento T1 fue de $1,56 \pm 0,063$ mg/L y para el tratamiento T2 fue de $0,386 \pm 0,426$ mg/L. El contenido promedio de ortofosfato para el tratamiento T1 fue de $1,453 \pm 0,064$ mg/L y para el tratamiento T2 de $0,309 \pm 0,407$ mg/L.

De acuerdo con los resultados de prueba "T" students ($\alpha=0,05$), para varianzas desiguales, en fósforo total se encontró que existen diferencias estadísticas altamente significativas ($p=0,0001$) entre los tratamientos T1 y T2, y para ortofosfato con varianzas desiguales existen diferencias estadísticas altamente significativas ($p=0,0001$).

El análisis de correlación, el fosfato total demostró una asociación directamente proporcional con el ortofosfato, con un valor de Pearson de 0,99 ($p=0,001$).

⁸³ SIPAÚBA, Op. cit., p. 22.

⁸⁴ MARSHALL, Op. cit., p. 65.

⁸⁵ ABALDE, J. A.; HIDALGO, C.; TOIRRES, E. y HERRERO, C. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. España: Universidad de La Coruña, Monografías, 1994. p. 26.

⁸⁶ BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p. 29.

Esto puede ser explicado por UCA⁸⁷, quien manifiesta que el fósforo presente en el agua, en estado soluble o particular, existe en varias formas, como fósforo inorgánico, compuesto esencialmente de ortofosfatos y polifosfatos (tri y piro) y como fósforo orgánico procedente de las nucleoproteínas, fosfoproteínas, combinaciones azúcares-fosfatos y sus productos de oxidación.

A este respecto, Benítez⁸⁸ afirma que el ortofosfato, es la única fuente importante de fósforo inorgánico para las algas, aunque en la mayoría obtienen dicho elemento a partir de varios fosfatos orgánicos.

Marshall⁸⁹ agrega que fosfatos inorgánicos como el glicerofosfato se utilizan en los medios de cultivo, las fosfatasas alcalinas y ácidas, limitadas por membrana, hidrolizan estos compuestos para liberar PO_4^{-3} , el cual es utilizado entonces por la célula.

Según UCA⁹⁰ el valor mínimo para fosfato total es de 0,03 mg/L y para ortofosfato es de 0,01 mg/L, para que ocurra un florecimiento algal en ambientes acuáticos naturales, cifras que son sobrepasadas por los valores encontrados en esta investigación.

➤ **Alcalinidad y bicarbonato, carbonato.** Las concentraciones promedio de alcalinidad para el tratamiento T1 fue de $84,13 \pm 37,17$ mg/L y para el tratamiento T2 de $31,33 \pm 8,70$ mg/L. Para bicarbonato obtuvo valores de $106,39 \pm 48,22$ mg/L en el tratamiento T1 y para el T2 de $40,28 \pm 11,95$ mg/L, en cuanto a carbonato para el tratamiento T1 fue de $0,329 \pm 0,32$ mg/L y para T2 de $0,035 \pm 0,02$ mg/L.

Según la prueba de "T" para alcalinidad hay diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tratamientos T1 y T2, para bicarbonatos y carbonatos con varianzas desiguales presentaron diferencias estadísticas significativos ente los dos tratamientos ($p < 0,01$).

Por lo tanto, hubo una correlación entre alcalinidad y carbonatos presentando un valor de Pearson de 0,96 ($p = 0,0001$) y una correlación de las variables alcalinidad

⁸⁷ UNIVERSIDAD DE CENTROAMÉRICA (UCA). Estudio de la calidad ambiental del campo de Gibraltar: Medio ambiente acuático y contaminación acuática. México: Limnología Oceanográfica, 2003. Disponible en Internet: http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/planesCalidad/gibraltar/informe3/informe5_2.pdf p.

⁸⁸ BENÍTEZ, Claudia. El fósforo en capas superficiales del océano. Honolulu, Hawaii: Universidad de Hawaii en Manoa, 2000. (Citado el 10 de Abril de 2006). Disponible en Internet, URL: <http://www.Ciencia.cl/cienciaAIDia/volumen3/numero1/glosario-i.htm>

⁸⁹ MARSHALL, Op. cit., p. 66.

⁹⁰ UCA, Op. cit., p. 5.

y bicarbonatos alcanzando un valor de pearson de 0,88 ($p=0,0001$) siendo altamente significativo.

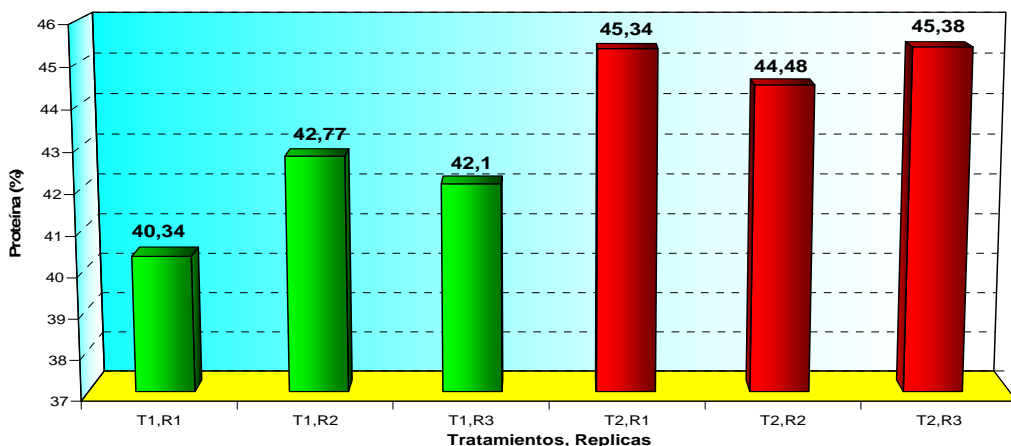
A este respecto Sipaúba⁹¹ citando a Miner menciona que niveles de alcalinidad de 20 mg/L son adecuados para el correcto desarrollo de las algas. Igualmente Acuarioaberiak⁹² menciona que los iones de carga negativa como carbonato y bicarbonato son los principales determinantes de la alcalinidad, los cuales pueden amortiguar los efectos de la adición de ácidos.

6.5 VALOR NUTRICIONAL DE LA MICROALGA *Ankistrodesmus gracilis*

6.5.1 Proteína. De acuerdo con el análisis bromatológico realizado a muestras de la alga estudiada, el contenido proteico promedio para el tratamiento T1 fue de $41,7\% \pm 1,2$ y para el tratamiento T2 de $45,0\% \pm 0,7$ (Figura 15).

La prueba de "T" de students para varianzas iguales indica diferencias estadísticas altamente significativas ($p<0,01$) entre los dos tratamientos. Por lo tanto se considera que el mejor tratamiento es el T2, el cual posee la media más alta (45,0%) con respecto al tratamiento T1.

Figura 15. Contenido de proteína de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*



⁹¹ SIPAÚBA, Op. cit., p.26.

⁹² ACUARIOABERIAK. El acuario de arrecife. (Citado el 20 de mayo de 2006). Disponible en Internet <http://www.Acuarioaberiak.com/lib/maslibreria.asp?id=18#tem93>

El porcentaje de proteína determinado en esta investigación fue inferior al encontrado por Lemos⁹³, quien trabajó con la misma especie encontrando un porcentaje promedio de 50,5% de proteína.

En comparación con otras clorófitas, los resultados fueron más cercanos, especialmente con los valores suministrados por Tacon⁹⁴, quien encontró un 47,2% de proteína en *Chlorella vulgaris*; de manera similar Habib⁹⁵, en trabajos desarrollados con la FAO, reportó 43,6% de proteína en *Scenedesmus quadricauda*, y utilizando el medio de cultivo POME en *Chlorella vulgaris* obtuvo 26,45% de proteína, notoriamente inferior al resultado del presente estudio.

Según Fábregas⁹⁶, el valor nutricional del alga varía en función a las condiciones de cultivo, de la composición del medio, fase de crecimiento, tamaño de la célula, digestibilidad y toxicidad.

Marshall⁹⁷ sostiene que la limitación de nutrientes ocasiona, por tendencia general, una disminución del contenido de proteínas por célula y un aumento del contenido de carbohidratos y lípidos, corroborando lo encontrado en este experimento.

Por su parte Sipaúba⁹⁸ menciona que estos niveles de proteína pueden ser mejorados al cosecharse en la fase exponencial, puesto que en esta fase es donde hay mayor aprovechamiento de nutrientes y mayor proceso de fotosíntesis, teniendo como producto la proteína.

Estudios realizados por Lazzaro⁹⁹ demostraron que el crustáceo bentónico *Asellus racovitzai*, alimentado con *Ankistrodesmus*, ocasionan tasas de crecimiento, producción y tasas de asimilación mucho más elevadas que los alimentados con *Anabaena flosaquae*.

⁹³ LEMOS, Op. cit., p. 58.

⁹⁴ TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual II: Nutrient sources and composition. Brasília: FAO, 1987. p. 35.

⁹⁵ HABIB, M. A. B. Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and alga culture. In: Aquaculture. Vol. 8, No.158 (July. 1997). p. 95.

⁹⁶ FABREGAS, J. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. In: J. Ecol. Brazil. Vol. 7, No. 51 (September. 1986). p. 237.

⁹⁷ MARSHALL, Op. cit., p. 63.

⁹⁸ SIPAÚBA, Op. cit., p. 23.

⁹⁹ LAZZARO, X. Los peces planctófagos y sus interacciones con las comunidades planctónicas: Curso Internacional avanzado, Métodos en Limnología 2. São Carlos, Brasil: Hidrobiología, 1985. p. 19.

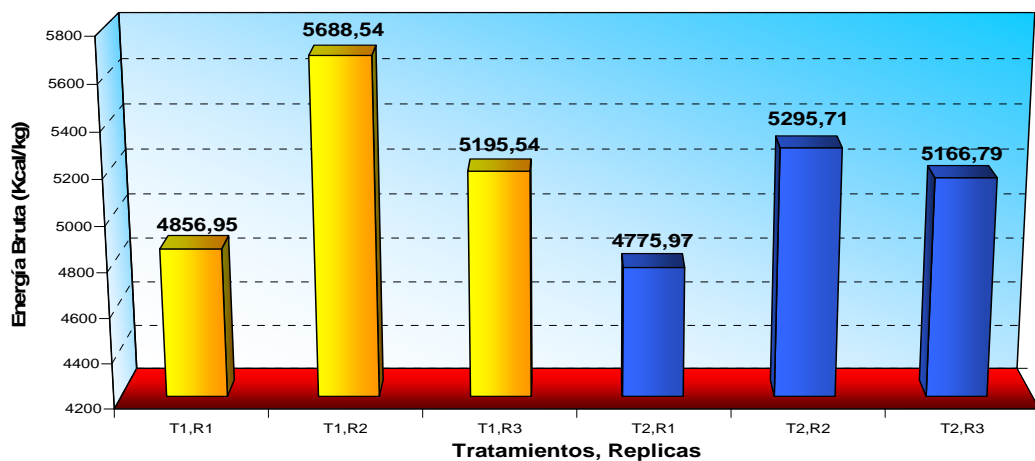
Entre tanto, experimentos realizados por Matsumura y Sipaúba¹⁰⁰, en la alimentación del copepodo *Argyrodiaptomus furcatus*, verificaron que la tasas de filtración y asimilación en los organismos alimentados con *Chlamydomonas sp.* y *Ankistrodesmus gracilis* fueron de 96% y 94% respectivamente, mayores de aquellos alimentados con *Chlorella zoofingensis*, cuya tasa fue de 62%.

Además Pourriot¹⁰¹ menciona que el valor nutricional, el tamaño, la forma y la palatabilidad de esta microalga son los principales factores que se han determinado al momento de ser consumidas por los rotíferos. Por esta razón, la microalga *Ankistrodesmus gracilis* se convierte en una fuente de alimento opcional para especies acuícolas cultivadas en laboratorio.

6.5.2 Energía bruta. Los valores promedios de energía bruta calculados en esta investigación fueron para el T1 de 5.247,01 kcal/kg y para el tratamiento T2 de 5.079,49 kcal/kg (Figura 16).

De acuerdo con la prueba de "T" de students, para varianzas iguales, no hay diferencias estadísticas significativas ($p \geq 0,05$).

Figura 16. Energía bruta (kcal/kg) de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*



¹⁰⁰ MATSUMURA, Tundisi y SIPAÚBA, Lúcia. Phytoplankton composition of Broa Reservoir and its Utilization by *Argyrodiaptomus furcatus* (Copepoda-Calanoidea). In: Simposio de algas. Energia do amanha. São Paulo, Brasil. Anais. (25, Janeiro, 1986); p. 35.

¹⁰¹ POURRIOT, R. Food and feedings habits of rotifers: Arch hydrobiol. Beih: Ergebn. Limnol., 1987. p. 60.

Teniendo en cuenta que la FAO¹⁰² establece a la energía como uno de los requisitos importantes en la evaluación de alimentos, es fundamental resaltar en esta investigación los valores de energía bruta de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*, los cuales fueron superiores al promedio encontrado por Lemos¹⁰³ de 4.583,0 kcal/kg, en esta misma especie.

Khan¹⁰⁴, por su parte realizó estudios en algas chlorophyceae, como *Spirogyra sp.*, *Hydrodictyon sp.* y *Pithophora sp.*, encontrando valores de 3.970, 3.790 y 3.700,0 kcal/kg, respectivamente y superiores a los encontrados por la FAO¹⁰⁵, en estudios con especies como *Chlorella vulgaris* con valores de 3.086,0 kcal/kg y en *Scenedesmus obliquus* con 3.679,0 kcal/kg.

6.5.3 Extracto etéreo. El valor promedio de extracto etéreo para el tratamiento T1 fue de 25,56% y para el tratamiento T2 de 25,80% (Figura 17).

Según la prueba de "T" de students, para varianzas iguales, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos ($p \geq 0,05$) (Anexo F).

En este trabajo fue encontrado el extracto etéreo superior al obtenido por Tacon¹⁰⁶ en *Chlorella vulgaris* (7,4%) y *Scenedesmus obliquus* (13,0%), posiblemente debido a la disponibilidad de nutrientes por parte de los fertilizantes evaluados.

Los contenidos altos de extracto etéreo se pueden explicar de acuerdo con los expuesto por Marshall¹⁰⁷, quien realizó investigaciones en el alga *Dunaliella tertiolecta* y encontró que aspectos como la composición y fisiología celular son afectados al aumentar la limitación de nutrimentos.

¹⁰² ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Acuicultura más que una industria de explotación. Roma: FAO, 2006. (Citado el 18 de abril de 2006). Disponible en Internet: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2003/21619-es.html>

¹⁰³ LEMOS, Op. cit., p. 59.

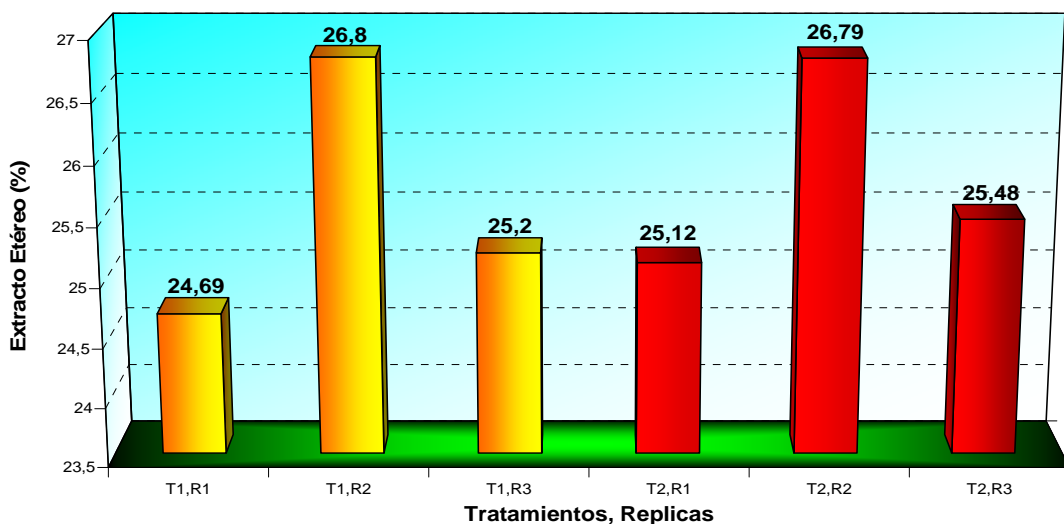
¹⁰⁴ KHAN, Begun. Comparative study on proximate composition and minerals contents of three fresh water green algae. Bangladesh: J. Bot, 1996. p. 25.

¹⁰⁵ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fish feeds and feeding in developing countries. Rome: FAO, 1993. p. 45.

¹⁰⁶ TACON, Op. cit., p. 55.

¹⁰⁷ MARSHALL, Op. cit., p. 59.

Figura 17. Extracto Etéreo (%) de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*



El mismo autor menciona que generalmente se da una disminución de proteína por célula y un aumento del contenido de extracto etéreo, mientras que también suele aumentar la capacidad para absorber el nutrimento limitante.

Los datos de extracto etéreo de esta investigación son corroborados por lo afirmado anteriormente, debido a que las algas fueron cosechadas en la fase de muerte, en el cual las algas se encuentran en un medio limitado de nutrientes, afectando seriamente el metabolismo celular.

6.5.4 Fibra. El análisis bromatológico realizado en esta investigación indicó que el tratamiento T1 contenía el 10,69% de fibra y el tratamiento T2 un 8,83% (Figura 18).

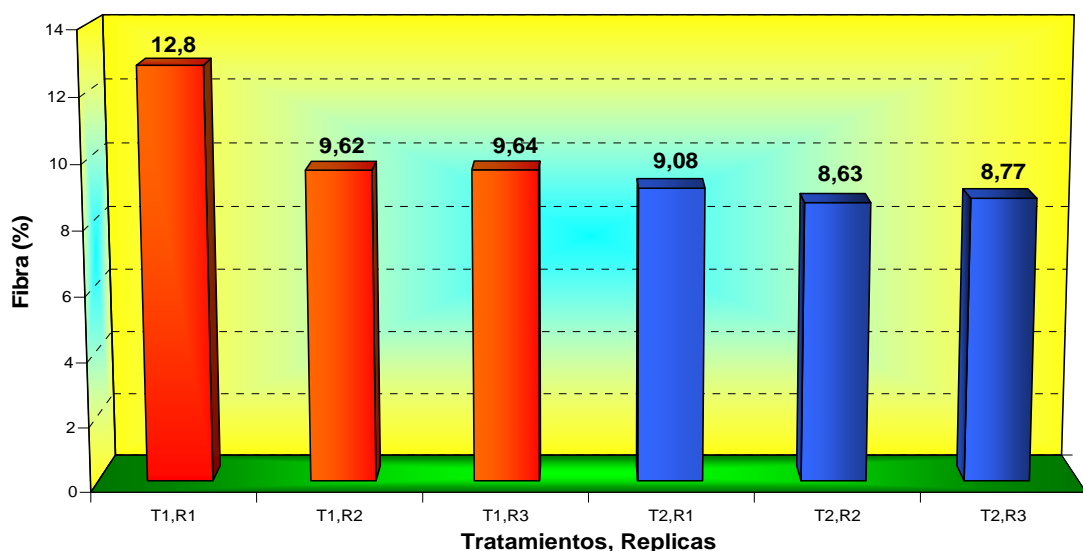
La prueba de “T” de students, para varianzas desiguales, dio como resultado la aceptación de la hipótesis nula, es decir que no existen diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos ($p \geq 0,05$) (Anexo F)

Estos valores se observan superiores a los encontrados por la FAO¹⁰⁸ al estudiar *Chlorella vulgaris* (8,0%), *Scenedesmus quadricauda* (6,3%) y a los determinados por Lemos¹⁰⁹ de 3,2% en *Ankistrodesmus gracilis*.

¹⁰⁸ FAO, Op. cit., p. 46.

¹⁰⁹ LEMOS, Op. cit., p. 63.

Figura 18. Fibra (%) del la microalga *Ankistrodesmus gracilis*



Al referirse a este nutriente, Morris¹¹⁰ afirma que la fibra refleja la fracción de materiales derivados de la pared celular, encontrando contenidos promedios de 7,5% en clorofitas.

Entre tanto Quintana¹¹¹ afirma que las proteínas microalgales brindan pobres resultados si se utilizan como células intactas en la alimentación de animales como en peces, monogástricos y seres humanos; la fibra desarrolla diferentes métodos mecánicos, enzimáticos y químicos para degradar las células y aumentar así la disponibilidad nutritiva de estas proteínas.

Por su parte, Tacon¹¹² menciona que la fibra constituye el residuo orgánico insoluble, generalmente considerada como el carbohidrato no disponible en una dieta o alimento, facilitando el proceso digestivo.

¹¹⁰ MORRIS, Humberto. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. En: Revista cubana de Alimentación y Nutrición. Santiago de Cuba: Centro de Investigaciones de Energía solar, Vol. 13, No. 1 (enero, 1999). (Citado el 18 de abril de 2006). Disponible en Internet: http://www.bvs.sid.cu/revistas/ali/vol13_2_99/ali07299.htm#.

¹¹¹ QUINTANA, Maria Magdalena. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica: Suplementos Dietéticos. En: Revista cubana de Alimentación y Nutrición. Santiago de Cuba: Centro de Investigaciones de Energía solar, Vol. 13, No. 2 (Abril, 1999). (Citado el 18 de abril de 2006) Disponible en Internet. http://www.bvs.sid.cu/revistas/ali/vol14_3_99/ali07399.htm#.

¹¹² TACON, Op. cit., p. 35.

6.6 ANÁLISIS PARCIAL DE COSTOS

De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio, los costos variables para el tratamiento T1 con 24 litros de cultivo fue de \$ 59.901,0 y para el tratamiento T2 con 24 litros de cultivo fue de \$52.775, 0 (Tabla 5).

Los ítems que más contribuyen con los costos variables para este estudio fueron la mano de obra y el fertilizante. Para reducir los gastos con el personal Lemos¹¹³ manifiesta que es un factor difícil, puesto que implica en usar alternativas como implementar sistemas extensivos de baja productividad o sistemas intensivos poniendo en riesgo en encarecer aun más la producción.

Tabla 5. Costos variables en el cultivo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*

Detalle	Cantidad	Valor	Valor total	
			T1	T2
Costos Variables				
Cepa	10 ml	10.000,00	5.000,00	5.000,00
Fertilizante CHU ₁₂	1 kg	7.501,00	7.501,00	
Fertilizante NPK	1 kg	375,42		375,42
Alcohol	1L	1.200,00	600,00	600,00
papel aluminio	Un rollo	5.000,00	2.500,00	2.500,00
papel	Un rollo	4.000,00	2.000,00	2.000,00
Complejo Vitamínico	10 gr	3.000,00	1.500,00	1.500,00
Mano de Obra	Un Obrero	13.600/día	40.800,00	40.800,00
Total Costos Variables			59.901,00	52.775,42

De esta manera, investigaciones vienen siendo desarrolladas utilizando fertilizantes como medio de cultivo a fin de disminuir los costos, una vez que los medios de cultivos utilizados son caros. Por lo tanto, el tratamiento T2 como fertilizante alternativo demostró ser eficiente para la producción de algas, logrando reducir los costos variables en un 11,89%.

De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio, el costo por gramo producido para el tratamiento T1 fue de \$405,10 y para el tratamiento T2 de \$80,91 (Tabla 6).

Por lo tanto, la producción de la microalga *Ankistrodesmus gracilis* presentó un costo semejante a algas utilizadas como alimento en larvicultura de organismos acuícolas, tomando como referencia el mercado nacional Colombiano quien distribuye el alga *Spirulina sp*, cuyo costo es de \$ 0,11/g dólares (264 pesos), y el

¹¹³ LEMOS, Op. cit., p. 76.

de México quien comercializa las especies *Chlorella sp* y *Dunaliella salina*, que según reportes de CICESE¹¹⁴, tienen un precio de \$0,099/g dólares (237,6 pesos).

De esta manera, Silva¹¹⁵ menciona que el costo de producción de algas representa del 14 al 18% de los costos de producción de una larvicultura. Consecuentemente, el mayor desafío de los investigadores en algas es la reducción de este costo, estabilizando y manteniendo la cualidad del producto.

Tabla 6. Relación Costo-beneficio

Detalle	T1	T2
Materia seca producida (g)	12,16	25,54
Costo total de producción (\$)	4.926,06	2.066,38
Costo por gramo (\$)	405,10	80,91
Ingreso Neto (\$)*	3.126,09	6.565,82
Relación costo-beneficio	0,63	3,18

*Para la determinación del ingreso neto se asumió el mismo precio de venta por gramo de la microalga *Spirulina sp.* (\$257,08/g) encontrado en el mercado nacional Colombiano.

En la relación costo beneficio para el tratamiento T1, se obtuvo un valor de 0,63 y para el tratamiento T2 de 3,18, los cuales indican que por cada unidad monetaria que se invierta se obtendrán 0,63 en el primer caso 3,18 unidades en el segundo caso. Como se puede observar, el T2 puede convertirse en una opción rentable para el cultivo de algas y ayudaría a bajar los costos de producción en el cultivo de especies acuícolas.

¹¹⁴ CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA (CICESE). Colección de cepas de microalgas. México: Departamento de acuicultura. 2006. (Citado el 20 de mayo de 2006). Disponible en Internet. <http://www.acuicultura.cicese.mx/ventas.htm>

¹¹⁵ SILVA. R. Sistemas de custos para o projeto de cultivo de camarões marinhos do laboratório de camarões marinhos da UFSC. (Monografía). Florianópolis, Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina, 1997. p. 93.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- La utilización del extracto de macrófitas como *Eichhornia crassipes* en combinación con el fertilizante químico NPK (20:5:20), resultan una excelente alternativa como medio de cultivo para microalgas, al ser comparado con un medio de cultivo tradicional y comercial como es el caso de CHU₁₂, además se está contribuyendo en el manejo de una sobrepoblación de macrófitas en las fuentes de agua e incrementando la rentabilidad de las actividades acuícolas.
- La microalga *Ankistrodesmus gracilis* es una especie que presenta favorables adaptaciones a las condiciones de manejo en laboratorio a través de cultivos tipo batch, convirtiéndose en una buena opción para minimizar los riesgos de contaminación y optimizar el control de las variables físico-químicas.
- Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas para el efecto de los dos medios de cultivo sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*, los cuales alcanzan concentraciones de $301,91 \times 10^5 \pm 157,57$ cel/ml en el caso de cultivo con CHU₁₂ y de $332,89 \times 10^5 \pm 173,58$ cel/ml para macrófitas con NPK (20:5:20).
- El tratamiento T1 obtuvo mayor velocidad de duplicaciones diarias (0,58) prolongando la fase exponencial a ocho días, mientras que el T2 logró duplicaciones/día de 0,52, aumentando el tiempo de la fase exponencial a nueve días, lo que significa mayor tiempo de disponibilidad de alimento vivo en una larvicultura.
- Los fertilizantes evaluados no tuvieron efectos negativos en las variables físico-químicas, que logren repercutir en la disponibilidad y aprovechamiento de los nutrientes por parte de las microalgas, sin embargo hubo una diferencia estadística significativa de las variables conductividad, pH, amonio, nitratos, fosfato, ortofosfato, alcalinidad, carbonatos y bicarbonatos, entre los tratamientos T1 y T2, por lo tanto, con los resultados obtenidos en esta investigación, la microalga *Ankistrodesmus gracilis*, logra desarrollarse perfectamente bajo estas condiciones.
- La microalga *Ankistrodesmus gracilis*, ya sea para alimentación directa de larvas de peces o para alimentación de organismos zooplanctónicos resulta una buena opción como alimento vivo, puesto que presenta un tamaño adecuado, alto valor nutricional en proteína, energía, extracto etéreo y fibra al ser cultivada en medios alternativos como extracto de macrófitas y NPK.

- Con la utilización de fertilizantes alternativos en este estudio, el costo de producción en el cultivo de algas se redujo en un 11,89%, logrando obtener precios competitivos en el mercado internacional con una mejor o igual calidad.

7.2 RECOMENDACIONES

- Realizar estudios utilizando diferentes dosis de NPK como fertilizante para medios de cultivo en diferentes especies de algas.
- Utilizar extracto de macrófitas como *Eichhornia crassipes*, a razón de 69,64 ml mas 1,78 ml de NPK (20:5:20) por litro, como fertilizante en el cultivo de la microalga *Ankistrodesmus gracilis*.
- Estudiar el efecto del crecimiento con estos mismos fertilizantes o con otros fertilizantes comerciales existentes en Colombia, en diferentes especies de algas cultivadas con fines de alimentación acuícola.
- Investigar el efecto de la utilización del extracto de diferentes especies de macrófitas, en combinación con NPK, en el cultivo de algas existentes en los cuerpos de agua de Colombia.
- Probar la microalga *Ankistrodesmus gracilis* en el comportamiento alimenticio de especies acuícolas que se producen en este país.

BIBLIOGRAFIA

ACUARIOABERIAK. El acuario de arrecife. Acuariofilia. Vizcaya, España.(Citado el 20 de mayo de 2006). Disponible en Internet, URL: <http://www.Acuarioaberiak.com/lib/maslibreria.asp?id=18#tem93>

ÁLVAREZ, Henry. Aspectos biológicos generales: Folleto de algas. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral, 1994. 9 p.

_____. Componentes del agua importante en la ficología: Folleto de algas. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral, 1994. 7 p.

_____. Folleto de algas. Aspectos biológicos generales: Capítulo I. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica, 1994. 9 p.

AB'SABER, A. N.; FORNERIS, L.; MARINO, M. C.; ROCHA, O.; MATSUMURA, T.; SCHAEFFER, Y.; VUONO, Y. S. e WATANABE, S. Glosario de ecología. São Paulo: Editora da ACIESP, 1987. p. 71.

ABALDE, J. A.; HIDALGO, C.; TOIRRES, E. y HERRERO, C. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. España: Universidad de La Coruña, Monografías, 1994. 52 p.

APPLER, H.N. Evaluation of *Hydrodictyon reticulatum* as a protein source in feeds for *Oreochromis (Tilapia) niloticus* and *Zillii*. In: *Jornal Fish Biology*. Brazil. Vol. 27, No. 5 (April. 1895). p. 327-334.

ASSELBOM, V. M.; PARODI, E. R. Ficología. En: XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & XV reunión anual de la Sociedad Botánica de Chile. 2003. p. 38. 2004. (citado el 20 de febrero de 2006) Disponible en Internet <http://www.biologia.edu.ar/sab/boletin/38/145-ficologia.pdf>

BACHION, M. A. Estudo do crescimento e desenvolvimento de três espécies zooplanctônicas submetidas a diferentes dietas alimentares. Tese de Mestrado. Jaboticabal: SP, Brasil: Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, 1996. 248 p.

BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 62 p.

BENÍTEZ, Claudia. El fósforo en capas superficiales del océano. Honolulu, Hawaii: Universidad de Hawaii en Manoa, 2000. (Citado el 10 de Abril de 2006). Disponible en Internet, URL: <http://www.Ciencia.cl/cienciaAIDia/volumen3/numero1/glosario-i.htm>

BOLD, H.C.; WYNNE, M. J. Introduction to the algae: structure e reproduction. New Jersey: Prentice Hall, 1985. 586 p.

CARRERA CÁRDENAS, Jenny. Cultivo de *Tetraselmis suecica* en aguas de baja salinidad, en presencia del producto zeolítico ZEBEN-56.CIVA. 2003. (citado el 20 de febrero de 2006) Disponible en Internet (<http://www.civa2003.org>)

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA (CICESE). Colección de cepas de microalgas. México: Departamento de acuicultura. 2006. (Citado el 20 de mayo de 2006). Disponible en Internet. <http://www.acuicultura.cicese.mx/ventas.htm>

COLE, G.A. Textbook of limnology. London: CV Mosby, Canada. 1979. p. 26.

COUTTEAU P. Microalgae. En: LAVENS P, SORGELOOS P. (eds) *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO-Fisheries Technical Paper. 1996. Rome, FAO. 315 p.

CHU, S. P. The influence of mineral composition of the medium of the grown of the plancktonic algae. In: J. Ecol. Brazil. Vol. 30, No. 6 (July. 1942). 56 p.

DIONÍSIO, Gisela. Sistemas de Produção em Acuicultura, Curso de Biología marinha e pesca. 2004. 12 p.

ELIACH, Jorge. Incidencia de la agitación en el crecimiento microalgal en birreactores. Argentina: Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Exactas Ingeniería y Agrimensura. (Reporte técnico). RT-ID-0.15/2004.(citado el 18 de mayo de 2006) Disponible en Internet, <http://www.fceia.unr.edu.ar/secyt>

FABREGAS, J. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. In: J. Ecol. Brazil. Vol. 7, No. 51 (September. 1986). p. 237- 245.

FIALA, M. Phytoplankton: biomasse, production, numération et culture. Jacques, Antillas Francesas: UNESCO, 1979. p. 54.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fish feeds and feeding in developing countries. Rome: FAO, 1993. 85 p.

GANZAGA, Henry Gustavo. Utilização de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) no tratamento de efluentes de piscicultura e possibilidades de aproveitamento da biomassa vegetal. Tese Mestrado. Jaboticabal, Brasil: Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2001. p. 46.

GRAEFF, Alvaro. Método para multiplicação da alga (*Chlorella minutissima*) para alimentação inicial de um sistema de produção de peixes fitoplantofagos. Espana: CIVA, 2003. (citado el 15 de mayo de 2006). Disponible en Internet: <http://www.civa2003.org>

GUERRERO, R. D. y VILLEGAS, C.T. Report of the training course on growing food organism for fish hatcheries. Philippines, South China: Sea Fisheries Development/Coordinating Programam, 1982. 85 p.

GUERSI, José Luis. Aplicaciones de las microalgas.panorama da aqüicultura. Brasil (citado el 20 de Junio de 2006]: disponible en Internet: <http://www.mgar.net/mar/acuicult.htm>

HABIB, M. A. B. Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and alga culture. In: J. Ecol. Brazil. Vol. 8, No.158 (july. 1997). p. 94-101.

HAPPEY WOOD, C. M. Ecology of freshwater planktonic green algae. In: Sandgren, C.D. growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge: Syndicate of the University of Cambridge. Vo. 4, No.1 (ene.1988), p.175-226.

HERAS HERNÁNDEZ. Francisico. Las algas biblioteca dominico-virtual.republica dominicana.2006. (Citado el 20 de junio de 2006): disponible en Internet: <http://www.bibliotecavirtual.com.do/Biologia/LasAlgas.htm#top>

HOFF, Frank. Y SNELL, Terry. Plankton culture manual. . United States. Sixth edition. 2004. 183 p.

JANET, R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. In: J. Ecol. Brazil. Vol. 30, No. 6 (ene.-feb. 1993). 60 p.

JIMÉNEZ, R. Acta oceanográfica del pacifico. En: INOCAR. Ecuador. Vol. 2, No. 2 (Junio.1983). 15 p.

KERBY NW, STEWART DP. The biotechnology of microalgae and cyanobacteria. En: ROGERS LJ, GALLON JR. (eds). Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe-28*. Oxford Scientifics Publications. 2003. (citado el 20 de febrero de 2006) Disponible en Internet (<http://www.civa2003.org>)

KHAN, Begun. Comparative study on proximate composition and minerals contents of three fresh water green algae. Bangladesh: J. Bot, 1996. 48 p.

KNIE, Joachim. LOPES, Ester. Teste ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis, Brasil: FATMA/ GTZ, 2004. 289 p.

LAZZARO, X. Los peces planctófagos y sus interacciones con las comunidades planctónicas: Curso Internacional avanzado, Métodos en Limnología 2. São Carlos, Brasil: Hidrobiologia, 1985. p. 1-33.

LEMOS PEREIRA. Alitiane Moura. Cultura em larga escala da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (CHLOROPHYCEAE), e do microcrustáceo *Diaphanosoma birgei* (KORINECK,1981) (CLADOCERA) em laboratório. Tese (Doutor em Aqüicultura). Jaboticabal, Brasil, 2001. 82 p.

MACEDO, C. F. y PINTO CARLHO, R. M. NUTRITIONAL STATUS RESPONSE OF *Daphania laevis* AND *Moina micura* FROM A TROPICAL RESERVOIR TO DIFFERENT ALGAL DIETS: *Scenedesmus quadricauda* AND *Ankistrodesmus gracilis*. In: Brazilian Journal of Biology. São Carlos, Brazil. Vol. 61, N. 4 (Nov. 2001). 5 p.

MARSHALL, Darley. Biología de las algas: Enfoque fisiológico. México: Limusa, 1987. 236 p.

MATSUMURA, Tundisi y SIPAÚBA, Lúcia. Phytoplankton composition of Broa Reservoir and its Utilization by *Argyrodiaptomus furcatus* (Copepoda-Calanoidea). In: Simposio de algas. Energia do amanhã. São Paulo, Brasil. Anais. (25, Janeiro, 1986); p. 35-41.

MORRIS, Humberto. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. En: Revista cubana de Alimentación y Nutrición. Santiago de Cuba: Centro de Investigaciones de Energía solar, Vol. 13, No. 1 (enero, 1999). (Citado el 18 de abril de 2006). Disponible en Internet: http://www.bvs.sid.cu/revistas/ali/vol13_2_99/ali07299.htm#.

NAEGEL, L. C. *Azolla meal* as a supplemental feed ingredient for tilapia. In: International conference on Wetland system for water Pollution Control, 6th. Águas de São Pedro, Brazil: Preceedings, 1998. p. 609-618.

NIEVES, Soto. Phytoplankton productivity low cast. 1. Isolated and culture of monoraphidium sp.(chlorophyceae) in a static system of a control culture "f" medium and four alternative culture media with agricultural fertilizers.2004. (citado el 20 de febrero de 2006) Disponible en Internet <http://www.Journal/aquaculture/mexico/articulo443.htm>

NORONHA, M. F. Produção e caracterização de Microalgas para fins de Aquacultura. Relatório de estágio do curso de licenciatura em biologia marinha e pesca. Universidade do Algarbe, Faro.1989. 48 p.

_____. Estudo comparativo de crescimento e comparação bioquímica das microalgas *Dunaliella salina* e *Tetraselmis suecica* em dois meios de cultura. Relatório (Estágio do curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pesca). Brasil: Universidade do Algarve, 1996. 52 p.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Acuicultura más que una industria de explotación. Roma: FAO, 2006. (Citado el 18 de abril de 2006). Disponible en Internet: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2003/21619-es.html>

_____. Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura [online]. Roma: FAO, 2005 (citado el 15 de febrero de 2006). Disponible en Internet: <http://www.fao.org/docrep/003/AB4735/AB73s01.htm>.

POURRIOT, R. Food and feedings habits of rotifers: Arch hydrobiol. Beih: Ergebn. Limnol., 1987. 102 p.

QUINTANA, Maria Magdalena. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica: Suplementos Dietéticos. En: Revista cubana de Alimentación y Nutrición. Santiago de Cuba: Centro de Investigaciones de Energía solar, Vol. 13, No. 2 (Abril, 1999). (Citado el 18 de abril de 2006) Disponible en Internet. http://www.bvs.sid.cu/revistas/ali/vol14_3_99/ali07399.htm#.

RODRIGUES, N. S. y RODRIGUES, M. M. Fito-depuração de água de lavagem de cana pelo aguapé. Brasil. STAB, 1989. 115 p.

SAYED, E. Effects of substituting fish meal with *Azolla pinnata* in practical diets for fingerling and adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Brazil: Aquaculture Fish Management, 1992. 120 p.

STRANO, H.C. Obtenção e caracterização do cencentrado protéico de aguapé (*Eichhornia crassipes*): Piracicaba. Tese (Mestrado em Agronomia). Brasil: Universidade de São Paulo, 1987. 254 p.

STEIN, J. Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements. Cambridge: University press, 1973. p 152.

SIPAÚBA TAVARES, L. H. Limnologia aplicada à Aqüicultura. Jaboticabal, Brasil: FUNEP. Boletim Técnico do CAUNESP No. 1. 1994. 71 p.

_____. Utilização do plâncton na alimentação de larvas e Alevinos de peixes. Tese de Doutor em ciências. São Carlos, SP. Brasil. 1988. 189 p.

_____. Estudo do crescimento populacional de três espécies zooplantônicas em laboratório e uso do plâncton na alimentação de alevinos de *Oreochromis niloticus* e *Astynax scabripinis paranae* (lambari). Em: Rev. UNIMAR, Marília, Brasil. Vol.16, No. 3 (21, maio. 1994), p.195-205.

SIPAÚBA, L. H. y ROCHA, O. cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: l-algas Clorofíceas. Em: Biotemas. Jaboticabal, SP, Brasil. Vol. 6, No.1 (fevereiro. 1993), p. 93-106.

_____. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: algas clorofíceas. Em: Revista Biotemas. Jaboticabal, Brasil. FCAVJ-UNESP. Vol. 6, No.1 (16, abril.1993). p. 96-106.

_____. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos, São Carlos, Brasil, RiMa. 2003.106 p.

SILVA, Dirceu y QUEIROZ, Augusto de. Análise de alimento: Métodos químicos e biológicos. Viçosa, Brasil: Universidade federal de Viçosa, Editora UFV, 2002. 235 p.

SILVA. R. Sistemas de custos para o projeto de cultivo de camarões marinhos do laboratório de camarões marinhos da UFSC. Florianópolis, (Monografia). Universidade federal de Santa Catarina, Brasil. 1997. p. 93-106.

TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual II: Nutrient sources and composition. Brasília: FAO, 1987. 74 p.

TZOVENIS, I.; DE PAUW, N. and SORGELOOS, P. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I: Effect of different light regimes on growth and biomass production. In: Aquaculture., Vol.10, No .216, (May, 2003). p. 203-222.

UNIVERSIDAD DE CENTROAMÉRICA (UCA). Estudio de la calidad ambiental del campo de Gibraltar: Medio ambiente acuático y contaminación acuática. México: Limnología Oceanográfica, 2003. Disponible en Internet: http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/planesCalidad/gibraltar/informe3/informe5_2.pdf p.

ANEXOS

Anexo A. Principales formulaciones para medios de cultivo utilizados en acuicultura.

1. MEDIO CHU₁₀ (MODIFICADO POR GERLOFF) (UMEBAYASHI, 1975)

(Recomendado para aislamiento de microalgas de hábitats oligotróficos y eutróficos)

Ca(NO ₃) ₂	0,04%
K ₂ HPO ₄	0,01%
Na ₂ CO ₃	0,02%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,025%
Na ₂ SiO ₃	0,025%
Citrato de Hierro Amoniacal	0,005%
NOTA: Puede usarse para medio solidificado	
Agar-Agar	1,0%

MEDIO ENRIQUECIDO

MEDIO MIGUEL (ALLEN-NELSON, 1910)

Solución A:	KNO ₃	20, 2 g
	H ₂ O	100 ml
Solución B:	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	4 g
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	4 g
	HCl concentrado	2 ml
	FeCl ₃	2 ml
	H ₂ O	80 ml

Agregar 2 ml de la Solución A y 1 ml de la Solución B a un litro de agua de mar natural, y calentar a 70°C por 20 minutos.

MEDIO ERD-SAHREIBER ENRIQUECIDO (FOYN, 1934 a,b)

NaNO ₃	10 mg
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2 mg
Extracto de suelo	5 ml
Agua de mar	100 ml

MEDIO ERD-SCHREIBER

*Agua de mar	1 litro
Extracto de suelo	50 ml
NaNO ₃	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,03 g

* Se recomienda usar el agua filtrada y pasteurizada, y adicionar los ingredientes.

2. MEDIO DE YASHIMA (SISFFAA, 1964a) (Para cultivo masivo de clorofíceas marinas)

Sulfato de Amonio (para la agricultura 21%)	100 g/t
Superfosfato de Calcio (para la agricultura 21%)	15 g/t
Urea (para la agricultura 21%)	15 g/t
Clewat 32	30–50g/t
Componentes de Clewat 32:	
FeCl ₂ (como fuente de Fe)	0,385%
ZnCl ₂ (como fuente de Zn)	0,166%
MnCl ₂ (como fuente de Mn)	0,775%
CoCl ₂ (como fuente de Co)	0,017%
CuSO ₄ (como fuente de Cu)	0,007%
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (como fuente de Mo)	0,632%
H ₃ BO ₃ (como fuente de B)	2,470%
EDTA	0,005%
MEDIO DE YASHIMA MODIFICADO (HIRATA, 1975)	
Medio de Yashima (en la misma concentración)	
Peptona	50 g/t
Peptidasa	0,005%
Diaminasa	0,005%
(recomendado para cultivos axénicos)	

YANASE & IMAI (1968) PARA <i>Monochrysis lutheri</i>, <i>Platymonas sp.</i>, <i>Nitzschia closterium</i>, <i>Chaetoceros calcitrans</i>			
NaCl	18 mg	Metal Mix ₋	30 ml
KC ¹	600 mg	Fe (as Cl ⁻)	100 µg
NaNO ₃	500 mg	Tris	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5 g	Vit.B ₁₂	3µg
Ca (as Cl ⁻)	100 mg	Na ₂ SiO ₃	80 mg
K ₂ HPO ₄	30 mg	Vitamin Mix**	1 ml
		H ₂ O	1 l

* Mezcla de metales 100 ml, contenido: Na₂ EDTA, 100 mg; Fe, 1 mg; Zn, 0,5 mg; Mn, 4 mg; Co, 0,01 mg; Cu, 0,004 mg; B, 20 mg.

**Mezcla de vitaminas 50 ml, contenido: B₁₂, 10 µg; biotina, 50 µg; B₁, 5 mg

3. MEDIO DE GUILLARD & RHYTER (PARSONS & STRICKLAND, 1961)

A. SOLUCIONES NUTRIENTES

1. Disolver 0,08 gr de clorhidrato de Cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,8 gr de Sulfato de Cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; en 100 ml de H_2O destilada.
2. Añadir 1 ml de solución A.1. a aproximadamente 800 ml de H_2O destilada, que previamente se le ha adicionado:

0,2 gr de Tricloruro Férrico $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,06 gr de Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,12 gr de Sulfato de Manganeseo $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,03 gr de Molibdato de Sodio $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3. Añadir 1,2 gr de Etilenodiaminotetracetato Disódico (EDTA) diluido a cerca de 900 ml de H_2O destilada.
4. Ajustar el pH de la solución con Hidróxido de Sodio IN-Na(OH) , hasta 7,5.
5. Evitar la formación de precipitado, el cual puede elevar la adición de mucho alcali.
6. Añadir 10 gr de Nitrato Potásico KNO_3 y 1,4 gr de Fosfato Dihidratado de Potasio KH_2PO_4 .
7. Diluir la solución a 1 litro y en autoclave a menos de 15 libras de presión por 15 minutos.
8. Guardar la solución en botellas de vidrio en la oscuridad.

B. SILICATO DE SODIO

1. Disolver 10,5 gr de Metasilicato Pentahidratado de Sodio $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ó 14 gr de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua destilada.
3. Esterilizar la solución por filtración a través de un filtro de vidrio.
4. Guardarla en un envase de polipropileno esterilizado.

C. ACIDO HIDROCLORHIDRICO

1. Preparar una solución 0,1N-HCL.
2. Determinar por titulación la cantidad de esta solución necesaria para neutralizar 10 ml de la solución B.2-Si x ml de 0,1N-HCL han sido utilizadas para neutralizar 10 ml de solución B.2, multiplicar por 100 y esta cantidad llevarla a 1 litro de H_2O destilada.
3. Esterilizar la solución ácida por filtración a través de un filtro de vidrio.
4. Guardarlo en una botella de polipropileno esterilizado.

D. SOLUCION DE VITAMINA

1. Disolver 10 mg de Tiamina hidroclicida y 10 mg de Biotina en 100 ml de H₂O destilada.
2. Diluir 10 ml de soluci3n D.1 en 100 ml de H₂O destilada.
3. Esterilizar soluci3n D.2 pas3ndola a trav3s de un filtro de vidrio.
4. Guardarla en porciones de 10 ml en tubos est3riles de tapa enroscada a menos de 20°C.

4. MEDIO DE GUILLAR "F/2" (J. STEIN, 1979)

Nutrientes Mayores		Soluci3n Primaria
NaNO ₃	7,5	% w/v
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,5	% w/v
NH ₄ Cl	2,65	% w/v
Na ₂ SiO ₃ ·9N ₂ O	3	% w/v (calentar para disolver)

Usar un mililitro de estas soluciones por litro de agua de mar, para preparar el medio "F/2". Sugerencia: Preparar el NaNO₃ junto con NaH₂PO₄·H₂O en 100 mililitros.

Metales Traza	Soluci3n Primaria
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,98 % w/v
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2 % w/v
ZnCl ₂	1,05 % w/v
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,0 % w/v
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18 % w/v
Na ₂ MnO ₄ ·2H ₂ O	0,63 % w/v

Es conveniente hacer las soluciones primarias en forma individual. y con una concentraci3n menor de 10⁶ m3s concentrada que en el medio "F/2".

Soluci3n Primaria de Metales Traza

A. Con "Secuestrante F3rrico" (Cloruro F3rrico):

Disolver 5 gr del Secuestrante F3rrico en 900 ml de agua destilada y a3adir 1 ml de cada una de las soluciones primarias de metales traza preparados anteriormente; aforar a un litro y asegurar que el pH quede cerca de 4,5. Use 1 ml de esta soluci3n por cada litro de agua de mar para hacer el medio de cultivo. Agua de mar filtrada (5μ, 10μ, etc.) y de ser posible irradiada con UV.

B. Con EDTA y Cloruro Férrico (FeCl₂·6H₂O)

Disuelva 3,15 g de FeCl₂·6H₂O ó 4,36 de EDTA (Na₂) en 900 ml de agua destilada, agregue 1 ml de cada una de las soluciones stock primarias de metales traza y afore a 1 litro, asegure un pH de 2,0. Use 1 ml de esta solución por litro de agua de mar para preparar el medio "f/2".

Solución Primaria de Vitaminas

- Solución Primaria de Biotina: Se prepara a partir de cristales de B₇, disolver 10 mg de biotina en 96 ml de agua destilada. Haga esta solución ligeramente ácida para ser autoclavada y manténgase en un congelador.
- Solución de Bitamina B₁₂: A partir de Cyanocobalamina U.S. de 1.000 mg/ ml solución inyectable. Tomar 1 ml y aforarlo en 100 ml de agua destilada. La solución se acidifica para ser autoclavada y se congela.

Solución Primaria de Vitaminas

- Tomar 1 ml de la solución primaria de Biotina y 0,1 ml de la solución stock primaria de B₁₂, aforar a 100 ml con agua destilada y añadir 20 mg de Tiamina HCl.

Se pueden preparar ampollitas de 2, 5 ó 10 ml y almacenarlas estériles (acidificas) en el congelador. Use ½ ml de esta solución por cada litro de agua de mar para preparar el medio "f/2".

Preparación del Buffer "Tris"

Tome 50 g de "Tris" y disuélvase en 200 ml de agua destilada y ajuste el pH a 7,2 en HCL. Use de 1 a 5 ml por litro de medio antes de la autoclave, ajustando el pH a 7,4 (recomendado usar 1 ml por litro cuando el pH del medio es 7,9–8,2).

5. MEDIO DE CULTIVO (AGUA DULCE) (Guillard, In: Stein, 1979)

Guillard (comunicación personal a J. Steinn, 1973. Handbook of phycological methods, Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge at the University Press:

a. Macronutrientes:

CaCl ₂ .2H ₂ O	36,76 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	36,97 g/l
NaHCO ₃	12,60 g/l
K ₂ HPO ₄	8,71 g/l
NaNO ₃	85,01 g/l
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	28,42 g/l

De esta solución rotulada como (a), se obtiene 1 ml y se le adiciona a 1 litro de agua esterilizada.

b. Micronutrientes:

Na ₂ EDTA	4,36 g/l
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022 g/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01 g/l
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,18 g/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006 g/l

De esta solución rotulada como (b), se obtiene 1 ml y se le adiciona a 1 litro de agua esterilizada.

c. Vitaminas:

Thiamine. HCl	0,1 mg/l
Biotina	0,5 g/l
Cyanocobalamina	0,5 g/l

De esta solución rotulada como (c), se obtiene 1 ml y se le adiciona a 1 litro de agua esterilizada.

d. Tris:

Tris (Hydroxymethyl)- Aminomethano	50.g/200 ml H ₂ O dest.
--	------------------------------------

(Cuando el cultivo se encuentra axénico el tris puede reemplazarse por Glycylglycine). De esta solución rotulada como (d), obtener 2 ml y adicionar al litro de agua esterilizada que se está preparando el cultivo. Una vez preparado el medio de cultivo, se debe hacer ajuste de pH a 7,2 con HCl cuidadosamente para no obtener el pH ácido.

6. MEDIO MET 44 (SCHONE & SCHONE, 1982)(Para microalgas marinas de la Familia Bacillariophyceae)

NaNO ₃	3,4 mg
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,925 mg
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	10,14 mg
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,803 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	60,0 µg
MnCl ₂ .4H ₂ O	14,4 µg
Vitamina B ₁₂	0,5 µg
Biotina	0,5 µg
Tiamina-HCl	0,5 µg

Para enriquecer un litro de agua de mar

NOTA: La solución stock de Hierro y Silicato debe de acidificarse un poco con una gota de Acido Sulfúrico concentrado, y la solución de EDTA debe acidificarse con acido Clorhídrico.

El EDTA puede ser adicionado antes que el Hierro. Para la producción de microalgas a nivel comercial se usa el agua de mar enriquecida con fertilizantes agrícolas (Urea, Fosfato triple, Nitrato de Amonio, etc.) (CHU, 1942, y Tamiya, 1957; SISFFAA, 1964a) y tradicionalmente la fertilización de estanques con abonos orgánicos, en cultivos de especies herbívoras como las carpas.

Anexo B. Método de extracción y cálculo de clorofila a

a) Extracción y lectura

Para extraer la clorofila de los organismos del agua, se debe filtrar primero una cantidad conocida de agua, en filtros de fibra de vidrio con pequeña porosidad (0,1 a 1 micrómetros). Después estos filtros con las muestras deben ser congelados a una temperatura de 0°C por 24 horas. Luego estas muestras son picadas en pequeños trozos y en seguida se colocan en 10 ml de acetona al 90% a 70°C, posteriormente dejar estas muestras en un ambiente oscuro por 14 horas, por la rápida fotodegradación que sufre la clorofila.

Después de este periodo, el extracto debe ser centrifugado por 20 minutos a 3.000 r.p.m., en seguida se retira el líquido (sobrenadante) y se complementa a 10 ml con acetona 90%. A continuación se realiza lecturas en el espectrofotómetro, en las longitudes de onda de 663 nm y 750 nm, utilizando para esto como blanco acetona 90%. La lectura a 663 nm es aquella en que se detecta la absorción de clorofila a, en cuanto que a 750 nm la clorofila prácticamente no absorbe luz, mas si otros pigmentos y materiales en suspensión. En el caso de la lectura a 750 nm si alcanza valores mayores que 0,01 de absorbancia, se debe recentrifugar la muestra por 10 minutos.

b) Cálculo de clorofila a:

$$\text{Clorofila a (pg/ml)} = 27,9 * ((E^V_{663} - E^V_{750})) * v/V * 100$$

E^V = muestra leída en el espectrofotómetro

V = volumen del extracto (ml)

v = volumen de la muestra filtrada (ml)

1 = diámetro de la cubeta

27,9 = coeficiente de absorción de la clorofila

1,0 = corrección del volumen para litro

663 = lectura a 663 nm

750 = lectura a 750 nm

Existen una infinidad de organismos (vegetales y animales), que ocupan un sistema artificial de cultivo, por lo tanto la buena productividad de los estanques solo esta establecida cuando la dinámica del sistema acuático esta en equilibrio. Cualquier perturbación en el sistema puede alterar este equilibrio, perjudicando la productividad de este sistema.

Anexo C. Método químico para determinación de nutriente.

Cuando se trabaja con análisis químico, se debe tener cuidado en el preparo de los reactivos y la vidriería que se utiliza, a continuación se hace algunas recomendaciones para los análisis de nutrientes en el agua.

a) Cuidados previos

- Lavar la vidriería antes de hacer cualquier análisis
- Lavar con solución sulfocromica o ácido clorhídrico al 10%
- Enjuagar con agua corriente y luego con agua destilada

b) Evitar contaminación

- Utilizar una pipeta para cada solución padrón
- Al pipetear la muestra de agua, lavar la pipeta con la propia muestra
- En el caso de utilizar pipeta automática, usar una puntera para cada reactivo
- Si en la lectura hay grandes diferencias en la coloración, dejar las muestras con la coloración mas fuerte para leerlas al ultimo (evitando la contaminación de los menos concentrados)
- Marcar los balones o tubos de ensayo

c) Método:

- El método es colorimétrico, con lectura en el espectrofotómetro. La concentración de los nutrientes en una muestra es obtenida a través de una regresión lineal, en una curva padrón.

1. AMONIO

a) Solución stock: sulfato de amonio 10 milimolar.

Preparo: 0,661g de sulfato de amonio en 1 litro de agua destilada.

b) Diluciones para curva padrón. En un balón volumétrico (100 ml), pipetear un ml de la solución stock y complementar para 100 ml de agua destilada (solución inicial, concentración 100 micromolar)

A partir de la solución, utilizar balones volumétricos y pipetear los siguientes volúmenes de esta solución:

1 ml/100ml H₂O destilada – solución 1 micromolar

5 ml/100ml H₂O destilada – solución 5 micromolar

10 ml/100ml H₂O destilada – solución 10 micromolar

25 ml/100ml H₂O destilada – solución 25 micromolar

Solamente agua destilada – solución blanco

b) Reactivo colorimétrico (utilizar balón volumétrico de 100 ml)

- Reactivo A: Adicionar 3,5g de ácido fenoico y 0,04g de nitroprusiato de sodio en 100 ml con agua destilada.
- Reactivo B: Adicionar 28g de citrato de sodio en 75 ml de agua destilada. Adicionar 2,27g de NaOH, 5,6 ml de solución hipoclorito y completar para 100 ml de agua destilada. Reactivo estable por un mes, conservado en la nevera.

c) Procedimiento:

- Para cada muestra de agua colectada, incluyendo diluciones padrones y solución blanco (agua destilada pura), pipetear 5 ml de esta en tubo de ensayo, en tres repeticiones para cada muestra.
- Adicionar 0,2 ml del reactivo A, agitar de dos a diez minutos
- En seguida adicionar 0,2 ml del reactivo B y agitar
- Cubrir las muestras con un paño oscuro y dejar en reposo por una hora y treinta minutos
- Hacer lectura en el espectrofotómetro a 630 nm.

2. NITRITO

a) Solución stock: nitrito de sodio 20 milimolar.

Preparo: 0,138g de nitrito de sodio en un litro de agua destilada.

b) Diluciones para curva padrón. En un balón volumétrico de 100 ml, pipetear 1 ml de la solución stock y completar para 100 ml (solución inicial, concentración 20 micromolar).

A partir de la solución inicial, en balones volumétricos de 100 ml, pipetear los siguientes volúmenes de esta solución:

2 ml/100ml H₂O destilada – solución 0,4 micromolar

5 ml/100ml H₂O destilada – solución 1,0 micromolar

25 ml/100ml H₂O destilada – solución 5,0 micromolar

c) Reactivos colorimétricos

- Solución de sulfanilamida: en un balón volumétrico de 50 ml, colocar 30 ml de agua destilada y adicionar 5ml de ácido clorhídrico y 0,5g de sulfanilamida. Después enfriar, completar a 50 ml.
 - Solución Naftil: en un balón de 100 ml, colocar 0,1g de biclorhidato N-1-naftiletilenodiamina, y completar a 100 ml con agua destilada.
- d) Para cada muestra de agua colectada en el estanque, incluyendo diluciones padrones y solución blanco (agua destilada pura), pipetear 5 ml de esta en tubos de ensayo, con replica.
- Adicionar 0,1 ml de sulfanilamida, agitar y esperar de dos a diez minutos.
 - Adicionar 0,1 ml de naftil y agitar.
 - Hacer lectura en el espectrofotómetro a 630 nm, 20 a 30 minutos después de la adición de los reactivos.

3. NITRATO

a) Solución stock. Nitrato de potasio 10 milimolar.

Prepara: 1,02g de nitrato de potasio en 1 litro de agua destilada.

b) Diluciones para curva padrón. En un balón volumétrico de 1.000 ml, pipetear 1 ml de la solución stock y completar para 100 ml de agua destilada (solución inicial, concentración 100 micromolar). A partir de la solución inicial en balones volumétricos de 100 ml, pipetear los siguientes volúmenes de esta solución:

1 ml/100ml H₂O destilada – solución 1 micromolar

5 ml/100ml H₂O destilada – solución 5 micromolar

10 ml/100ml H₂O destilada – solución 10 micromolar

25 ml/100ml H₂O destilada – solución 25 micromolar

c) Reactivos colorimétricos

- Solución de sulfanilamida (descrita anteriormente)
- Solución Naftil. En un balón ml, colocar 0,1g de bicloridato N-1-naftiletilenodiamina y completar para 100 ml de agua destilada.

d) Procedimiento:

- Para hacer posible la lectura del nitrato, es necesario hacer una reducción a nitrito.

La reducción es realizada por el contacto del nitrato con cadmio amalgamado.

- Preparación del cadmio: cadmio granulado debe ser lavado en ácido clorhídrico 5% hasta alcanzar coloración plata brillante. Enjuague el cadmio en agua destilada, colocar el cadmio en solución de clorato de mercurio 1% y agitar por 20 minutos. Lavar nuevamente el cadmio en agua destilada y dejarlo en agua destilada hasta su uso.
- Reducción del nitrato. Colocar 10 ml en las muestras de agua del estanque (incluyendo padrones y blanco) en frascos plásticos, adicionar 0,6g de cadmio amalgado y 0,1 ml de clorato de amonio concentrado (3 molar), dejar agitando por 20 minutos, utilizar el sobrenadante como muestra.
- Para cada muestra de agua del estanque, incluyendo diluciones padrones y soluciones blanco (agua destilada pura), pipetear 5 ml en tubos de ensayo, con replica.
- Adicionar 0,1 ml de sulfanilamida, agitar y esperar de 2 a 10 minutos.
- Adicionar 0,1 ml de naftali y agitar.
- Hacer lectura en el espectrofotómetro a 540 nm, entre 22 minutos y dos horas, después de adicionar los reactivos.

4. MÉTODO QUÍMICO PARA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATO (PO₄)

Solución stock-fosfato de potasio dibásico

Preparo: 0,174g de fosfato de potasio en 1litro de agua destilada (solución 1 milimolar).

a) Diluciones para curva padrón

En un balón volumétrico de 100 ml, pipetear 1 ml de la solución stock y completar para 100 ml de agua destilada (solución inicial, concentración 10 micromolar). A partir de la solución inicial, en balones volumétricos de 100 ml, pipetear los siguientes volúmenes de esta solución:

1 ml/100ml H₂O destilada – solución 0,1 micromolar
 5 ml/100ml H₂O destilada – solución 0,5 micromolar
 10 ml/100ml H₂O destilada – solución 1,0 micromolar
 25 ml/100ml H₂O destilada – solución 2,5 micromolar
 Utilizar la solución inicial como padrón.

b) Reactivo colorimétrico o reactivo mixto para un volumen de 100 ml.

- Acido sulfúrico 15% - adicionar 50 ml
 - Tartato de antimonio y potasio – adicionar 10 ml
 - Molibdato de amonio - adicionar 20 ml
 - Acido ascórbico- adicionar 20 ml
- Este reactivo es estable por 6 horas

c) Procedimiento:

- Pipetear 5 ml de las muestras de agua colectadas del estanque, incluyendo diluciones padrones y solución blanco, en tubos de ensayo y adicionar 0,5 ml del reactivo mixto.
- Agitar y esperar 20 minutos.
- Hacer lectura en el espectrofotómetro a 833 nm.

d) Organización:

- Los reactivos colorimétricos deben ser preparados el día del análisis, como primera actividad a ser realizada.

5. FÓSFORO TOTAL

La solución Standard: fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) 1mMol

Preparación: 0,174gr K_2HPO_4 en 1L de agua destilada

Diluciones para la curva padrón: $0,1/100 = 1,0 \mu\text{mol}/0,5/100 = 5,0/1/100 = 10/2,5/100 = 25/5,0/100 = 50/10/100 = 100$
(No hay solución Standard)

- 10 ml de la solución Standard en 100 ml de H_2O destilada (100 μmol)
- 1 ml de la solución Standard en 100 ml de H_2O destilada (10 μmol)
- 5 ml de solución Standard en 100 ml de H_2O destilada (50 μmol)
- Solución Blanco: solamente 100 ml de agua destilada

Digestión:

- Pipeté 25 ml de muestra (incluyendo las diluciones padrones y la solución blanco) en los tubos de digestión;
- Incremente a cada tubo de digestión 5,0 ml de reactivo oxidante
- Dejar en el digestor a 110 °C, durante 40 minutos;
- Enfriar a temperatura ambiente.

Reactivo colorimétrico:

Reactivo mixto:

- 1 ml del reactivo mixto por 10 ml de muestra, será 25 ml muestra, por lo tanto; serán 2,5 ml de reactivo mixto por muestra.

Preparación:

- Acido sulfúrico 15 % = 5 partes
 - Tartarato de antimonio y potasio = 1 parte
 - Molibdato de amoníaco = 2 partes
 - Acido Ascórbico = 2 partes
- *Reactivo estable durante 6 horas

Procedimiento:

- Después del material de ser digerido, retire 25 ml de cada muestra y coloque en tubos de ensayo;
- Añada 2,5 ml de reactivo mixto a cada tubo de ensayo;
- Esperar de 20 minutos a 2 horas;
- Lectura en el espectrofotómetro: 883 nm.

Anexo D. protocolo de análisis de alimentos adaptado por el laboratorio de bromatología de la Universidad Estatal Paulista.

1. Determinación de proteína

a) materiales y equipos: digestor Kjeldahl, destilador de nitrógeno Labconco, bureta, bolones Kjeldahl, erlenmeyer de 50 ml, balanzas analíticas.

b) Reactivos: Acido sulfúrico concentrado, hidróxido de sodio 32%, acido bórico 4%, ácido sulfúrico 0,1 N titrisol, indicador mixto, mezcla catalítica.

c) Procedimiento: digestión. Se pesa 0,2 g de muestra, se transfiere al balón Kjeldahl, se agrega 2 g de mezcla catalítica, se adiciona 5 ml de acido sulfúrico concentrado, se coloca el balón en el digestor y se digiere, primero a temperatura baja hasta aparición de humos blancos, después aumentar la temperatura hasta que el liquido quede totalmente claro y de un color azul verdoso, se enfría.

Destilación por arrastre con vapor. Se mide 5 ml de acido bórico al 4% en un erlenmeyer, se adiciona 3 gotas de indicador mixto, se transfiere el contenido del balón Kjeldahl al tubo de destilación, se lava cuidadosamente con agua destilada el balón y adicionar al tubo de destilación, luego se adiciona 20ml de hidróxido de sodio al 40%, hasta neutralizar la solución, queda de un color café oscuro, se coloca el erlenmeyer que contiene el acido bórico en el terminal de la salida del equipo de destilación de modo que el terminal quede inmerso en el liquido, se destila por un tiempo de 6 minutos y se comprueba que se ha terminado la destilación de hidróxido de amonio con papel tornasol.

Titilación. Se titula el destilado con acido sulfúrico, se anota el valor de acido sulfúrico gastado.

$$\text{d) cálculos: \% proteína bruta} = \frac{V \times N \times 14 \times 6,25 \times 100}{\text{m.g. de muestra}}$$

V = volumen (ml) de acido sulfúrico

N = normalidad del acido sulfúrico

14 = peso mili equivalente de nitrógeno

6,25 = factor para conversión a proteína

Miligramos de muestra = peso (mg) de muestra

2. Determinación de energía bruta

a) Materiales y equipos. Equipo para determinación de energía, Balanza analítica, prensa para pastillas, capsula para combustión, erlenmeyer 125 ml, bureta 25 ml.

b) Procedimiento: Se pesa 1 g de muestra, se paletiza la muestra, se pesa el pellet y se coloca en el equipo para determinación de energía. Este equipo determina la energía bruta en Kcal/ kg.

3. Determinación de extracto etéreo

a) materiales y equipos: extractor Soxhlet, estufa con graduación de temperatura, papel filtro, desecador, balanza analítica.

b) Reactivos: Éter etílico

c) Procedimiento: se tara un balón de fondo plano, se pesa con precisión 1 g de muestra seca, esta se transfiere al papel filtro y se coloca en el extractor, se acopla el balón conteniendo 100 ml de solvente orgánico, al equipo extractor, se conecta la plancha de calentamiento, se controla la temperatura aproximadamente 35 °C.

Se extrae la grasa bajo reflujo durante 8 horas, se desmonta la muestra, se recupera el solvente, se saca los bolones a 65 °C durante una hora, se enfría en desecador y se pesa.

d) cálculos: % E. E =
$$\frac{\text{Peso E. E}}{\text{Peso muestra (g)}}$$

3. Determinación de fibra cruda

a) Materiales y equipos: Estufa con control de temperatura, desecador, mufla, balanza analítica, plancha de calentamiento, bomba de vacío, tubos para reflujo, erlenmeyer de 152 ml, crisol Gooch, matraz buchner, lana de vidrio.

b) Reactivos: Ácido sulfúrico 1,25%, hidróxido de sodio 24%, alcohol octílico (antiespumante).

c) Procedimiento: Hidrólisis ácida. Se pesa 2,0 g de muestra desengrasada y se transfiere al erlenmeyer, se adiciona 20 ml de ácido sulfúrico al 1,25% y se adiciona 3 gotas de antiespumante, se acopla al sistema de reflujo y se lleva a ebullición exactamente durante 30 minutos.

Hidrólisis alcalina. Se retira el refrigerante y se adiciona 2 ml de hidróxido de sodio al 24%, se acopla al sistema de reflujo y se deja hasta que ebulle nuevamente durante 30 minutos, se filtra la solución caliente a través del crisol Gooch con la lana de vidrio, previamente tarado, se transfiere todo el residuo al crisol lavado con agua caliente, se lava con acetona.

Secado e incineración: secar el crisol en la estufa a 105 °C durante un tiempo mínimo de 3 horas, se enfría en desecador y se pesa, se lleva a peso constante (Wa), se incinera en mufla a 600°C hasta obtener cenizas color blanco, aproximadamente media hora, se lleva a la estufa a 105 °C por 20 minutos y se enfría el crisol en desecador por 20 minutos y se pesa (Wb)

$$\mathbf{d) \text{ cálculos: } \% F. C = \frac{(W_a - W_b)}{\text{Peso muestra (g)}} \times \text{muestra desengrasada}}$$

$$\% \text{ muestra desengrasada} = 100 - \% \text{ extracto etéreo}$$

Anexo E. Valores promedios de cada variable evaluadas por tratamiento

Tratamiento T

Variable	Media	Desviación Estándar	Máximo	Mínimo
Crecimiento	301,91	157,57	447,93	29,59
Temperatura	24,800	1,699	28,000	23,000
pH	7,507	0,361	8,020	6,860
Conductividad	230,667	67,978	350,000	150,000
Alcalinidad	84,133	37,175	134,000	32,000
Nitrato
Amonio	0,342	0,373	1,000	0,011
Ortofosfato	1,453	0,064	1,600	1,400
Fosfato	1,560	0,063	1,700	1,500
Clorofila	0,075	0,0104	0,106	0,063
Oxígeno	5,866	1,342	7,920	4,060
Carbonato	0,329	0,324	0,820	0,020
Bicarbonato	106,391	48,225	161,750	38,960
Co ₂ libre	4,978	3,177	9,920	2,150
Co ₂ total	111,698	48,026	165,130	42,700
Proteína	41,737	1,255	42,770	40,340
Energía	5.247,010	418,177	5.688,540	4.856,950
Extracto Etéreo	25,563	1,101	26,800	24,690
Fibra	10,687	1,830	12,800	9,620

Anexo E. Valores promedios de cada variable evaluadas por tratamiento (continuación)

Tratamiento T2

Variable	Media	Desv. estándar	Máximo	Mínimo
Crecimiento	332,896	173,587	525,020	21,800
Temperatura	24,467	1,922	28,000	23,000
pH	6,907	0,438	7,800	6,140
Conductividad	381,333	44,860	450,000	250,00
Alcalinidad	31,333	8,707	50,000	20,000
Nitrato	0,538	0,354	0,728	0,008
Amonio	0,090	0,102	0,289	0,006
Ortofosfato	0,309	0,407	1,000	0,010
Fosfato total	0,386	0,426	1,200	0,087
Clorofila a	0,076	0,0108	0,106	0,063
Oxígeno	4,737	1,572	7,510	3,250
Carbonato	0,035	0,027	0,090	0,020
Bicarbonato	40,281	11,950	60,990	26,280
CO ₂ libre	20,131	25,017	66,640	0,660
CO ₂ Total	60,493	35,923	127,630	27,370
Proteína	45,067	0,508	45,380	44,480
Energía	5.079,49	270,644	5.295,71	4.775,9
Extracto etéreo	25,797	0,879	26,790	25,120
Fibra	8,827	0,230	9,080	8,630

Anexo F. análisis de varianza mediante el programa estadístico S.A.S

Variable	Método	Varianzas	DF	t Value	Pr > t
Crecimiento	Pooled	Iguals	28	-0,51	0,6128
Crecimiento	Satterthwaite	Desiguales	27,7	-0,51	0,6128
Temperatura	Pooled	Iguals	28	0,50	0,6187
Temperatura	Satterthwaite	Desiguales	27,6	0,50	0,6188
pH	Pooled	Iguals	28	4,10	0,0003
pH	Satterthwaite	Desiguales	27	4,10	0,0003
Conductividad	Pooled	Iguals	28	-7,16	<,0001
Conductividad	Satterthwaite	Desiguales	24,2	-7,16	<,0001
Alcalinidad	Pooled	Iguals	28	5,36	<,0001
Alcalinidad	Satterthwaite	Desiguales	15,5	5,36	<,0001
Nitrato	Pooled	Iguals	0	.	.
Nitrato	Satterthwaite	Desiguales	0	.	.
Nitrito	Pooled	Iguals	0	.	.
Nitrito	Satterthwaite	Desiguales	0	.	.
Amonio	Pooled	Iguals	26	2,35	0,0266
Amonio	Satterthwaite	Desiguales	16,4	2,51	0,0231
Ortofosfato	Pooled	Iguals	28	10,74	<,0001
Ortofosfato	Satterthwaite	Desiguales	14,7	10,74	<,0001
Fosfato total	Pooled	Iguals	28	10,55	<,0001
Fosfato total	Satterthwaite	Desiguales	14,6	10,55	<,0001
Clorofila a	Pooled	Iguals	28	-1,41	0,1698
Clorofila a	Satterthwaite	Desiguales	16,9	-1,41	0,1769
Oxigeno	Pooled	Iguals	16	1,64	0,1209
Oxigeno	Satterthwaite	Desiguales	15,6	1,64	0,1213
Carbonato	Pooled	Iguals	13	2,19	0,0473
Carbonato	Satterthwaite	Desiguales	8,17	2,71	0,0262
Bicarbonato	Pooled	Iguals	16	3,99	0,0010
Bicarbonato	Satterthwaite	Desiguales	8,98	3,99	0,0032
CO ₂ libre	Pooled	Iguals	16	-1,80	0,0903
CO ₂ libre	Satterthwaite	Desiguales	8,26	-1,80	0,1079
CO ₂ total	Pooled	Iguals	16	2,56	0,0209
CO ₂ total	Satterthwaite	Desiguales	14,8	2,56	0,0219
Proteína	Pooled	Iguals	4	-4,26	0,0131
Proteína	Satterthwaite	Desiguales	2,64	-4,26	0,0305
Energía	Pooled	Iguals	4	0,58	0,5915
Energía	Satterthwaite	Desiguales	3,43	0,58	0,5964
Extracto etéreo	Pooled	Iguals	4	-0,29	0,7884
Extracto etéreo	Satterthwaite	Desiguales	3,81	-0,29	0,7891
Fibra	Pooled	Iguals	4	1,75	0,1557
Fibra	Satterthwaite	Desiguales	2,06	1,75	0,2190

Anexo G. Correlación de las variables en el crecimiento de la microalga

	CRECI	TEMPER	pH	CONDUC	ALCALI	NITRA	NITRI	AMON	ORTOF	FOSF TQ	CLOROF	W TOTL	CENIZA	OXIG	CARBON	BICARB	CO2LIBR	CO2TOT	PROT	ENERG	E.ETEREO	FIBRA
	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u	v	w
b	100.000	-0.7312	0.51412	0.21826	0.28696	-0.98656	0.73799	-0.57314	-0.42817	-0.43134	0.34435	0.85852	0.43720	-0.15496	0.47421	0.31617	-0.55752	0.09824	0.06875	0.25095	-0.08931	-0.32044
		<.0001	0.0037	0.2466	0.1242	0.0134	0.4715	0.0014	0.0183	0.0173	0.0624	<.0001	0.0157	0.5392	0.0741	0.2012	0.0162	0.6982	0.8970	0.6315	0.8664	0.5358
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6
c	-0.73913	100.000	-0.42571	-0.12617	-0.12599	0.99938	.	0.68689	0.35846	0.37177	-0.17333	-0.64343	-0.33191	-0.42780	-0.18182	-0.27619	0.61103	-0.03732
	<.0001		0.0190	0.5065	0.5071	0.0006	.	<.0001	0.0518	0.0431	0.3597	0.0002	0.0732	0.0766	0.5166	0.2673	0.0071	0.8831
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6
d	0.51412	-0.42571	100.000	-0.51527	0.62470	-0.99336	0.99340	-0.10444	0.33108	0.31353	-0.09253	0.20554	-0.16889	0.25389	0.44426	0.34927	-0.83476	0.02263	-0.77262	0.42480	-0.02599	0.41775
	0.0037	0.0190		0.0036	0.0002	0.0066	0.0732	0.5969	0.0739	0.0916	0.6268	0.2848	0.3723	0.3093	0.0971	0.1554	<.0001	0.9290	0.0717	0.4011	0.9610	0.4098
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6
e	0.21826	-0.12617	-0.51527	100.000	-0.23413	0.92960	-0.18898	-0.51436	-0.64688	-0.64496	0.18750	0.31011	0.36515	-0.51294	-0.01194	-0.39170	0.51837	-0.18525	0.89295	-0.27531	0.17044	-0.64817
	0.2466	0.5065	0.0036		0.2130	0.0704	0.8790	0.0051	0.0001	0.0001	0.3211	0.1016	0.0472	0.0295	0.9663	0.1079	0.0275	0.4618	0.0166	0.5975	0.7468	0.1639
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6
f	0.28696	-0.12599	0.62470	-0.23413	100.000	0.60429	-0.82199	-0.12508	0.64194	0.63866	-0.14990	-0.06289	-0.45701	-0.10141	0.96783	0.88296	-0.07109	0.84731	0.39761	-0.72084	-0.25292	-0.11454
	0.1242	0.5071	0.0002	0.2130		0.3957	0.3857	0.5260	0.0001	0.0001	0.4292	0.7459	0.0111	0.6889	<.0001	<.0001	0.7792	<.0001	0.4350	0.1060	0.6287	0.8289
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6
g	-0.98656	0.99938	-0.99336	0.92960	0.60429	100.000	0.93781	0.97004	0.99946	0.98900	-0.92654	-0.99655	-0.97885	0.94269	.	-0.96857	-0.99969	-0.99364	-0.12937	0.82815	0.36660	-0.78792
	0.0134	0.0006	0.0066	0.0704	0.3957		0.2257	0.0300	0.0005	0.0110	0.0735	0.0035	0.0212	0.2166	.	0.1600	0.0157	0.0719	0.9174	0.3788	0.7610	0.4223
	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	3	0	3	3	3	3	3	3	3
h	0.73799	.	0.99340	-0.18898	-0.82199	0.93781	100.000	0.96681	100.000	100.000	0.98783	-0.27735	0.97736	0.99990	.	-0.82199	-0.92894	-0.89275	-0.46555	0.97122	0.66677	-0.95268
	0.4715	.	0.0732	0.8790	0.3857	0.2257		0.1645	<.0001	<.0001	0.0994	0.8211	0.1357	0.0091	.	0.3857	0.2414	0.2975	0.6917	0.1531	0.5354	0.1966
	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3
i	-0.57314	0.68689	-0.10444	-0.51436	-0.12508	0.97004	0.96681	100.000	0.49644	0.49646	-0.07984	-0.52833	-0.30920	0.06329	-0.23370	-0.19937	0.00415	-0.19656	-0.90582	0.30255	-0.12755	0.65287
	0.0014	<.0001	0.5969	0.0051	0.5260	0.0300	0.1645		0.0072	0.0072	0.6863	0.0046	0.1094	0.8030	0.4019	0.4277	0.9870	0.4344	0.0129	0.5600	0.8097	0.1598
	28	28	28	28	28	4	3	28	28	28	28	27	28	18	15	18	18	18	6	6	6	6
j	-0.42817	0.35846	0.33108	-0.64688	0.64194	0.99946	100.000	0.49644	100.000	0.99795	-0.35984	-0.66052	-0.75665	0.27661	0.46187	0.61132	0.01809	0.61148	-0.94546	0.19855	-0.20533	0.74492
	0.0183	0.0518	0.0739	0.0001	0.0001	0.0005	<.0001	0.0072		<.0001	0.0508	<.0001	<.0001	0.2665	0.0831	0.0070	0.9432	0.0070	0.0044	0.7061	0.6963	0.0893
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6
k	-0.43134	0.37177	0.31353	-0.64496	0.63866	0.98900	100.000	0.49646	0.99795	100.000	-0.35148	-0.66027	-0.75301	0.26388	0.46174	0.61605	0.03691	0.62334	-0.93494	0.31425	-0.09875	0.70293
	0.0173	0.0431	0.0916	0.0001	0.0001	0.0110	<.0001	0.0072	<.0001		0.0568	<.0001	<.0001	0.2900	0.0832	0.0065	0.8844	0.0057	0.0062	0.5441	0.8524	0.1193
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6
l	0.34435	-0.17333	-0.09253	0.18750	-0.14990	-0.92654	0.98783	-0.07984	-0.35984	-0.35148	100.000	0.52976	0.52525	-0.08964	0.01389	-0.05624	0.06882	-0.02886	0.21726	0.74277	0.54640	-0.58100
	0.0624	0.3597	0.6268	0.3211	0.4292	0.0735	0.0994	0.6863	0.0508	0.0568		0.0031	0.0029	0.7235	0.9608	0.8246	0.7861	0.9095	0.6792	0.0907	0.2620	0.2266
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6

Anexo G. Correlación de las variables en el crecimiento de la microalga (Continuación)

	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u	v	w
m	0.85852	-0.64343	0.20554	0.31011	-0.06289	-0.99655	-0.27735	-0.52833	-0.66052	-0.66027	0.52976	100.000	0.71109	-0.19443	-0.01516	0.01740	-0.49953	-0.17745	0.55627	0.09210	0.17948	-0.22782
	<.0001	0.0002	0.2848	0.1016	0.7459	0.0035	0.8211	0.0046	<.0001	<.0001	0.0031		<.0001	0.4546	0.9590	0.9471	0.0412	0.4956	0.3302	0.8829	0.7727	0.7125
	29	29	29	29	29	4	3	27	29	29	29	29	29	17	14	17	17	17	5	5	5	5
n	0.43720	-0.33191	-0.16889	0.36515	-0.45701	-0.97885	0.97736	-0.30920	-0.75665	-0.75301	0.52525	0.71109	100.000	-0.10596	-0.40350	-0.34634	-0.19816	-0.42008	-0.47925	-0.58020	-0.58916	0.71744
	0.0157	0.0732	0.3723	0.0472	0.0111	0.0212	0.1357	0.1094	<.0001	<.0001	0.0029	<.0001		0.6756	0.1358	0.1591	0.4306	0.0826	0.3362	0.2274	0.2185	0.1085
	30	30	30	30	30	4	3	28	30	30	30	29	30	18	15	18	18	18	6	6	6	6
o	-0.15496	-0.42780	0.25389	-0.51294	-0.10141	0.94269	0.99990	0.06329	0.27661	0.26388	-0.08964	-0.19443	-0.10596	100.000	-0.16676	0.15210	-0.49812	-0.04368	-0.75230	0.56500	0.12114	0.39186
	0.5392	0.0766	0.3093	0.0295	0.6889	0.2166	0.0091	0.8030	0.2665	0.2900	0.7235	0.4546	0.6756		0.5525	0.5469	0.0354	0.8634	0.0844	0.2427	0.8192	0.4423
	18	18	18	18	18	3	3	18	18	18	18	17	18	18	15	18	18	18	6	6	6	6
p	0.47421	-0.18182	0.44426	-0.01194	0.96783	.	.	-0.23370	0.46187	0.46174	0.01389	-0.01516	-0.40350	-0.16676	100.000	0.83689	-0.38531	0.81497	0.47589	0.13535	-0.04727	-0.68943
	0.0741	0.5166	0.0971	0.9663	<.0001	.	.	0.4019	0.0831	0.0832	0.9608	0.9590	0.1358	0.5525		<.0001	0.1561	0.0002	0.6843	0.9136	0.9699	0.5157
	15	15	15	15	15	0	0	15	15	15	15	14	15	15	15	15	15	15	3	3	3	3
q	0.31617	-0.27619	0.34927	-0.39170	0.88296	-0.96857	-0.82199	-0.19937	0.61132	0.61605	-0.05624	0.01740	-0.34634	0.15210	0.83689	100.000	-0.16816	0.92440	0.40015	-0.72032	-0.25145	-0.11570
	0.2012	0.2673	0.1554	0.1079	<.0001	0.1600	0.3857	0.4277	0.0070	0.0065	0.8246	0.9471	0.1591	0.5469	<.0001		0.5048	<.0001	0.4318	0.1064	0.6308	0.8272
	18	18	18	18	18	3	3	18	18	18	18	17	18	18	15	18	18	18	6	6	6	6
r	-0.55752	0.61103	-0.83476	0.51837	-0.07109	-0.99969	-0.92894	0.00415	0.01809	0.03691	0.06882	-0.49953	-0.19816	-0.49812	-0.38531	-0.16816	100.000	0.22052	0.82728	-0.45169	0.02529	-0.53130
	0.0162	0.0071	<.0001	0.0275	0.7792	0.0157	0.2414	0.9870	0.9432	0.8844	0.7861	0.0412	0.4306	0.0354	0.1561	0.5048		0.3792	0.0422	0.3685	0.9621	0.2780
	18	18	18	18	18	3	3	18	18	18	18	17	18	18	15	18	18	18	6	6	6	6
s	0.09824	-0.03732	0.02263	-0.18525	0.84731	-0.99364	-0.89275	-0.19656	0.61148	0.62334	-0.02886	-0.17745	-0.42008	-0.04368	0.81497	0.92440	0.22052	100.000	0.75380	-0.52938	-0.03885	-0.45104
	0.6982	0.8831	0.9290	0.4618	<.0001	0.0719	0.2975	0.4344	0.0070	0.0057	0.9095	0.4956	0.0826	0.8634	0.0002	<.0001	0.3792		0.0835	0.2801	0.9418	0.3693
	18	18	18	18	18	3	3	18	18	18	18	17	18	18	15	18	18	18	6	6	6	6
t	0.06875	.	-0.77262	0.89295	0.39761	-0.12937	-0.46555	-0.90582	-0.94546	-0.93494	0.21726	0.55627	-0.47925	-0.75230	0.47589	0.40015	0.82728	0.75380	100.000	-0.01116	0.29380	-0.86884
	0.8970	.	0.0717	0.0166	0.4350	0.9174	0.6917	0.0129	0.0044	0.0062	0.6792	0.3302	0.3362	0.0844	0.6843	0.4318	0.0422	0.0835		0.9833	0.5720	0.0247
	6	6	6	6	6	3	3	6	6	6	6	5	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
u	0.25095	.	0.42480	-0.27531	-0.72084	0.82815	0.97122	0.30255	0.19855	0.31425	0.74277	0.09210	-0.58020	0.56500	0.13535	-0.72032	-0.45169	-0.52938	-0.01116	100.000	0.83922	-0.35355
	0.6315	.	0.4011	0.5975	0.1060	0.3788	0.1531	0.5600	0.7061	0.5441	0.0907	0.8829	0.2274	0.2427	0.9136	0.1064	0.3685	0.2801	0.9833		0.0367	0.4918
	6	6	6	6	6	3	3	6	6	6	6	5	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
v	-0.08931	.	-0.02599	0.17044	-0.25292	0.36660	0.66677	-0.12755	-0.20533	-0.09875	0.54640	0.17948	-0.58916	0.12114	-0.04727	-0.25145	0.02529	-0.03885	0.29380	0.83922	100.000	-0.54291
	0.8664	.	0.9610	0.7468	0.6287	0.7610	0.5354	0.8097	0.6963	0.8524	0.2620	0.7727	0.2185	0.8192	0.9699	0.6308	0.9621	0.9418	0.5720	0.0367		0.2656
	6	6	6	6	6	3	3	6	6	6	6	5	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
w	-0.32044	.	0.41775	-0.64817	-0.11454	-0.78792	-0.95268	0.65287	0.74492	0.70293	-0.58100	-0.22782	0.71744	0.39186	-0.68943	-0.11570	-0.53130	-0.45104	-0.86884	-0.35355	-0.54291	100.000
	0.5358	.	0.4098	0.1639	0.8289	0.4223	0.1966	0.1598	0.0893	0.1193	0.2266	0.7125	0.1085	0.4423	0.5157	0.8272	0.2780	0.3693	0.0247	0.4918	0.2656	
	6	6	6	6	6	3	3	6	6	6	6	5	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6