

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE BIOLOGIA



PRODUCCION DE BIOMASA DE Tetraselmis suecica (Kyllin) Butcher
Y Artemia franciscana Kellog A PARTIR DE ESTIERCOL DE GALLINA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JOSE LUIS ZAVALA AGUIRRE

GUADALAJARA, JALISCO. 1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

| | | |
|-------|--|-----|
| | DEDICATORIA | II |
| | AGRADECIMIENTOS | III |
| | CONTENIDO | IV |
| | FIGURAS, FOTOGRAFÍAS, TABLAS Y GRÁFICAS | V |
| | RESUMEN Y ABSTRACT | VII |
| 1 | INTRODUCCION | 1 |
| 2 | REVISION BIBLIOGRAFICA | 3 |
| 3 | MATERIALES Y METODOS | 5 |
| 3.1 | DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LA UNIDAD DE FERMENTACION | 5 |
| 3.2 | SOBRE LOS BIOENSAYOS CON <i>Tetraselmis suecica</i> | 10 |
| 3.2.1 | CARACTERISTICAS GENERALES | 10 |
| 3.2.2 | BIOENSAYOS PARA DETERMINAR EL PERIODO DE DIGESTION Y LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE ESTIERCOL DE GALLINA, OPTIMOS PARA PROMOVER EL DESARROLLO DE <i>Tetraselmis suecica</i> | 13 |
| 3.2.3 | CULTIVOS MASIVOS DE <i>Tetraselmis suecica</i> | 14 |
| 3.3 | SOBRE EL BIOENSAYO CON <i>Artemia franciscana</i> | 16 |
| 3.3.1 | GENERALIDADES | 16 |
| 3.3.2 | CULTIVO DEL ALGA <i>Tetraselmis suecica</i> UTILIZADA COMO ALIMENTO | 16 |
| 3.3.3 | CULTIVO EXPERIMENTAL DE <i>Artemia franciscana</i> | 17 |
| 4 | RESULTADOS | 20 |
| 4.1 | SOBRE EL COMPORTAMIENTO DEL DIGESTOR | 20 |
| 4.2 | BIOENSAYOS CON EL ALGA <i>Tetraselmis suecica</i> | 20 |
| 4.2.1 | PRIMER BIOENSAYO | 20 |
| 4.2.2 | SEGUNDO BIOENSAYO | 22 |
| 4.2.3 | TERCER BIOENSAYO | 23 |
| 4.2.4 | CULTIVOS MASIVOS DE <i>Tetraselmis suecica</i> | 25 |
| 4.3 | SOBRE EL BIOENSAYO CON <i>Artemia franciscana</i> | 25 |
| 4.3.1 | COMPORTAMIENTO DE LOS CULTIVOS MASIVOS DE <i>Tetraselmis suecica</i> UTILIZADOS COMO ALIMENTO | 25 |
| 4.3.2 | SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE <i>Artemia franciscana</i> | 26 |
| 5 | DISCUSION | 33 |
| 6 | CONCLUSIONES | 43 |
| 7 | BIBLIOGRAFIA | 44 |
| | APENDICE | 50 |

FIGURAS, FOTOGRAFÍAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Figuras

| | | |
|-----|-----------------------------------|---|
| 3.1 | Las partes del digestor | 6 |
|-----|-----------------------------------|---|

Fotografías

| | | |
|-----|--|----|
| 3.1 | El digestor | 9 |
| 3.2 | La incubadora | 12 |
| 3.3 | Cultivos masivos de <i>Tetraselmis suecica</i> | 15 |
| 3.4 | Bioensayo con <i>Artemia franciscana</i> | 18 |

Tablas

| | | |
|--------|--|----|
| 3.1 | Características de las variables que se manipularon en los bioensayos con el alga <i>Tetraselmis suecica</i> | 14 |
| 3.2 | Concentraciones de extracto y volúmenes utilizados en los cultivos masivos de <i>Tetraselmis suecica</i> | 15 |
| 4.1 | Resumen del comportamiento del digestor | 20 |
| 4.2 | Densidades máximas alcanzadas por las réplicas de los diferentes grupos del primer bioensayo | 21 |
| 4.3 | Resumen del ANOVA del primer bioensayo | 22 |
| 4.4 | Resultados de la d ^o cima SNK para los grupos del primer bioensayo | 22 |
| 4.5 | Densidades máximas alcanzadas por las réplicas de los diferentes grupos del tercer bioensayo | 23 |
| 4.6 | Resumen del ANOVA del tercer bioensayo | 24 |
| 4.7 | Resultados de la d ^o cima SNK para los datos del tercer bioensayo | 24 |
| 4.8 | Resultados de la prueba U de Mann-Whitney para comparar las tasas de crecimiento entre los grupos del tercer bioensayo | 25 |
| 4.9 | Densidades máximas alcanzadas por <i>Tetraselmis suecica</i> en los cultivos masivos | 25 |
| 4.10 a | Arcoseno $\sqrt{(\% \text{ sobrevivencia})}$, del grupo "F" | 27 |
| 4.10 b | Arcoseno $\sqrt{(\% \text{ sobrevivencia})}$, del grupo "EX" | 28 |
| 4.10 c | Arcoseno $\sqrt{(\% \text{ sobrevivencia})}$, del grupo "S" | 28 |
| 4.11 | Resumen de los ANOVAs realizados | 29 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.12 | Longitudes en mm de los animales al décimo día de cultivo | 31 |
| 4.13 | Resumen del ANOVA entre las longitudes alcanzadas al décimo día por los individuos de los diferentes grupos | 32 |

Gráficas

| | | |
|-----|--|----|
| 4.1 | Comportamiento de los cultivos semicontinuos de <i>Tetraselmis suecica</i> con los diferentes medios | 26 |
| 4.2 | Sobrevivencias de <i>Artemia franciscana</i> en los diferentes grupos | 30 |

RESUMEN

Se realizó un cultivo experimental con el crustáceo anostraco *Artemia franciscana* teniendo como única variable independiente a la alimentación. En el grupo control se utilizó como alimento al alga prasinoficea *Tetraselmis suecica* cultivada en un medio compuesto de reactivos químicos de grado analítico. En el grupo experimental se utilizó como alimento a la misma alga, cultivada en un medio enriquecido con un extracto producido por la digestión aeróbica de estiércol de gallina. La sobrevivencia y crecimiento, por lo tanto el rendimiento, en los dos sistemas de cultivo, no difirió significativamente ($p > 0.05$). El uso de desechos orgánicos en sistemas de cultivo acuáticos para contrarrestar la eutroficación, es discutido.

ABSTRACT

The anostracan crustacean *Artemia franciscana* was cultured under controlled conditions. It was fed on the prasinophycean algae *Tetraselmis suecica* which was produced in a media fertilized either with analytical grade inorganic salts (the control group) or with an extract obtained from an aerobic fermentation of chicken manure. Survival, size increase, and growth efficiency were found to be the same in both groups ($p > 0.05$). Advantageous use of manures via aquaculture systems as a means of avoiding environmental eutrophication is discussed.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Las grandes cantidades de desechos que se producen en las modernas bioindustrias tales como las granjas de aves o de cerdos causan serios problemas ambientales porque generalmente son liberados de una forma incontrolada. La generalización de esta práctica puede ser explicada ya sea por la falta de una legislación que norme estas actividades o por la falta de rigor en el momento de aplicarla, en caso de existir. Desde un punto de vista ecológico estos desechos son la energía no asimilada por los consumidores y constituyen junto con las pérdidas en forma de calor, aproximadamente de 80 a 90 % de la energía potencial que originalmente entró al nivel trófico (Odum, 1972). Nótese aquí el bajo nivel en la eficiencia de captación de energía; ésto aunado a la manera sistemática en que los desechos son producidos, explica claramente el porqué de su acumulación y de su impacto ambiental.

El valor energético de los desechos animales ha sido verificado repetidamente, desde antaño utilizándolos como excelentes fertilizantes agrícolas en la producción de granos, legumbres y frutos. Recientemente se ha estado estudiando la posibilidad de recuperar esta energía reciclando el material a través de la producción de proteína animal, debido a las necesidades mundiales que hay de ésta así como a la urgencia de proteger nuestro medio ambiente.

Una forma práctica de reciclar los nutrientes contenidos en estos desechos, es a través de un productor primario. Con técnicas de fermentación, es posible mineralizar los desechos animales para que puedan ser aprovechados como nutrientes por especies vegetales altamente productivas y posteriormente esta biomasa ser ofrecida como alimento a herbívoros. De esta forma la energía inicialmente no captada, puede utilizarse para formar un producto capaz de amortiguar las pérdidas energéticas y al mismo tiempo reducir la cantidad de desechos arrojados al medio.

El reciclamiento de los nutrientes contenidos en productos de desecho, para producir proteínas de origen vegetal y animal por vía de cadenas

alimenticias acuáticas controladas, ésto es, por medio de técnicas de acuicultura, ofrece perspectivas prometedoras e interesantes.

El objetivo de este trabajo es cultivar al crustáceo anostráceo *Artemia franciscana* Kellog, utilizando como recurso alimenticio al alga unicelular prasinoficea *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher, producida esta última a partir de un medio de cultivo obtenido por la digestión aeróbica de estiércol de gallina.

CAPITULO 2

REVISION BIBLIOGRAFICA

El cultivo de zooplancton que normalmente constituye el alimento natural de larvas de peces y crustáceos es comercialmente incosteable y técnicamente difícil de realizar (Girin y Person-Le Ruyet, 1977, *en* Sorgeloos, 1980). Un adelanto muy significativo en acuicultura se hizo por Seale (1933) y por Rolletsen (1939) al descubrir que las larvas nauplio de *Artemia* constiuyen un buen alimento para larvas de peces recién nacidas. Se ha encontrado que *Artemia* puede ser utilizada como alimento por un grupo muy diverso de organismos como: foraminíferos, celenterados, platelmintos, poliquetos, calamares, insectos y una gran variedad de crustáceos y peces, tanto marinos como dulceacuícolas (Sorgeloos, 1980). En su tratado sobre cultivo de organismos marinos, Kinne (1977) indica que más del 85 % de los animales marinos cultivados han sido de una u otra forma alimentados con *Artemia*. La ventaja de utilizar *Artemia* como alimento es que se comienza a partir de un producto aparentemente inerte conocido como "quistes de *Artemia*" los cuales son embriones en estado latente. Estos son comercialmente disponibles y pueden ser almacenados por años, requiriendo tan solo ser incubados por 24 horas en agua de mar para producir larvas libres nadadoras (Sorgeloos, 1980).

En la mayoría de los casos la *Artemia* es utilizada en su estadio de "nauplio" recién eclosionado. Sin embargo ha sido reportado que preadultos son mejor alimento que los nauplios para algunos predadores (Kelly *et al.*, 1977, *en* Sorgeloos, 1980). Este tipo de aplicaciones muchas veces es limitado por el hecho de que deben ser cultivadas durante algunos días y la mayoría de las técnicas descritas tienen aplicaciones limitadas debido a la complejidad de la técnica, a la disponibilidad limitada o al gran precio del alimento utilizado (Dobbeleir *et al.*, 1978, Bossuyt y Sorgeloos, 1980, *en* Sorgeloos, 1980).

Durante las últimas décadas se ha dado mucha atención al desarrollo de tratamiento de aguas de desecho integrado a la acuicultura (Wolrath y Natter, 1976). Paralelamente a la reutilización de aguas de desecho domésticas tanto para sistemas acuícolas marinos como dulceacuícolas (Ryther *et al.*, 1972; Shelef *et al.*, 1976; Allen y Carpenter, 1977; Oswald

et al., 1977) el reciclaje y valoración de aguas de desecho de origen animal como estiércoles está ganando interés (Schoroender y Hepher, 1976, Waygood, 1976, De Paw y De Leenheer, 1977, Lincoln *et al.*, 1977, De Paw *et al.*, 1978, Maddox *et al.*, 1978, Nugent, 1978, *en* De Paw *et al.*, 1978). La principal motivación para estos procedimientos es la acumulación de grandes cantidades de estiércol que causan severos problemas ambientales, urgiéndose una solución (O'Callaghan *et al.*, 1973). Actualmente en muchos laboratorios se investiga sobre el cultivo de microalgas tanto marinas como dulceacuícolas en medios de cultivo a base de estiércoles; estas algas pueden ser utilizadas como alimento para muchos animales que se nutren por filtración tales como pequeños crustáceos y moluscos (De Paw *et al.*, 1980). Aquí en México no ha sido la excepción, pues recientemente se ha reportado sobre la producción de microalgas marinas, utilizando como precursor del medio de cultivo, excretas de animales tratadas (Paniagua *et al.*, 1987). La factibilidad de cultivar *Artemia* utilizando microalgas como alimento ha sido verificada recientemente por varios investigadores (Johnson, 1980; Milligan *et al.*, 1980; Nimura, 1980; Tobias *et al.*, 1980). Así mismo el uso integrado de fitoplancton y *Artemia* en el tratamiento de aguas de desecho urbano, es un procedimiento prometedor (McShan *et al.*, 1974).

En base a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es demostrar la factibilidad de utilizar estiércol de gallina en la producción de biomasa de *Artemia*, utilizando como intermediario el alga unicelular *Tetraselmis suecica*.

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

Todo el trabajo fué realizado en las instalaciones y con el equipo del Laboratorio de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Guadalajara, en Barra de Navidad Jal., México.

3.1 DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LA UNIDAD DE FERMENTACION

La unidad de fermentación que se utilizó, fué una adaptación del diseño desarrollado por el Dr. Alberto Abreu del I.C.M.L.-U.N.A.M., dentro del proyecto CONACYT-U.N.A.M. PCECBNA-030216 "Estudio integral del aprovechamiento de la *Artemia* en la acuicultura" y tiene las siguientes características (ver figura 3.1).

Consiste en un par de cubetas plásticas de 20 l de capacidad cada una, con las siguientes dimensiones: 27.5 cm de diámetro y 33.5 cm de altura. Uno de estos recipientes estaba lleno hasta la mitad con piedra volcánica muy porosa, granulada a un tamaño medio de 5 cm de diámetro. La finalidad de la piedra fué, ser un sustrato de amplia superficie de contacto para la fijación de una comunidad microbiana que posteriormente se encargará de la degradación y mineralización de la materia orgánica y constituye propiamente, la "cama o cámara de degradación". Este recipiente lleva en su parte inferior un tubo de PVC de una pulgada de diámetro (tubo conector inferior) que desemboca en el costado superior del otro recipiente, la "cámara de retención", cuya finalidad entre otras es recibir continuamente el licor que ha pasado por la cámara de degradación. Justamente del lado contrario a donde desemboca el tubo conector arriba referido, sale otro tubo de similares características, que vierte en la parte lateral superior de la cámara de degradación (tubo conector superior); de esta forma el líquido dentro del sistema puede ser indefinidamente recirculado mediante un bombeo de aire-agua (del inglés: "air-lift pump"). Este sistema de bombeo se basa en el principio de que la mezcla agua-aire, relativamente de menor densidad, es impulsada hacia arriba en una columna de agua. Para la instauración de este sistema de bombeo se introdujo una manguera de plástico de 5 mm de diámetro dentro del tubo conector inferior como se aprecia en la figura 3.1. El extremo de esta manguera se selló con calor y así

mismo se le practicaron múltiples perforaciones de 1 mm de diámetro aproximadamente, con una aguja de disección caliente. De esta forma, al inyectar aire por la manguera, éste era disipado en diminutas burbujas dentro del tubo conector lleno de líquido, disminuyéndose así la densidad de este último. A continuación se produce un ascenso del líquido menos denso y un flujo correspondiente de la cámara de degradación hacia la cámara de retención. Finalmente, el ciclo es cerrado cuando un volumen de igual magnitud al que fué agregado a la cámara de retención, es transmitido a la cámara de degradación mediante el tubo conector superior.

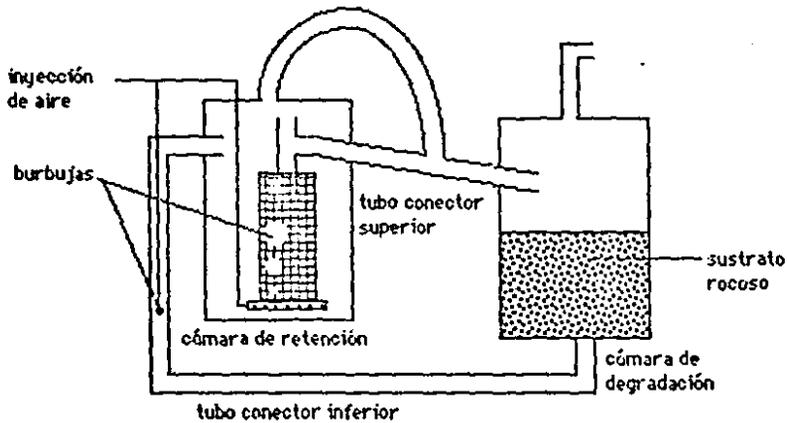


Figura 3.1 Las partes del digester. No a escala.

En el fondo de la cámara de degradación se colocó una malla de plástico de 1 mm de abertura para evitar el paso de material sólido hacia los tubos conectores y causar un posterior colapso en el sistema. Así mismo, dentro de la cámara de retención, donde posteriormente se introdujo la mezcla de agua y estiércol de gallina, se instaló un sistema de filtración con las siguientes características (figura 3.1): se formó un cilindro con malla de plástico de 1 mm de abertura, para lo cual se utilizó un tubo de PVC de 4 pulgadas de diámetro y de 15 cm de altura, como molde y estructura. A este tubo de PVC se le practicaron múltiples orificios de tal manera que el líquido pudiera circular libremente a través de la malla

recubridora, sin encontrar obstáculo en la estructura de PVC. Los extremos de este cilindro fueron clausurados con tapas de plástico. A la tapa superior se le practicó un orificio donde fué instalado un tubo conector con forma de T y de material plástico de 1 pulgada de diámetro, de modo tal que uno de sus extremos apuntara hacia arriba y el restante extremo, con dirección horizontal acoplara con el tubo conector superior, obligándose así a que el líquido que pase de la cámara de retención hacia la cámara de degradación, lo haga a través del filtro cilíndrico.

En la parte inferior del filtro fué colocado un sistema de "aereación en collar", consistente en una manguera periférica de 10 mm de diámetro, a la cual se le hicieron perforaciones múltiples de aproximadamente 1 mm. La finalidad de dicho sistema es, de que al introducir aire a través de él, sea originada una cortina de burbujas, con el doble propósito de mantener constantemente en suspensión y bajo condiciones aeróbicas a la mezcla agua-estiércol y al mismo tiempo, crear un flujo de líquido sobre las paredes del filtro, evitándose de esta manera que éste se tape por las partículas que tienden a adherirse a él.

En caso de notarse un descenso significativo en el flujo causado por la obstrucción del filtro, éste era retirado momentaneamente para limpiarse. Si el filtro se colapsara y éste fuera inadvertido, el nivel del líquido dentro de la cámara de retención subiría hasta alcanzar el nivel de rebosamiento establecido por el orificio libre del conector T sobre el filtro. Si ésto llegara a suceder, fluiría hacia la cámara de degradación mezcla de agua y estiércol sin filtrar. Por ésto, se instaló dentro de la cámara de degradación una malla similar a la utilizada para la fabricación del filtro de la cámara de retención con el fin de separar las partículas mayores a 1 mm que debían ser retenidas en la otra cámara. El flujo del líquido dentro del sistema era determinado midiendo el tiempo necesario para que un volumen establecido pasara de una cámara a la otra. En la práctica ésto se hacía introduciendo un vaso de precipitados de 250 ml dentro de la cámara de degradación, captando el líquido vertido por el tubo conector superior y midiendo el tiempo necesario para que el vaso se llenara.

Los dos recipientes que forman el digestor, estaban tapados herméticamente habiendo solamente un orificio en la parte central de cada

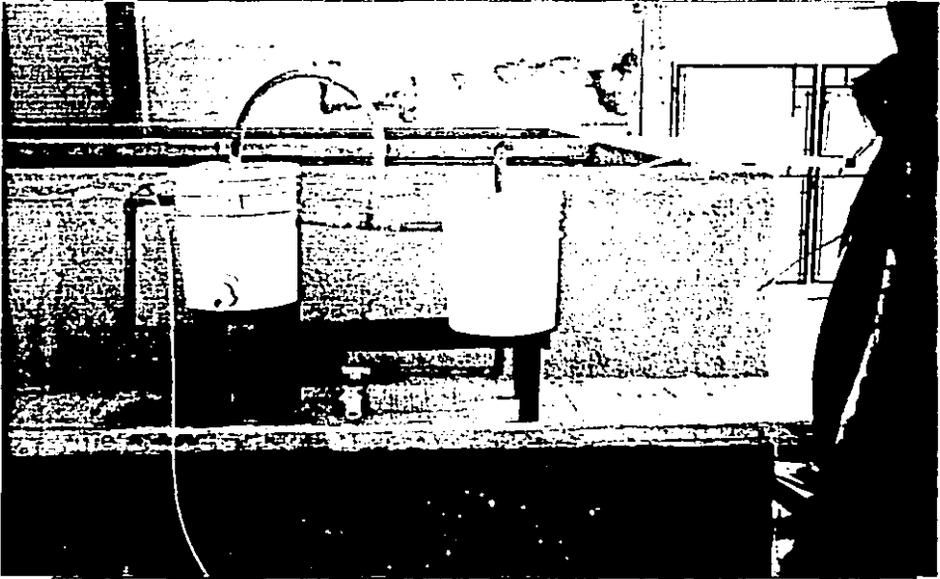
tapa. El orificio de la cámara de retención llevaba un conector de plástico al que se le acopló una manguera de 1 pulgada de diámetro que desembocaba en el tubo conector superior mediante una unión tipo T de plástico. La finalidad de éste fué, en primer término, liberar la presión inducida en la cámara de retención por el aire que se inyectaba al sistema y al gas que se generaba por la descomposición de la materia orgánica. La segunda función del tubo respirador fué eliminar la estabilidad de la espuma que se genera por la constante mezcla y agitación de los compuestos fundamentales del estiércol con el agua y el aire bombeado continuamente para que ésta se reintegre al sistema en forma líquida, ya que es rica en compuestos orgánicos. En caso de que éste no fuera suficiente, la espuma sería impulsada hacia el tubo conector superior donde normalmente había un flujo constante de líquido, favoreciéndose así su redisolución; aún si esto no fuera suficiente, la espuma sería vertida a la cámara de degradación, proporcionándose así, más tiempo y oportunidad para que la espuma perdiera su estabilidad.

La tapa de la cámara de degradación poseía en su parte central un orificio al que se conectó un tubo de PVC de 1 pulgada de diámetro y de 20 cm de longitud con un codo en su extremo. Este tubo constituía el respiradero general del digestor por donde se evacuaba todo el gas, tanto el inyectado como el generado en el sistema.

Como se aprecia en la fotografía 3.1, en la parte central del tubo conector inferior, se intercaló una conexión T y en el extremo libre de ésta, se instaló una llave de paso de PVC con la doble finalidad de poder tomar muestras del líquido o de evacuar la cámara de degradación; así mismo, en la parte lateral inferior de la cámara de retención se instaló una llave similar con el objeto de poder evacuar esta cámara cuando fuera requerido como al final de algún período de digestión. El digestor se montó sobre una estructura de madera.

La fuente de aereación para el sistema consistió en una turbina aereadora marca Rotron® modelo DR404, la cual proporcionó el aire suficiente para mantener funcionando el sistema sin interrupción. El digestor se mantuvo al exterior donde las variaciones diarias de temperatura fueron registradas con un termómetro Kahlsico® de máximas y

mínimas.



Fotografía 3.1. El digestor

Para la instauración de la comunidad microbiana, el digestor fué cargado con agua de mar "sucia" obtenida de un acuario del Laboratorio de Ciencias Marinas, cuyo filtro biológico (*sensu* Spotte, 1979), ya había sido instaurado previamente. Además, se le agregó estiércol de gallina a una proporción de $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ para acondicionar a la comunidad bacteriana a la materia que se desea degradar. Esta es una práctica común en la instauración de un filtro biológico, también llamada preactivación (Kaiser y Wheaton, 1983).

El estiércol utilizado para la realización de esta investigación, fué adquirido de una granja comercial en donde se engordan pollos de la variedad Hubbard a los cuales se les proporciona alimento del tipo "pellet", producido por La Hacienda, S.A. de C.V. Al término del período de engorde (8 semanas), el sustrato de viruta donde los animales depositan el

excremento, es removido y se acondiciona uno nuevo. Este material impregnado de estiércol, fué el que se utilizó en la realización de este trabajo, el cual previamente fué sometido a un tratamiento primario que consistió en eliminar materiales sólidos como: piedras, vidrios, alambres, plumas etc. El material restante, será referido de aquí en adelante como estiércol de gallina o simplemente como estiércol, para simplificar la exposición. En todos los procesos de digestión que se llevaron al cabo en este trabajo la salinidad del agua de mar con que se mezcló el estiércol fué de 35 ‰ y en total fueron 24 l.

3.2 SOBRE LOS BIOENSAYOS CON *Tetraselmis suecica*

3.2.1 CARACTERISTICAS GENERALES

El proceso de remineralización de la materia orgánica mediante la acción microbiana es el resultado de lo que puede ser llamado propiamente, digestión o fermentación. De esta forma, es de esperarse que conforme la materia orgánica es sometida a algún proceso de degradación, éste ha de ser más notable y proporcional al tiempo en que ha actuado. La eficiencia con que lo orgánico es mineralizado, depende de la interacción entre factores bióticos y abióticos y el comportamiento del proceso es específico a las condiciones y características circundantes. Es por esto último que para conocer el tiempo adecuado, para remover del digestor un extracto rico en nutrientes para las algas, es necesario determinarlo experimentalmente y de igual forma establecer la proporción en que debe ser utilizado en la formulación final del medio de cultivo, para que promueva adecuadamente el desarrollo algal.

Tal diseño experimental se consiguió realizando bioensayos con el alga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (1959), en los cuales se varió sistemáticamente la calidad del medio de cultivo y se mantuvieron constantes el resto de los parámetros. La hipótesis fundamental fué que aquel bioensayo en que se observara el mejor crecimiento algal, contendría el mejor medio de cultivo.

El medio de cultivo experimental se preparó mezclando el extracto digerido con agua de mar, ambos previamente esterilizados durante 15 minutos a una presión de 1.05 kg·cm⁻². Se tuvo especial cuidado con el

extracto de estiércol al cual se le bajó el pH a un valor intermedio entre 4 y 5 con ácido clorhídrico concentrado, para evitar la desnaturalización de las vitaminas por la alta temperatura (Granados-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984). Ambas soluciones se dejaron reposar por 12 horas bajo condiciones asépticas para que sus temperaturas se estabilizaran con las del medio ambiente y así poder ser utilizadas.

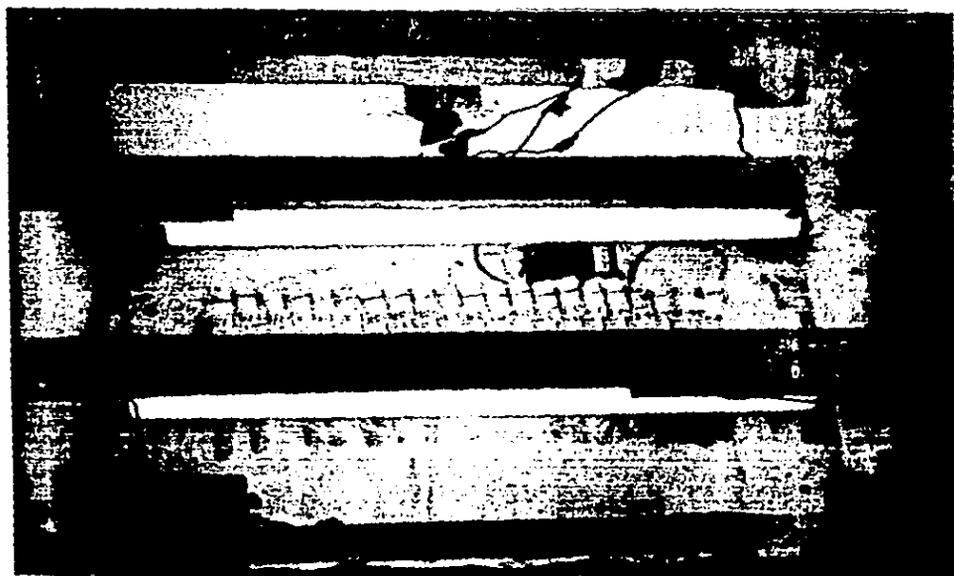
La mezcla se hizo de tal forma que se consiguieran las proporciones deseadas, teniendo en cuenta las salinidades de los componentes para que la mezcla resultante se estableciera a la salinidad a la que se querían realizar los ensayos. En el apéndice se presenta un ejemplo con el procedimiento seguido y las fórmulas utilizadas.

Posteriormente a la elaboración del medio de cultivo, se procedió al ajuste del pH a un valor de 7.5, agregando gota a gota una solución al 10 % de hidróxido de sodio; en caso de que el pH haya subido más de lo establecido, se agrega de igual forma una solución al 10 % de ácido clorhídrico, hasta alcanzar el punto deseado. Para las mediciones del pH se utilizó un potenciómetro digital Markson® modelo 92.

Los recipientes de cultivo utilizados en los bioensayos, fueron tubos de ensayo de 70 ml de capacidad, con dimensiones aproximadas de 20 cm de largo por 2.2 cm de diámetro, los cuales eran parcialmente llenados con 20 ml de medio de cultivo y 1 ml de inóculo del alga *Tetraselmis suecica*; ésta era obtenida de la ficoteca del Laboratorio de Ciencias Marinas, donde continuamente es cultivada. La concentración inicial de algas en los tubos de cultivo fue de 1.15×10^4 células ml^{-1} . Los tubos se taparon con hule espuma para permitir el intercambio de gases y evitar a la vez que se contaminaran.

Las incubaciones se realizaron en una cámara rectangular de poliuretano (68 cm por 98 cm y 61 cm de altura), acondicionada en su parte interior con un par de lámparas de 20 w cada una, con una fotoperiodicidad de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. En el interior de la cámara se encontraba un recipiente rectangular de material acrílico blanco de 61 cm por 41 cm y 10 cm de altura, el cual era llenado con agua de la llave (acidulada con ácido clorhídrico concentrado, para evitar que se desarrollaran algas en ella) y estaba acondicionado con un par de mangueras

sumergidas, por las cuales se hacía fluir constantemente una corriente de aire producida por una bomba de acuario Goldenbell-Black® 110 V 50/60 Hz 6 w, de tal forma que continuamente existiera movimiento del agua. Dentro de esta cámara acuosa eran introducidos los tubos de cultivo, sujetándose a un extremo de éste por medio de una grapa y una ligadura elástica. Ver fotografía 3.2. De este forma, los cultivos se mantenían constantemente en agitación, condición indispensable para que las algas permanecieran suspendidas dentro del medio de cultivo, evitándose así que éstas se precipitaran o adherieran a las paredes del recipiente. Durante los periodos de los bioensayos, se registraron las variaciones de temperatura con un termómetro de máximas y mínimas. No se hizo ningún intento por controlar este parámetro.



Fotografía 3.2. La incubadora. Vista interna.

Las variaciones en la densidad algal debidas al aumento o descenso de los individuos que conforman la población eran medidas diariamente durante el período de los bioensayos, tomando muestras de 0.5 ml asépticamente, previa agitación de los recipientes para que éstas fueran representativas, de cada uno de los cultivos. Posteriormente a cada muestra se le agregaba

una gota de formol para inmovilizar las algas y permitir su conteo, para lo cual se utilizó un hemacitómetro American Optical® de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto, con la lente objetivo 10X. Para la determinación de la tasa de crecimiento (divisiones por día), se utilizó la fórmula de Guillard (1973): $k = [3.322(t_2 - t_1)^{-1}](\log N_2 - \log N_1)$, donde N_2 y N_1 corresponden al número de células (densidad algal) en los días t_2 y t_1 . En este estudio t_1 fué siempre 0 y t_2 siempre 7, errojándose el valor promedio de k para los primeros 7 días.

El hemacitómetro consta de dos cámaras y cada una de ellas está subdividida característicamente en 9 cuadros de 1 mm² cada uno (retículo de Neubauer). Tomando en cuenta recomendaciones de Sorgeloos *et al.*, (1986), Fox (1983) y Guillard (1973), se determinó tomar en consideración los tres cuadros centrales de cada cámara para las estimaciones de las densidades, obteniendo primero el valor medio para cada cámara y finalmente el valor medio de ambas cámaras.

Los bioensayos siempre fueron realizados por triplicado para cada tratamiento y además, se intercalaba un grupo control el cual estaba enriquecido con el medio "F" de Guillard y Ryther (1962).

3.2.2 BIOENSAYOS PARA DETERMINAR EL PERIODO DE DIGESTION Y LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE ESTIERCOL DE GALLINA, OPTIMOS PARA PROMOVER EL DESARROLLO DE *Tetraselmis suecica*.

Se realizaron tres bioensayos con el alga *Tetraselmis suecica* en donde fueron probados tanto el efecto de diferentes periodos de digestión como de diferentes concentraciones de extracto. Para la obtención del extracto que posteriormente se utilizó en la realización de los dos primeros ensayos, el digestor fué cargado a su máxima capacidad (24 l), utilizando una proporción de 10 g de estiércol por litro de agua de mar; se hicieron cosechas de extracto, correspondientes a cada ensayo, una a los 8 días y la otra a los 24 días. Las concentraciones que se utilizaron, se resumen en la tabla 3.1.

El tercer bioensayo se realizó de tal forma que de una sola vez se pudiera probar un espectro de diferentes períodos de digestión, para lo cual el digestor fué nuevamente cargado con estiércol, esta vez a una proporción de 20 g·l⁻¹. Periódicamente se extrajo del digestor un determinado volumen de extracto como se aprecia en la tabla 3.1. La concentración de extracto en la formulación de los medios de cultivo, fué constante (1/10) para estos períodos.

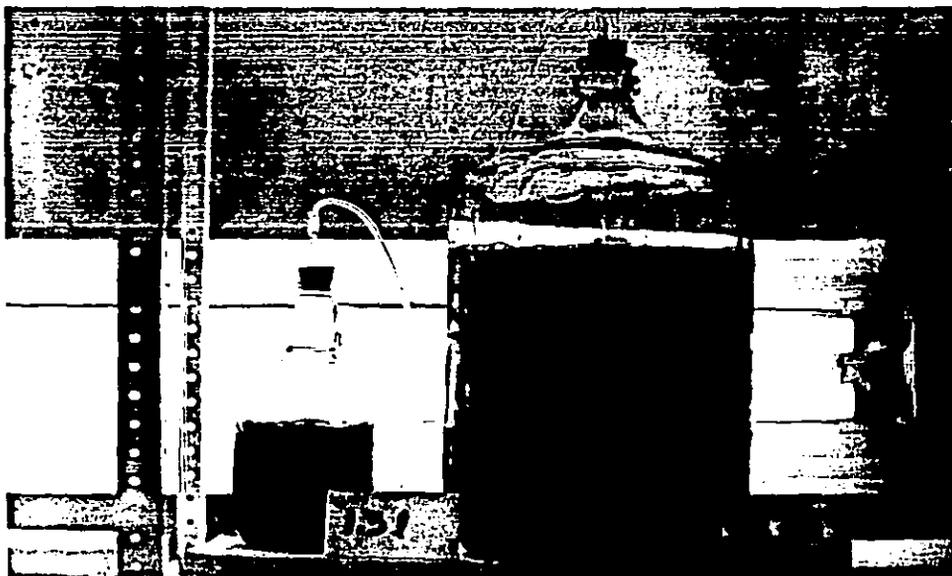
Tabla 3.1 Características de las variables que se manipularon en los bioensayos con el alga *Tetraselmis suecica*.

| Bioensayo | Período de digestión días | Carga de estiércol g·l ⁻¹ | Concentraciones extracto/agua de mar |
|-----------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1º | 8 | 10 | 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 |
| 2º | 24 | 10 | 1/5, 1/10, 1/20, 1/48, 1/80 |
| 3º | 4, 8, 12, 16, 20 | 20 | 1/10 |

3.2.3 CULTIVOS MASIVOS DE *Tetraselmis suecica*

Después de haberse determinado la concentración y el período de digestión óptimos de extracto de estiércol de gallina para promover el desarrollo algal, se procedió a verificar su efectividad en volúmenes mayores, considerados masivos (Hemerick, 1973). Para la realización de este objetivo, fué necesario producir *ex professo*, un volumen considerable de extracto con la finalidad de tener suficiente material para esta prueba y ulteriores. El digestor fué cargado a su máxima capacidad a una proporción de 20 g de estiércol por litro de agua de mar y se dejó funcionar por 4 días. Al final de este período, se cosechó todo el líquido y se dejó decantar por 15 minutos; el sobrenadante se autoclavó con los mismos cuidados mencionados anteriormente y despues fué transferido asépticamente a recipientes estériles, los cuales fueron tapados y almacenados en refrigeración (7°C aproximadamente) y así fueron mantenidos hasta el momento de su utilización. Los volúmenes en consideración para los cultivos masivos fueron 1.3 l y 18 l, para lo cual se utilizaron recipientes de cristal

similares a los de la fotografía 3.3. Las características de los cultivos se presentan en la tabla 3.2.



Fotografía 3.3. Cultivos masivos de *Tetraselmis suecica*

Tabla 3.2 Concentraciones de extracto y volúmenes utilizados en los cultivos masivos de *Tetraselmis suecica*.

| Cultivo masivo | Volumen (litros) | Proporción extracto/agua de mar |
|----------------|------------------|---------------------------------|
| 1º | 1.3 | 1/10 |
| 2º | 18.0 | 1/10 |
| 3º | 18.0 | 1/50 |

Para la realización de estos cultivos, se utilizaron las instalaciones del Laboratorio de Ciencias Marinas, el cual está acondicionado con una sección especial para el cultivo masivo de algas. Las condiciones fueron las siguientes: 25 ± 3 °C de temperatura, iluminación equivalente a la

proporcionada por dos lámparas fluorescentes tipo luz de día de 39 w cada una a una distancia de 10 cm, 12 horas luz y 12 horas oscuridad de fotoperiodicidad, aereación constante. La fuente de aire fué la misma reportada para el funcionamiento del digestor. Ningún intento por controlar el pH fué realizado.

3.3 SOBRE EL BIOENSAYO CON *Artemia franciscana*

3.3.1 GENERALIDADES

El cultivo experimental de *Artemia* consistió en realizar un bioensayo en el que la variable independiente fué la calidad del alimento, con la finalidad de evaluar su efecto tanto en la sobrevivencia como en el crecimiento de los animales. Los nauplios necesarios para la realización de este ensayo se obtuvieron incubando huevos de *Artemia* en estado latente, para lo cual se utilizó el sistema propuesto por Sorgeloos *et al.*, (1978); se colocaron 625 µg (peso seco) de huevos en un tubo de ensayo de aproximadamente 8 ml de capacidad con 7 ml de agua de mar a 30 ‰; el tubo fué tapado con una laminilla de polietileno (3 cm por 3 cm) valiéndose de una ligadura elástica para mantenerlos perfectamente acoplados. El tubo se montó en un eje que gira a 5 rpm, empleándose una ligadura elástica para sostenerlo. Los huevos utilizados fueron de la especie *Artemia franciscana* Kellog, 1906 (Kellog, 1906) variedad Gran Lago Salado, E.U.A., comercializados secos, deshidratados y al vacío, por la compañía Aquafauna Biomarine® lote No., 656383. Previo a la incubación, los huevecillos fueron sometidos a un tratamiento de rehidratación en agua destilada a 3 °C por un período de 8 horas para sincronizarlos a que eclosionaran a un mismo tiempo (Conte *et al.*, 1977).

3.3.2 CULTIVO DEL ALGA *Tetraselmis suecica* UTILIZADA COMO ALIMENTO

Las algas que se proporcionaron como alimento, fueron cultivadas en un sistema semicontinuo para asegurar que éstas se encontraran en la fase de desarrollo activo; los recipientes (1.3 l) y condiciones de cultivo, fueron similares a las mencionadas en la sección 3.2.3, sobre la producción masiva de algas. Durante el periodo del bioensayo, diariamente se cosechaba un volumen determinado de algas, para alimentar a los animales; antes de que

los cultivos alcanzaran una fase postexponencial, se les proporcionaba más medio de cultivo para reestablecer el volumen inicial; de esta forma se producía un descenso en la densidad de algas y un incremento en el nivel de los nutrientes, el cual nuevamente promovía el desarrollo algal. Estos sistemas se pueden mantener por periodos muy largos y tienen la ventaja sobre los sistemas estáticos, de que producen continuamente algas de la misma calidad. Para más información sobre la cinética de los cultivos, se recomienda leer a Ukeles (1973) y Droop (1975).

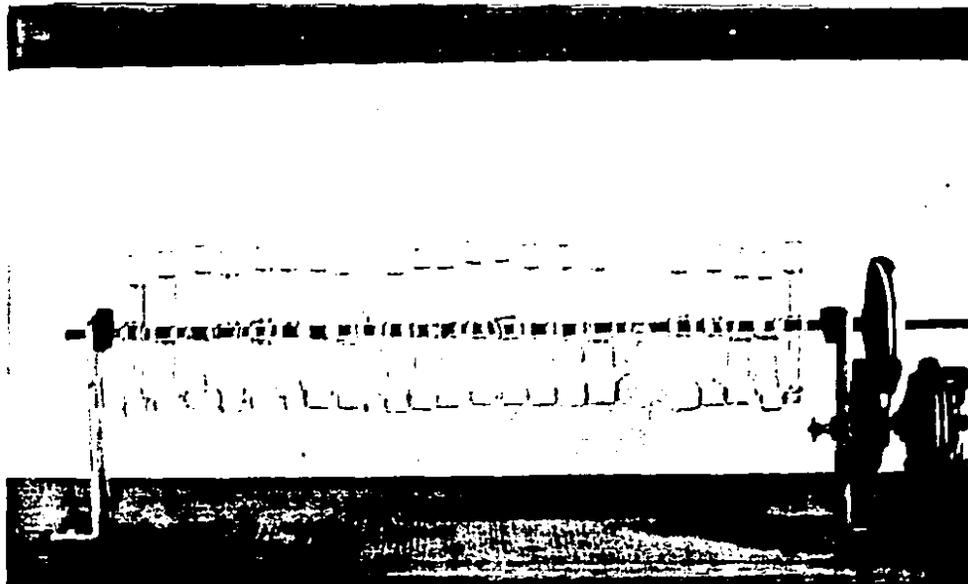
3.3.3 CULTIVO EXPERIMENTAL DE *Artemia franciscana*

Las características del bioensayo fueron las siguientes: como recipientes de cultivo se utilizaron tubos de ensayo de aproximadamente 8 ml de capacidad (1 cm de diámetro por 10 cm de altura) a los cuales se les agregaron 7 ml de agua de mar a 30 ‰ de salinidad, como medio de cultivo, esta agua fué previamente filtrada (1 µm) y esterilizada con un sistema de luz ultravioleta de Industrias Groth®; se formaron tres grupos con varias réplicas cada uno; a cada tubo réplica se le introdujeron cinco nauplios de *Artemia*.

El primer grupo (cinco réplicas) constituyó un control al cual no se le proporcionó alimento alguno. El segundo grupo (ocho réplicas) fué también un control, al cual se estuvo alimentando con *Tetraselmis suecica* producida con el medio "F" de Guillard y Ryther y finalmente el grupo experimental (ocho réplicas), al cual se alimentó con *Tetraselmis suecica* producida con el medio formado a partir de extracto de estiércol de gallina.

Los recipientes de cultivo de los tres grupos fueron tapados en forma similar a la descrita para el tubo donde se incubaron los huevos, excepto que en vez de utilizar polietileno, se utilizó malla micrométrica nylon de 80 µm de luz; así mismo fueron montados en el eje de rotación continua (5 rpm) para mantenerlos bajo condiciones homogéneas. Ver fotografía 3.4. Las fuerzas de adherencia entre el agua y la malla mayores que la fuerza hidrostática generada por la columna de agua en los tubos, evitaba que éstos fueran evacuados al momento de ser invertidos debido a la rotación a la que se sometían. De esta forma la malla actúa como una membrana semipermeable que permite el intercambio de gases entre el medio ambiente

y el interior de los recipientes de cultivo. Las pérdidas de agua por evaporación, diariamente se compensaban añadiendo agua destilada hasta alcanzar el nivel inicial.



Fotografía 3.4. Bioensayo con *Artemia franciscana*

Las actividades de rutina durante cada día del bioensayo, fueron como sigue:

- determinación de la sobrevivencia de los animales
- reestablecimiento del volumen perdido por evaporación añadiendo agua destilada
- agitación del recipiente de cultivo para homogeneizar la mezcla
- sacar un volumen de agua equivalente al volumen de cultivo de algas que se va a agregar como alimento
- proporcionar el alimento a cada recipiente y
- tapar los tubos y montarlos de nuevo en el eje rotatorio.

La cantidad de alimento que se agregó cada día, provenía de lo que diariamente se cosechaba de los cultivos de algas y se utilizó lo necesario

para proporcionar una densidad equivalente a 5×10^4 cels.ml⁻¹. Lo anterior se determinaba mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vol.}_i = \frac{(5 \times 10^4 \text{ cels.ml}^{-1})(7 \text{ ml})}{\text{Densidad del inóculo}}$$

Donde Vol._i es el volumen (ml) de cultivo de algas que se ha de agregar a cada tubo para proporcionar la densidad deseada. Las densidades de los cultivos de las algas (densidad del inóculo), fueron determinadas con un hemacitómetro de la misma forma como se explicó en la sección 3.2. Este régimen de alimentación fué establecido en base a la mínima concentración del alga *Chaetoceras*, necesaria para *Artemia* bajo condiciones de cultivo continuo (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Para proporcionar el alimento se utilizó una micropipeta automática SMI® serie "F" de 200 µl - 500 µl, de capacidad ajustable.

Ningún intento por retirar las heces fecales, mudas ni animales muertos (en caso de haber), fué realizado (Vanhaecke y Sorgeloos, 1980). El sistema de cultivo se mantuvo bajo condiciones de salón, donde se monitorearon las variaciones de temperatura; la iluminación fué indirecta con luz diurna. Al final del bioensayo además de determinar la sobrevivencia, se determinó el grado de crecimiento de los animales, midiendo la longitud desde la parte frontal de la cabeza hasta la base de la furca caudal (Amat-Domenech, 1980), para lo cual se utilizó un microproyector Bausch & Lomb® previamente calibrado con un micrómetro ocular Zeiss®. Para lo anterior los animales eran montados *in vivo*, previamente narcotizados con cloroformo según técnica de Lochhead y Lochhead (*en* Gilchrist, 1960), en un portaobjetos excavado donde se mantenían perfectamente extendidos con la ayuda de un cubreobjetos. La imagen ampliada se proyectaba en una pantalla, en la cual se trazaba una línea, siguiendo el contorno del eje central del animal; posteriormente la distancia era determinada valiéndose de un escalímetro tipo "carretilla", como los utilizados en cartografía.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 SOBRE EL COMPORTAMIENTO DEL DIGESTOR

El comportamiento del digestor durante los dos primeros ciclos en que fué utilizado, se presenta en la tabla 4.1. Como puede observarse, hubo una tendencia tanto a que el flujo medio disminuyera como a que la salinidad se incrementara, conforme el tiempo transcurría.

Tabla 4.1 Resumen del comportamiento del digestor

| Ciclo de digestión # | Carga de estiércol g.l ⁻¹ | Período de digestión días | Volumen total l | Salinidad inicial ‰ | Salinidad final ‰ | Flujo medio ml.min ⁻¹ | Temperatura media °C |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------|
| 1 | 10 | 8 | 24.0 | 31.0 | 33.0 | 750 | 24.0±4 |
| | | 24 | 23.5 | 33.0 | 40.5 | 750 | 25.5±4 |
| 2 | 20 | 4 | 24.0 | 30.0 | 31.5 | 1106 | 27.5±2 |
| | | 8 | 23.5 | 31.0 | 32.0 | 803 | 27.0±4 |
| | | 12 | 23.0 | 32.0 | 33.0 | 549 | 26.5±3 |
| | | 16 | 22.5 | 33.0 | 33.0 | 452 | 25.5±3 |
| | | 20 | 22.0 | 33.0 | 35.0 | 412 | 27.0±5 |

4.2 BIOENSAYOS CON EL ALGA *Tetraselmis suecica*

4.2.1 PRIMER BIOENSAYO

El primer bioensayo que se realizó arrojó la información que se presenta en la tabla 4.2, la cual muestra el efecto de la concentración del extracto de estiércol sobre el crecimiento de la población. Conforme el medio de cultivo es más enriquecido tiene mayor capacidad para promover el desarrollo algal. La temperatura a la que el bioensayo se realizó fué 25±3 °C. Para la realización de un análisis estadístico comparativo que determinara diferencias significativas entre la biomasa producida por los diferentes grupos, se tomó en consideración la información presentada en la tabla 4.2,

donde se muestran los valores de densidad máxima (D. máx.), alcanzados por cada réplica. A cada grupo específico se le asignó una letra como subíndice.

Tabla 4.2 Densidades máximas ($\times 10^4$ cels.ml⁻¹), alcanzadas por las réplicas de los diferentes grupos del primer bioensayo. Valor medio: \bar{x} . Letra subíndice: i.

| Grupo | "F" | "1/10" | "1/20" | "1/40" | "1/80" |
|-----------|-------|--------|--------|--------|--------|
| D.máx. | 116.0 | 71.0 | 51.0 | 26.0 | 24.0 |
| | 103.0 | 78.5 | 50.5 | 27.5 | 22.5 |
| | 115.0 | 80.0 | 49.0 | 35.0 | 28.5 |
| \bar{x} | 111.3 | 76.5 | 50.17 | 29.5 | 25.0 |
| i | A | B | C | D | E |

Para la evaluación de estos datos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación única, modelo I. La hipótesis nula que se docimó fué que no había diferencias significativas entre los tratamientos. En la tabla 4.3 se presenta el resumen del análisis.

El valor obtenido para el estadístico de Fisher (F_s), fué significativo más allá del nivel 0.01, por lo cual la hipótesis nula fué rechazada. Sobre la base de esta decisión, se pudo establecer que se contaba con evidencia estadística, además de la experimental, para afirmar que existen diferencias causadas por los tratamientos.

Tabla 4.3 Resumen del ANOVA del 1º bioensayo

| Origen de la variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de los cuadrados | Fs** |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|--------|
| Tratamientos | 4 | 15,444.17 | 3,861.04 | 176.04 |
| Residuo | <u>10</u> | <u>219.33</u> | 21.93 | |
| Total | 14 | 15,663.50 | | |

** diferencia significativa, $p < 0.01$

Para comparar todos los grupos entre sí, e identificar cuál o cuáles de ellos causaron que el estadístico Fs fuera significativo, se aplicó la dócima de Student-Neuman-kuels o SNK, la cual suministra una escala de diferencias mínimas que deben ser igualadas o excedidas para establecer la significación. La tabla 4.4 presenta los resultados de este análisis.

Tabla 4.4 Resultado de la dócima SNK para los grupos del primer ensayo.

| | | | | |
|---|----|----|----|------|
| | B | C | D | E |
| A | ** | ** | ** | ** |
| B | | ** | ** | ** |
| C | | | ** | ** |
| D | | | | N.S. |

** diferencia significativa, $p < 0.01$

N.S. no diferencia significativa, $p > 0.05$

Los resultados anteriores traducidos a términos relevantes al experimento, muestran que los valores de D.max, alcanzados por cada grupo, fueron diferentes entre sí, excepto los grupos D y E.

4.2.2 SEGUNDO BIOENSAYO

En el segundo ensayo que se realizó, en el que se probó el extracto de estiércol con un período de digestión de 24 días, ninguno de los grupos en

consideración promovió el desarrollo algal excepto el grupo control con medio F. La temperatura a la que el bioensayo se realizó fué $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.3 TERCER BIOENSAYO

Los resultados del tercer bioensayo se presentan en la tabla 4.5, donde se resumen además las tasas de crecimiento, computadas como el valor promedio de k para los primeros siete días. Apréciese que se han omitido los grupos con 16 y 20 días de digestión. La razón de ésto, es que no promovieron el desarrollo algal. A los grupos restantes se les asignó una letra subíndice. La temperatura a la que el bioensayo se realizó fué $27 \pm 3^\circ\text{C}$.

Tabla 4.5 Densidades máximas ($\times 10^4$ cels.ml⁻¹), alcanzadas por las réplicas de los diferentes grupos del tercer bioensayo. Entre paréntesis está el día en que fueron alcanzadas. Valor medio: \bar{x} . Respectives tasas de crecimiento, computadas como promedio de los siete primeros días: k . Subíndices de los grupos: i .

| Grupo | "12" | "F/2" | "4" | "8" | "F" |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| D.máx. | 99.67(16) | 87.00(9) | 120.83(15) | 131.50(15) | 185.50(12) |
| | 102.83(14) | 103.00(10) | 137.83(16) | 129.00(14) | 160.33(14) |
| | 99.50(14) | 105.67(11) | 135.83(14) | 142.50(15) | 180.83(16) |
| \bar{x} | 97.67 | 98.56 | 131.50 | 134.33 | 175.55 |
| k | 0.81 | 0.78 | 0.79 | 0.80 | 0.78 |
| | 0.80 | 0.76 | 0.77 | 0.77 | 0.78 |
| | 0.82 | 0.73 | 0.74 | 0.79 | 0.80 |
| i | G | H | I | J | K |

Para la determinación de diferencias significativas entre las densidades máximas de los tratamientos, se aplicó un análisis de varianza y la hipótesis nula que se docimó fué que no había diferencias significativas

entre los tratamientos, como en el primer bioensayo.

La tabla 4.6 que a continuación se presenta, resume el análisis de varianza realizado con los datos del tercer bioensayo.

Tabla 4.6 Resumen del ANOVA del 3º bioensayo

| Origen de la variación | Grados de libertad | Suma de los cuadrados | Media de los cuadrados | Fs** |
|------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|-------|
| Tratamientos | 4 | 12,298.60 | 3,074.65 | 33.41 |
| Residuo | <u>10</u> | <u>920.30</u> | 92.03 | |
| Total | 14 | 13,218.89 | | |

** diferencia significativa $p < 0.01$

El valor obtenido para el estadístico de Fisher fué significativo más allá del nivel 0.01 y para identificar los grupos que causaron la significancia, se aplicó la dócima SNK, cuyo cuadro se presenta en la tabla 4.7.

Tabla 4.7 Resultados de la dócima SNK para los datos del 3º bioensayo.

| | | | | |
|---|------|----|------|----|
| | H | I | J | K |
| G | N.S. | ** | ** | ** |
| H | | ** | ** | ** |
| I | | | N.S. | ** |
| J | | | | ** |

** diferencia significativa, $p < 0.01$

N.S. no diferencia significativa, $p > 0.05$

Para la realización de un análisis comparativo entre los valores de k, de los diferentes grupos de la tabla 4.5, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (dos colas), la cual es especialmente útil cuando los grupos por analizar no se ajustan a una distribución normal y además contienen pocas réplicas (Sokal y Rohlf, 1987; Subba Rao, 1981). La hipótesis nula que se

docima es que las muestras que se comparan provienen de poblaciones que tienen la misma distribución. En la tabla 4.8 se resumen los resultados del análisis.

Tabla 4.8 Resultados de la prueba U de Mann-Whitney, para comparar las tasas de crecimiento entre los grupos del tercer bioensayo. Subíndices de los grupos comparados: i,j.

| | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|---|
| | I | G | G | G | G | H | H | H | I | I | J |
| | j | H | I | J | K | I | J | K | J | K | K |
| U_{max} | 7.0 | 9.0* | 6.0 | 7.0 | 8.5 | 8.0 | 4.5 | 9.0* | 8.5 | 8.0 | |

* diferencia significativa $p \leq 0.10$

4.2.4 CULTIVOS MASIVOS DE *Tetraselmis suecica*

Con respecto a los cultivos masivos que se realizaron para verificar la efectividad del medio de cultivo experimental con 4 días de digestión en volúmenes mayores, los resultados se presentan en la siguiente tabla.

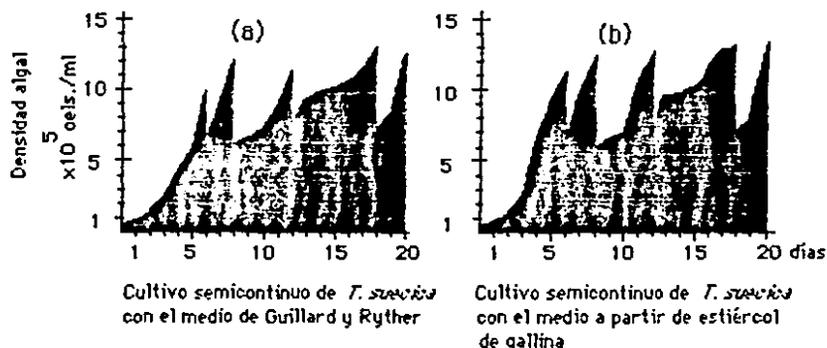
Tabla 4.9 Densidades máximas ($\times 10^4$ cels. ml^{-1}) alcanzadas por *Tetraselmis suecica* en los cultivos masivos, utilizando el extracto de estiércol a diferentes proporciones, en la formulación del medio de cultivo.

| Cultivo masivo | Volumen (litros) | Proporción extracto/agua | Densidad máxima | Temperatura media °C |
|----------------|------------------|--------------------------|-----------------|----------------------|
| 1ª | 1.3 | 1/10 | 140.50 | 21±3 |
| 2ª | 18.0 | 1/10 | 29.33 | 23±3 |
| 3ª | 18.0 | 1/50 | 44.50 | 21±3 |

4.3 SOBRE EL BIOENSAYO CON *Artemia franciscana*

4.3.1 COMPORTAMIENTO DE LOS CULTIVOS DE *Tetraselmis suecica* UTILIZADOS COMO ALIMENTO PARA *Artemia franciscana*

El comportamiento de los cultivos semicontinuos de *Tetraselmis suecica* con los diferentes medios, los cuales fueron utilizados como alimento en la realización de este ensayo, se presenta en las siguientes graficas.



Gráfica 4.1 (a,b). Comportamiento de los cultivos semicontinuos de *Tetraselmis suecica* con los diferentes medios.

Los descensos en la densidad algal corresponden a los días en que se agregó medio de cultivo nuevo.

Los resultados del experimento en el que se probó si las algas producidas con el medio de cultivo a base de estiércol de gallina, ocasionaba algún efecto en la sobrevivencia y crecimiento de *Artemia franciscana*, con respecto al grupo control, donde se utilizaron las algas producidas en el medio "F" de Guillard y Ryther, se resumen a continuación.

4.3.2 SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE *Artemia franciscana*

En la tabla 4.10 (a,b,c) se presentan los porcentajes de sobrevivencia, día a día para cada réplica de cada grupo transformados a: $\arcseno \sqrt{(\% \text{ sobrevivencia})}$, de tal forma que pudieran ser comparados mediante un análisis de varianza (Sokal y Rohlf, 1987; Vanhaecke y Sorgeloos, 1980). A cada grupo se le asignó una clave como sigue: "F" para el grupo control, en el

cual se utilizaron las algas producidas con el medio de cultivo de Guillard y Ryther; "EX" para el grupo experimental en el cual se utilizaron las algas producidas con el medio de cultivo a base de estiércol de gallina y "S" para el grupo sin alimentación. Este último grupo fué para controlar la capacidad nutritiva del alga utilizada sobre el herbívoro en cuestión. Ver tabla 4.10

Tabla 4.10a Arcoseno $\sqrt{(\% \text{ sobrevivencia})}$, del grupo "F"

| Réplica | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| día | | | | | | | | |
| 0 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 |
| 1 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 63.43 | 90.00 |
| 2 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 63.43 | 90.00 |
| 3 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 63.43 | 63.43 |
| 4 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 63.43 | 63.43 |
| 5 | 63.43 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 63.43 | 63.43 |
| 6 | 63.43 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 63.43 | 63.43 |
| 7 | 63.43 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 63.43 | 63.43 |
| 8 | 63.43 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 39.23 | 63.43 | 63.43 | 63.43 |
| 9 | 63.43 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 39.23 | 63.43 | 63.43 | 50.77 |
| 10 | 63.43 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 39.23 | 63.43 | 63.43 | 39.23 |

Tabla 4.10b Arcoseno $\sqrt{(\% \text{ sobrevivencia})}$, del grupo "EX"

| Réplica | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| día | | | | | | | | |
| 0 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 |
| 1 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 |
| 2 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 63.43 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 90.00 |
| 3 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 90.00 |
| 4 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 90.00 | 63.43 | 90.00 |
| 5 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 90.00 | 63.43 | 90.00 |
| 6 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 50.77 | 63.43 | 90.00 | 63.43 | 90.00 |
| 7 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 39.23 | 63.43 | 90.00 | 63.43 | 90.00 |
| 8 | 63.43 | 90.00 | 90.00 | 39.23 | 63.43 | 90.00 | 63.43 | 90.00 |
| 9 | 63.43 | 39.23 | 63.43 | 26.57 | 63.43 | 90.00 | 63.43 | 63.43 |
| 10 | 63.43 | 26.57 | 63.43 | 00.00 | 50.77 | 90.00 | 63.43 | 63.43 |

Tabla 4.10c Arcoseno $\sqrt{(\% \text{ sobrevivencia})}$, del grupo "S"

| Réplica | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Día | | | | | |
| 0 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 | 90.00 |
| 1 | 90.00 | 90.00 | 63.43 | 90.00 | 90.00 |
| 2 | 90.00 | 90.00 | 63.43 | 90.00 | 63.43 |
| 3 | 39.23 | 50.77 | 63.43 | 00.00 | 39.23 |
| 4 | 26.57 | 00.00 | 50.77 | 00.00 | 26.57 |
| 5 | 00.00 | 00.00 | 39.23 | 00.00 | 26.57 |
| 6 | 00.00 | 00.00 | 39.23 | 00.00 | 00.00 |
| 7 | 00.00 | 00.00 | 39.23 | 00.00 | 00.00 |
| 8 | 00.00 | 00.00 | 39.23 | 00.00 | 00.00 |
| 9 | 00.00 | 00.00 | 26.57 | 00.00 | 00.00 |
| 10 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |

Como se puede apreciar en la serie de la tabla 4.10, el ensayo se prolongó por 10 días; este período se consideró suficiente para poder realizar análisis comparativos entre los grupos y establecer la presencia o no de alguna significancia estadística. La temperatura a la que el bioensayo se realizó fué $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Con los datos transformados de sobrevivencia de cada día, se realizaron análisis de varianza de tal forma que se pudiera establecer si en algún día la mortalidad (complemento porcentual de la sobrevivencia) en algún grupo fué significativa con respecto a los otros. En la tabla 4.11 se resumen los resultados de estos análisis, en donde se presentan los valores generados para el estadístico de Fisher por los diferentes grupos comparados. Aquellos valores de Fs que resultaron ser mayores que el valor crítico establecido por el nivel de significancia de 0.01, fueron marcados con un asterisco.

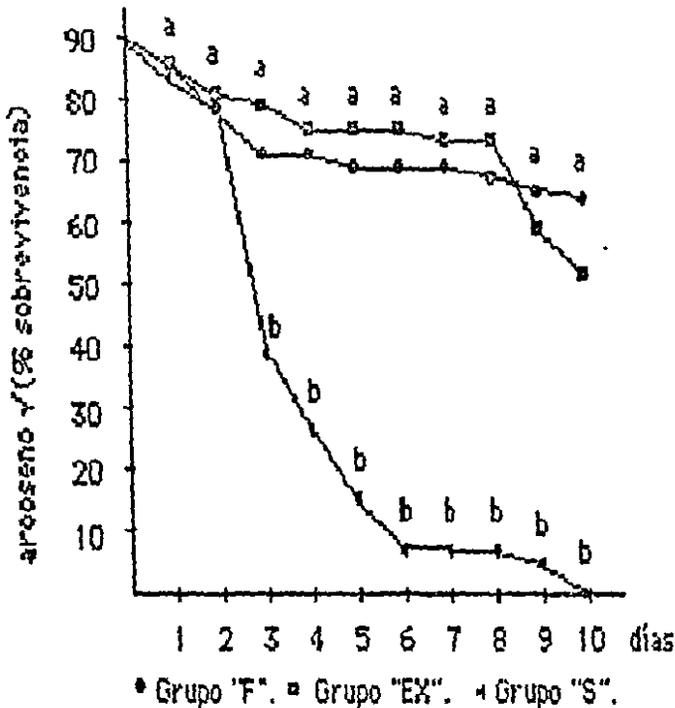
Tabla 4.11 Valores de Fs obtenidos de los ANOVAs realizados. Subíndices asignados a los grupos que se compararon: o, "F"- "EX"- "S"; p, "F"- "S"; q, "EX"- "S"; r, "EX"- "F".

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| o | 0.08 | 0.02 | 8.11* | 17.59* | 25.79* | 31.62 | 26.73* | 23.83* | 21.72* | 15.36* |
| p | 0.11 | 0.01 | 10.63* | 24.85* | 37.73* | 47.90* | 47.90* | 37.97* | 45.53* | 53.76* |
| q | 0.11 | 0.01 | 14.35* | 26.89* | 39.78* | 49.12* | 38.63* | 38.63* | 13.61* | 17.64* |
| r | 0.00 | 0.04 | 0.69 | 0.17 | 0.76 | 0.76 | 0.38 | 0.55 | 0.49 | 0.92 |
| Día | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

* diferencia significativa $p < 0.01$

En la tabla 4.11 se puede apreciar que estadísticamente hablando no hubo diferencias significativas entre las sobrevivencias de los grupos "F" y "EX" en ninguno de los días en cuestión, sin embargo al partir del tercer día de cultivo en delante, se observa la existencia de significancia estadística en el resto de los grupos comparados. Es claro que ésta es causada por el

grupo "S" al cual no se le proporcionó alimento. En la gráfica 4.2 se resumen las sobrevivencias de los tres grupos.



Gráfica 4.2 Sobrevivencias de *Artemia franciscana* en los diferentes grupos. Los puntos significativamente diferentes en cada día, están marcados con letras: a *versus* b.

En la tabla 4.12 se presentan las longitudes alcanzadas por cada individuo de cada réplica en los grupos "F" y "EX", al día décimo del bioensayo.

Tabla 4.12 Longitudes en mm de los animales al décimo día de cultivo

| Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Réplica | | | | | |
| "F"-1 | 4.960 | 2.880 | 5.280 | 3.120 | - |
| "F"-2 | 3.280 | 4.000 | 4.134 | 5.040 | - |
| "F"-3 | 3.440 | 3.706 | 3.680 | 3.840 | 4.080 |
| "F"-4 | 3.466 | 3.814 | 3.974 | 4.320 | 3.200 |
| "F"-5 | 4.934 | 5.280 | - | - | - |
| "F"-6 | 1.920 | 3.600 | 6.080 | 3.920 | - |
| "F"-7 | 4.720 | 4.854 | 4.506 | 3.320 | - |
| "F"-8 | 4.774 | 3.200 | - | - | - |
| "EX"-1 | 3.974 | 4.640 | 3.920 | 5.040 | - |
| "EX"-2 | 3.414 | - | - | - | - |
| "EX"-3 | 4.480 | 3.360 | 4.720 | 3.360 | - |
| "EX"-4 | - | - | - | - | - |
| "EX"-5 | 5.254 | 3.200 | 3.200 | - | - |
| "EX"-6 | 4.134 | 4.640 | 4.960 | 3.200 | 2.774 |
| "EX"-7 | 5.654 | 4.000 | 1.600 | 3.120 | - |
| "EX"-8 | 3.494 | 2.560 | 5.920 | 2.800 | - |

Se realizó un análisis de varianza entre ambos grupos arriba presentados, para probar la hipótesis nula de que no hay diferencias significativas entre sus longitudes alcanzadas. En la tabla 4.13 se presenta el cuadro resumen de este análisis donde se puede apreciar que no hay significación entre ambos grupos, pudiéndose establecer de esta forma que la dieta experimental, al igual que en el caso de la sobrevivencia, tiene efecto similar a la dieta control, sobre el crecimiento de los animales.

Tabla 4.13 Resumen del ANOVA, entre las longitudes alcanzadas al décimo día por los individuos de los grupos "EX" y "F".

| Origen de la varianza | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de los cuadrados | Fs n.s. |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------|---------|
| Tratamientos | 1 | 0.177 | 0.177 | 0.185 |
| Residuo | <u>53</u> | <u>50.910</u> | 0.971 | |
| Total | 54 | 51.087 | | |

n.s. No diferencia significativa, $p > 0.05$.

CAPITULO 5

DISCUSION

En repetidas ocasiones se ha demostrado la posibilidad de producir microalgas, utilizando desechos animales como aportadores de nutrientes (revisado por De Paw *et al.*, 1980). Se propone que las algas así producidas pueden ser utilizadas con varias finalidades como: alimento, producción de químicos, bioconversión de energía solar, acuaculture y tratamiento de aguas de deshecho (Goldman, 1979).

Con respecto a la utilización de la biomasa algal, producida al partir de desechos como alimento para herbívoros, es indispensable hacer pruebas preliminares para determinar su contenido nutricional, su grado de aceptación y sobre todo conocer si ha acumulado algún compuesto que posteriormente pudiera ser deletéreo para el organismo en que se utilizará (Paniagua *et al.*, 1987).

Los resultados del presente trabajo (sección 4.3.2), demuestran que tanto el crecimiento como la sobrevivencia de *Artemia franciscana*, no difirieron significativamente utilizando estiércol de gallina como precursor del medio de cultivo para el alga *Tetraselmis suecica* o el medio de cultivo de Guillard y Ryther para la misma alga, como alimento. Es posible que estos resultados se obtuvieron debido a que la variación inducida por las diferencias entre los alimentos, sea menor a la variación intrínseca del organismo prueba. Dicho de otra forma, las diferencias bioquímicas entre los alimentos que se utilizaron no fueron lo suficientemente significativas para causar una variación (efecto) mayor a la de la población propia. Al hablarse de composición bioquímica, no solo se refiere a los compuestos comunmente conocidos como nutricionales como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, etc., sino también se consideran aquellas sustancias que se pueden encontrar naturalmente o no, interfiriendo con la actividad biológica como antibióticos, inhibidores o tóxicos.

Considerando lo anterior se puede establecer de una forma preliminar que la producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* con fines nutricionales para *Artemia franciscana*, al partir de estiércol de gallina, es un procedimiento prometedor. Sin embargo, se requieren más estudios que

permitan tomar decisiones más definitivas.

Haciendo referencia a las tablas 4.10 (a,b) y 4.12 en donde se puede apreciar una gran variación en la sobrevivencia y crecimiento de las artemias, entre las réplicas de mismos grupos, esta puede ser explicada de acuerdo a Brune y Anderson (1986), como consecuencia de haber dosificado el alimento a un nivel inferior al crítico. Con sus mismos términos: "... variations in population attributes may be explained as an animal-food concentration interaction in which minor initial variations in animal maturity (weight, size, etc.) are magnified as a consequence of continuous competition for a single pool of food." Es claro que el objetivo de este trabajo no fué determinar tal nivel crítico de *Tetraselmis suecica* para ser ofrecida como alimento para *Artemia franciscana*, pero era importante establecer y dosificar un nivel adecuado, para permitir que las variaciones en la composición algal causadas por la manipulación del medio de cultivo, se pudieran manifestar en el organismo prueba. Asumiendo un diseño experimental en el que se quisieran probar diferentes dietas, no solo habría que considerar la composición sino también la cantidad al momento de dosificar, pues pudiera ser que dietas de marcada diferencia nutricional provoquen a corto plazo, un mismo efecto sobre el organismo prueba, si se dosificaran a un determinado valor energético o calórico alto. Esto significa que una diferencia en contenido nutricional puede ser enmascarada por un alto valor energético.

El fundamento teórico que se siguió para establecer la ración alimenticia del bioensayo con *Artemia franciscana*, está basado en primer término en la densidad crítica de *Chaetoceros* necesaria, bajo condiciones de cultivo continuo, 5×10^4 cels.ml⁻¹. (Sorgeloos *et al.*, 1986). Es importante señalar que el cultivo experimental que aquí se realizó no se puede considerar como continuo, ya que la densidad algal no fué mantenida constante en todo momento. Debido a que al volumen celular medio de *Tetraselmis* es mayor al de *Chaetoceros* (Sorgeloos, com. pers.), y a que la densidad crítica algal para *Artemia* es inversamente proporcional al volumen celular (Reeve, 1963a), se esperaba que el nivel crítico de *Tetraselmis* fuera inferior al de *Chaetoceros*. Tomando en cuenta además que las tasas de filtración e ingestión de *Artemia* se incrementan conforme ésta crece (Reeve, 1963b), se consideró que una ración diaria de 5×10^4

cels.ml⁻¹., de *Tetraseimis* debía ser superior a la ración crítica necesaria para los nauplios, permitiéndoles que la eficiencia de captación fuera alta y su desarrollo uniforme; sin embargo, conforme los animales fueran creciendo, sus requerimientos nutricionales se incrementarían hasta llegar a un punto en que la ración proporcionada fuera inferior al nivel crítico, provocándose una situación de competencia por el alimento, donde no habría sobrealimentación. De esta forma alguna variación en la composición bioquímica del alimento, se podría manifestar de forma más definida sobre alguna característica de los animales y no sería enmascarada por proporcionar un alimento energéticamente rico.

El diseño del cultivo experimental con *Artemia franciscana* realizado en este trabajo, está basado en el propuesto por Vanhaecke y Sorgeloos (1984), en el cual se utilizan tubos de ensayo como recipientes de cultivo. En el presente trabajo a diferencia del citado, los recipientes de cultivo son mantenidos constantemente en agitación, para evitar la estratificación del alimento, animales y de sus productos derivados tales como mudas y heces fecales. Esta práctica evita que los animales se congreguen en partes localizadas del recipiente de cultivo, debido al fototactismo al que obedecen, ya que al ocurrir ésto se establecen zonas de alimentación ineficiente por la rápida disminución del alimento, causada por la alimentación del grupo. La agitación a que se someten los tubos de cultivo, además de romper la tendencia de los animales a agregarse, mantiene constantemente en suspensión al alimento, asegurándose de esta forma que éste sea aprovechado lo mejor posible y en igual forma por todos los animales. Otra ventaja de este sistema es que al mantener en suspensión a los productos de desecho se evita la formación de zonas localizadas de descomposición anaeróbica.

El sistema ideado para tapar los tubos de cultivo, fué igualmente eficiente para permitir la difusión de gases a través de sí. Durante el período de cultivo se esperaba que tanto la demanda bioquímica de oxígeno del sistema, causada por los animales en crecimiento y por la descomposición de la materia orgánica generada, así como la producción de bióxido de carbono causada por las mismas fuentes, se incrementarían conforme el tiempo transcurría, tornándose adversas de esta forma las condiciones fisicoquímicas para el bioensayo. De esta forma, la instauración

de un sistema capaz de evitar que el contenido de los recipientes de cultivo fuera evacuado por el tipo de agitación a que fueran sometidos y así mismo capaz de permitir la difusión de gases para contrarrestar los gradientes que se generaran, era un problema técnico que debía ser superado.

Utilizar una película de polietileno, parcialmente solucionaría el problema, pues evitaría totalmente las pérdidas de agua y permitiría la difusión de bióxido de carbono a través de sí; sin embargo, el polietileno es impermeable al oxígeno, lo cual descartó su utilización. La idea de utilizar una membrana permeable al oxígeno, similar a la que usan los electrodos de los oxímetros, era muy atractiva pero se desconocía más información técnica sobre su permeabilidad a otros gases. Así mismo se desconocía si su grado de permeabilidad sería suficiente para eficazmente contrarrestar los gradientes de gases que se generaran.

Un ensayo preliminar demostró que el uso de malla nylon micrométrica como membrana semipermeable, evitaba que los recipientes de cultivo fueran evacuados al momento de ser invertidos por la agitación a que se sometían y asumiendo que la delgada película de agua que se formaba al contacto con la malla fuera suficientemente permeable para contrarrestar los gradientes de gases que se generaran, este sistema se consideró como una buena alternativa a la solución del problema planteado. En la práctica el sistema demostró ser capaz de mantener vivos a los organismos por un período mayor a diez días. Una característica que se observó durante la realización del bioensayo, fué que la membrana permitía la pérdida de agua por evaporación; ésta siempre fué inferior al 10% del volumen total del medio de cultivo, el cual era restablecido con agua destilada durante la maniobra de alimentación en cada día.

Los resultados obtenidos en el primer bioensayo con *Tetraselmis suecica* (sección 4.2.1.), para determinar el efecto de la concentración de extracto de estiércol sobre su crecimiento, muestran básicamente que conforme el medio de cultivo experimental era más enriquecido, tenía una mayor capacidad para promover el desarrollo algal (ver tabla 4.2). En el caso de haberse observado lo contrario, se podría pensar en la existencia de algún factor inhibitorio. La densidad alcanzada por los grupos experimentales, fué significativamente menor que la densidad alcanzada por el grupo control con

medio F.

En el segundo ensayo que se realizó (sección 4.2.2.), se esperaba que el medio de cultivo tuviera una mayor capacidad productiva considerando que la materia orgánica habría de estar más degradada. Aunque los resultados no fueron los que se esperaban la posibilidad de invalidar el bioensayo debido a que el inóculo no fuera viable, fué descartada ya que el grupo control floreció muy bien. El extracto con 8 días de digestión, tenía una mayor capacidad para promover el desarrollo algal, en comparación con el extracto con 24 días de digestión.

Los resultados del tercer bioensayo (sección 4.2.3.) corroboraron a los obtenidos en los anteriores, pudiendose establecer que conforme el extracto de estiércol era sometido a un período mayor de digestión, perdía su capacidad para promover el desarrollo algal. Además, se pudo establecer que el hecho de haber utilizado en el digestor una carga de estiércol mayor, tuvo como consecuencia concomitante un incremento en la capacidad del medio experimental, para promover el desarrollo algal. Las tasas de crecimiento del grupo control (medio F), no difirieron significativamente de aquellas de los otros grupos, lo cual dejó entrever que la selección del mejor medio de cultivo, debía ser en base a las densidades máximas alcanzables por los grupos experimentales, que sí variaron apreciablemente (tabla 4.7).

Los resultados permiten establecer el período óptimo para la digestión del estiércol de gallina en 4 u 8 días, entre los cuales no se apreciaron diferencias significativas (tabla 4.7). Debido a que el tiempo invertido en la producción del medio de cultivo es un factor considerable no hubo dificultad en escoger al período de 4 días como el más adecuado, porque se puede producir una doble cantidad de producto y con la misma calidad que el obtenido con 8 días de digestión, en el mismo tiempo.

Ahora bien, si tomamos en cuenta que la densidad máxima alcanzada por un cultivo de algas no únicamente depende de la presencia de nutrientes, sino también de otros factores, como podrían ser la turbidez, temperatura, iluminación o de algún factor biológico como la densidad de población o la presencia de algún competidor o predador, etc., es fácil comprender que un cultivo, conforme se realice a mayor escala, su densidad máxima alcanzable

disminuya aunque el resto de los parámetros se hayan mantenido constantes. Bajo estas situaciones los nutrientes no lleguen a ser limitantes, pues antes de que éstos sean agotados, el cultivo deja de crecer porque otro factor se ha constituido como limitante.

En el caso específico de la luz, indispensable para el proceso fotosintético, ésta generalmente es suficiente cuando la densidad del cultivo es baja, pero cuando la densidad aumenta, la penetración y disponibilidad de esta fuente de energía para las algas, comienza a disminuir hasta alcanzar un valor crítico, interrumpiéndose el crecimiento algal. De esta forma los nutrientes podrían llegar a ser subutilizados si se han dosificado en la misma proporción como son requeridos en cultivos de volúmenes inferiores. Es importante pues, conocer la densidad máxima alcanzable bajo las condiciones específicas a que se someterá el cultivo, para que los nutrientes sean dosificados en cantidades apropiadas.

La secuencia que se sigue rutinariamente en el Laboratorio de Ciencias Marinas para el escalamiento de los cultivos de microalgas con respecto a los volúmenes utilizados, es como sigue: 0.05 l, 1.3 l, 18 l y 500 l y sus respectivas densidades máximas medias alcanzadas son: 150×10^4 , 120×10^4 , 50×10^4 y 30×10^4 células ml^{-1} para el caso de *Tetraselmis suecica* con el medio de cultivo de Guillard y Ryther. Este descenso en las densidades máximas, inversamente proporcional a los volúmenes de cultivo, claramente es debido a la acción de un factor limitante, independiente de los nutrientes proporcionados en el medio de cultivo.

Apréciense los resultados de la tabla 4.9 en donde se muestran las densidades máximas de *Tetraselmis suecica* alcanzadas en los cultivos masivos con medio de cultivo a base de estiércol; considerando el récord arriba presentado, se puede observar que en el caso del volumen de 1.3 litros, el medio de cultivo "1/10" fué tan efectivo como lo es el medio de Guillard y Ryther, sin embargo, en el volumen de 18.0 litros, la densidad máxima alcanzada en el medio "1/10" fué inferior. La razón probable de esto es que el extracto de estiércol tiene color, interfiriendo de esta forma con la penetrabilidad de la luz y bajando el nivel de máxima densidad alcanzable. El motivo del cultivo de 18.0 litros con extracto a una proporción de "1/50", fué para verificar lo anterior, ya que al bajar su concentración también lo

hace el color, posibilitando una mayor disponibilidad de luz y un concomitante incremento en la máxima densidad alcanzable. Asumiendo que la relación entre la concentración de extracto y la densidad máxima alcanzable fuera de tipo lineal, se esperaba que la ración "1/50" promoviera el desarrollo algal a un nivel aproximado de 30×10^4 cels.ml⁻¹. Los resultados de este cultivo mostraron que la suposición era correcta y además que se subestimaba la capacidad del medio experimental ya que la densidad alcanzada fué superior a la que se esperaba.

De esta forma el medio de cultivo formulado con extracto de estiércol (20 g.l⁻¹) con 4 días de digestión, es capaz de promover el desarrollo algal en sistemas masivos (mas de un litro) en forma similar a como lo hace el medio F. Para su uso es importante tener cuidado en la forma de dosificarlo, para no subutilizarlo y además para que su coloración intrínseca no interfiera en la captación de luz.

En principio la no concordancia entre la información experimental obtenida con lo que teóricamente se esperaba (que el medio de cultivo experimental tuviera una mayor capacidad para promover el desarrollo algal, conforme se sometiera a un período mayor de digestión), sugirió alguna deficiencia en el proceso de fermentación utilizado. En observaciones realizadas durante los períodos de fermentación, era notable el surgimiento de microorganismos (cianofitas, protozoarios y micelios), el cual se iba incrementando conforme el tiempo transcurría. Una posible explicación que proporciona coherencia a las anteriores observaciones, es que el estiércol al ser depositado por las aves, sobre la cama de viruta, es degradado casi completamente, debido al tiempo que transcurre hasta que la cama es removida (8 semanas). De esta forma, el material utilizado en este trabajo como estiércol de gallina, consiste en materia orgánica casi mineralizada, que al ser tratada según metodología antes descrita, se pone muy pronto en disolución. Posteriormente esta solución nutritiva, promueve el desarrollo de una flora microbiana dentro del digestor, la cual conforme va desarrollandose, a su vez va agotando los nutrientes, pudiendose explicar de esta forma, el porqué el extracto producido pierde su capacidad para promover el desarrollo algal conforme es preservado durante tiempos prolongados dentro del digestor.

La verificación de cuán consistente es esta teoría con lo realmente acontecido, es algo que está fuera de los objetivos de este trabajo.

En las gráficas 4.1 (a,b) sobre los cultivos semicontinuos de *Tetraselmis suecica* con los diferentes medios, se puede apreciar que ambos cultivos tuvieron un comportamiento muy similar. Los descensos significativos en la densidad algal, corresponden a los reajustes realizados, consistentes en cosechar un volumen determinado y agregar otro de igual magnitud de medio de cultivo. La composición bioquímica del alga se mantiene estable cuando es cultivada bajo un sistema continuo, sin embargo en un sistema semicontinuo se establece una variabilidad en la composición algal, correspondiente a los cambios fisicoquímicos originados por el crecimiento y los reajustes periódicos. Así, se establece que en un sistema semicontinuo la composición bioquímica de la especie cultivada, se mantiene dentro de un rango. De cualquier forma, debido a la similitud que mostraron los cultivos entre sí, el efecto de los cambios en su composición sobre el organismo prueba se espera hayan sido también similares.

Apréciase que los cultivos fueron mantenidos a una densidad relativamente alta; ésto fué para que al ser proporcionados como alimento para el organismo prueba, no se corriera el riesgo de tener que hacer una sustitución casi completa del medio donde se encontraban los animales o aún más, que la densidad fuera insuficiente para proporcionar lo deseado. De esta forma, una porción pequeña de cultivo altamente denso, era suficiente para conseguir lo deseado.

Sobre el costo del medio de cultivo utilizando el estiércol de gallina como fuente de nutrientes, es interesante apreciar que un litro es aproximadamente 11.83 veces más económico que un litro del medio de Guillard y Ryther, sin tomar en cuenta salarios de personal. El precio del medio inorgánico comercializado por la compañía "Fritz Aquaculture" en forma concentrada para diluirse en una tonelada de agua es de 1.371 dólares, mientras que el precio de 2 kg de estiércol de gallina necesarios para fertilizar una tonelada de agua es de 270 pesos. El índice de cambio entre el peso y el dolar al hacer estas consideraciones es de 2,330 pesos por dolar. Se tienen reportes sobre el uso del estiércol de gallina como alimento para ganado de engorda, procedimiento que ha dado valor a su utilización. Es

posible que los costos de producción de biomasa por la vía de las cadenas alimenticias acuáticas controladas, partiendo de un productor primario, puedan ser aún más significativamente reducidas, debido al abaratamiento del medio de cultivo, por utilizar un precursor también abundante y económico como las excretas de los ganados vacuno, ovino, porcino, etc., los cuales pueden ser aprovechados en forma similar a la que aquí se ha expuesto con los desechos de gallina. Con respecto a los desechos de la especie humana, su utilización ofrece una buena perspectiva puesto que siendo una especie omnívora, se espera que su contenido de nutrientes sea muy completo, pudiéndose canalizar para múltiples propósitos. Ryther *et al.*, (1972) plantean que mucho tiempo y esfuerzo se han invertido en el control del problema de la eutroficación por los desechos urbanos y que una buena alternativa para su erradicación, es su utilización como aportador de nutrientes para la producción de biomasa. Puesto que los desechos urbanos pueden llevar consigo virus y bacterias patógenas y aún más, compuestos tóxicos como metales pesados o sustancias poco degradables, liberadas por gente falta de escrúpulos o de conocimientos, el progreso en la solución de este problema ha sido lento, pero se espera que en cercano futuro se contemplen alternativas convenientes.

Este trabajo fué realizado a una escala limitada pues solo se pretendía demostrar su factibilidad. Un trabajo ulterior debe consistir en su escalamiento, ésto es, realizarse a una escala mayor y así poder ser explotado en la solución de los problemas ambientales y nutricionales planteados. La canalización de los productos de ésta empresa debe ser definida de antemano para que desde principio hasta fin, los esfuerzos realizados se orienten en la obtención de un producto adecuado a su utilización.

Aunque el objeto principal de este trabajo no fué evaluar la efectividad del funcionamiento de la unidad fermentadora, es conveniente mencionar que tiene varias características que en teoría lo hacen muy eficiente, ya que el tratamiento de los desechos se realiza mediante una combinación de dos principios. En primer término, en la que aquí se ha llamado cámara de retención, se lleva al cabo un crecimiento microbiano homogéneo en toda la columna de agua debido a la agitación que se proporciona, evitándose así que haya estratificación. De esta forma el organismo degradador está siempre en

contacto con la materia por degradar, esperandose así que el sistema sea muy eficiente. La agitación se realiza por medio de aire en el fondo del sistema, proporcionandose de esta forma, además, el oxígeno necesario para la oxidación de la materia orgánica. El sistema de degradación en la otra cámara es sustancialmente diferente, pues en ésta, se esperaba que el crecimiento microbiano estuviera principalmente localizado en el sustrato rocoso, el cual degradaría la materia orgánica que constantemente estaría pasando a través de sí. Teóricamente a mayor sustrato disponible, mayor será el tamaño de la comunidad microbiana y así mismo su eficiencia; de esta forma se esperaba que el hecho de haber utilizado un sustrato de alta superficie de contacto, permitiera una mayor eficiencia para la degradación de lo orgánico.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

1º El crecimiento y sobrevivencia de *Artemia franciscana* no difirieron significativamente, al utilizar estiércol de gallina como precursor del medio de cultivo para el alga *Tetraselmis suecica* o el medio de cultivo de Guillard y Ryther (1962) para la misma alga, proporcionada como alimento.

2º El alga *Tetraselmis suecica* cultivada en solución enriquecida con extracto biodigerido de estiércol de gallina, tiene el mismo rendimiento que aquella cultivada en el medio tradicional de Guillard y Ryther (1962), tanto en sistemas estáticos como semicontínuos.

3º El biodigestor utilizado demostró ser eficiente en la obtención de los nutrientes contenidos en el estiércol de gallina.

4º La carga de estiércol del digestor, el tiempo óptimo de digestión y la concentración de extracto de estiércol digerido en la formulación del medio de cultivo, para promover el desarrollo de *Tetraselmis suecica* fueron: 20 g·l⁻¹, 4 días y 100 ml·l⁻¹ de medio de cultivo, respectivamente.

5º El sistema ideado para mantener constantemente en agitación y bajo condiciones aeróbicas el cultivo experimental con *Artemia franciscana*, demostró ser eficaz.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

- Allen, G. H. y R. L. Carpenter. 1977. The cultivation of fish with emphasis on salmonids in municipal wastewater lagoons as an available protein source for human beings. p. 479-528. *En: Wastewater Renovation and Reuse*. F.M. D'itri (Ed.). Marcel Dekker, Ink., New York, U.S.A. 705 p.
- Amat-Domenech, F. 1980. Differentiation in *Artemia* strains from Spain. p. 19-40. *En: The brine Shrimp Artemia*. Vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoon, G., P. Sorgeloos, O. Roesl y E. Jaspers (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium. 345 p.
- Brune, D. E. y T. H. Anderson. 1986. An explanation of size diversity among *Artemia* cohorts; a model of food uptake kinetics. p. 15. *En: Artemia Newsletter*. No. 2. P. Sorgeloos (Ed.). Artemia Reference Center, State University of Ghent, Ghent, Belgium. 43 p.
- Butcher, R. W. 1959. An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I: Introduction and Chlorophyceae. *Fish. Invest. Minist. of Agricult., Fish & Food, Serv. IV*. 1:1-74.
- Conte, F. P., P. C. Droukas y R. D. Ewing. 1977. Development of sodium regulation and De Novo synthesis of Na⁺ K⁺ activated ATPase in larval brine shrimp *Artemia salina*. *The Journal of Experimental Zoology*. 202(3):339-362.
- De Paw, N., G. Bruggeman y G. Persoon. 1978. Research on the tertiary treatment on swine manure by mass culturing of algae. *Mitt. internat. Verein. Limnol.*, 21:490-506.
- De Paw, N., H. Verlet y L. De Leenheer Jr. 1980. Heated and unheated outdoor cultures of marine algae with animal manure. p. 315-341. *En: Algae Biomas*. G. Shelef y C.J. Soeder (Eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 852 p.

- Droop, M. R. 1975. The chemostat in mariculture. *10 th. European Symposium on Marine Biology, Osterna, Belgium. Sept. 17-23.* 1:71-93.
- Fox, J. M. 1983. Intensive algal culture techniques. p. 15-45. *En: CRC Handbook of Mariculture. Vol. 1. Crustacean Aquaculture.* McVey, J.P. y J.R. Moore (Eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. USA. 442 p.
- Gilchrist, B. M. 1960. Growth and form of the brine shrimp *Artemia salina* (L.). *L. Frac. Sac. Lond.*, 134(2):211-235.
- Goldman, J. C. 1979. Outdoor algal mass cultures - I. Applications. *Water research.* 13:1-19.
- Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. p. 289-312. *En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements.* J. R. Stein (Ed). Cambridge University Press, Cambridge, London. 448 p.
- Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Granados-Machuca C. y L. F. Buckle-Ramírez. 1984. Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. *Ans. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ., Nat., Autón., MEXICO.* 11(1):241-256.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. p. 255-266. *En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements.* J. R. Stein (Ed). Cambridge University Press, Cambridge, London. 448 p.
- Johnson, F. 1980. Culture of *Artemia* on different diets. p. 185-192. *En: The brine Shrimp Artemia. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture.* Persoon, G., P. Sorgeloos, O. Roesl y E. Jaspers (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.
- Kaiser, G. E. y F. W. Wheaton. 1983. Nitrification filters for aquatic culture systems: state of the art. *J. Word Maricul. Soc.* 14:302-324.

- Kellog V. L. 1906. A new *Artemia* and its life conditions. *Science, N. Y.* 24:594-596.
- Kinne, D. (Ed.). 1977. *Marine Ecology*. Volume III. Cultivation. Part 2. John Wiley and Sons, New York, U.S.A. 1293 p.
- McShan, M., N. M. Trieff y D. Grajcer. 1974. Biological treatment of wastewater using algae and *Artemia*. *Journal Water Pollution Control Federation*. 46(7):1742-1750.
- Milligan, D. J., J. A. Quick, S. E. Hill, J. A. Morris y R. J. Hover. 1980. Sequential use of bacteria, algae and brine shrimp to treat industrial wastewater at pilot plant scale. p. 193-206. *En: The brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoon, G., P. Sorgeloos, D. Roest y E. Jaspers (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.
- Nimura, Y. 1980. Retarded growth of *Artemia salina* by overfeeding. *Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries*. 46(6):681-687.
- O'Callaghan, J. R., V. A. Dodd y K. A. Pollock. 1973. The long term management of animal manures. *J. Agric. Engig. Res.* 18:1-12.
- Odum, E. P. 1972. *Ecología*. Nueva Editorial Interamericana, México. 640 p.
- Oswald, W. J., J. R. Benemann y B. L. Koopman. 1977. Production of biomass from fresh water aquatic systems - Concepts of large-scale bioconversion systems using microalgae. *Proc. Fuels froms Biomass Symposium, Univ. of Ill., Champaign, Ill.* 59-81.
- Paniagua, J., B. C. Farfan y F. Buckle. 1987. Culture of marine microalgae with natural biodigested resources. *Aquaculture*. 64:249-256.
- Reeve, M. R. 1963a. The filter feeding of *Artemia*. I. In pure cultures of plant cells. *J. Exp. Biol.* 40:195-205.

- Reeve, M. R. 1963b. Growth efficiency in *Artemia* under laboratory conditions. *Biol. Bull.* 125:133-145.
- Rollefsen, G. 1939. Artificial rearing of fry of seawater. Preliminary communication. *Repp. Proc.-Verb. R un. Cons. Ferm. Explor. Mer.* 109-133.
- Ryther, J. H., W. M. Dunstan, K. R. Tenore y J. Huguenin. 1972. Controlled eutrophication increasing food production from the sea by recycling human wastes. *Bioscience*, 22:144-152.
- Seale, A. 1933. Brine shrimp (*Artemia*) as a satisfactory live food for fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 63:129-130.
- Shelef, G., R. Moraine, A. Meydon y E. Sandbank. 1976. Combined alg e production-wastewater treatment and reclamation systems. p. 427-442. *En: Microbial Energy Conversion*. H. G. Schlegel y J. Barnea (Eds.). Erich Goltze KG Publishers, Gottingen, Germany. 644 p.
- Sick, L. V. 1976. Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development, and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. *Marine Biology*. 35:69-78.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1987. *Introduction to Biostatistics*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, U.S.A. 363 p.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. p. 25-50. *En: The brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoon, G., P. Sorgeloos, O. Roel y E. Jaspers (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.
- Sorgeloos, P., P. Lavens, P. L ger, W. Tackaert y D. Versichele. 1986. Manual for the culture and use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *Artemia Reference Center, State University of Ghent, Ghent, Belgium*. 319 p.

- Sorgeloos, P., G. Persoon., M. Baesa-Mesa., E. Bossuyt y E. Bruggeman. 1978. The use of *Artemia* cysts in aquaculture: the concept of "hatching efficiency" and description of a new method for cysts processing. p. 715-721. *En: Proc. 9th Annual Meeting World Mariculture Society*. Avault, J. W., Jr., (Ed.). Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. 807 p.
- Spotte, S. 1979. Conditioning bacteriological filters. p. 147-158. *En: Seawater aquarium: the captive environment*. A Wiley-Interscience publication. John Wiley and Sons. New York, U.S.A. 413 p.
- Stein, J. R. (Ed.). 1973. Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, London. 448 p.
- Strickland, J. D. H. 1966. Measuring the production of marine phytoplankton. *Bull. Fish. Res. Bd Can.* 122:1-172.
- Subba Rao, D. V. 1981. Growth response of marine phytoplankters to selected concentrations of trace metals. *Botanica Marina*. 24:369-379.
- Tobias, W. J., P. Sorgeloos, O. A. Roels y B. A. Sharfstein. 1980. International study on *Artemia* XIII. A comparison of production data of 17 geographical strains of *Artemia* in the St. Croix artificial upwelling mariculture system. p. 383-392. *En: The brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoon, G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.
- Ukeles, R. 1973. Continuous culture - a method for the production of unicellular algal foods. p. 233-254. *En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Janet R. Stein (Ed). Cambridge University Press, Cambridge, London. 448 p.
- Vanhaecke, P. y P. Sorgeloos. 1980. International Study on *Artemia* XIV. Growth and survival of *Artemia* larvae of different geographical origin in a standard culture test. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 3:303-307.

Walrath, D. y A. S. Natter. 1976. Aquiculture - new broom cleans up
wastewater. *Water Wastes Eng.* 13(2):38-41.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APENDICE

Ejemplo del procedimiento y fórmulas utilizadas en la preparación del medio de cultivo experimental.

Si se desearan preparar 500 ml de medio de cultivo a una salinidad inicial de 30 ‰ en la que la proporción de extracto de estiércol y la de agua de mar fuera 1/10 y sus respectivas salinidades fueran 38 ‰ y 33 ‰, se deben mezclar 50 ml de extracto con 450 ml de agua de mar diluida a un valor de 29.1 ‰. Las anteriores determinaciones son el producto de considerar lo siguiente.

La salinidad (S ‰) de una solución acuosa está dada por el cociente entre la cantidad de soluto expresada en gramos y la cantidad de solvente expresada en kilogramos; el resultado se expresa en partes por mil y se abrevia como "‰".

$$S \text{ ‰} = \frac{\text{g de soluto}}{\text{kg de solvente}} \quad (1)$$

La fórmula (1) puede ser desglosada como sigue

$$S \text{ ‰} = \frac{g_i + g_{ii} + g_n}{kg_i + kg_{ii} + kg_n} \quad (2)$$

La fórmula (2), puede ser útil en la determinación de la salinidad final (S ‰_f), de una mezcla de soluciones de diferentes salinidades. En nuestro ejemplo nos interesa conocer la salinidad a la que ha de ser diluida el agua de mar para que al ser mezclada con el extracto se consiga la salinidad deseada. Despejando "g" en la fórmula (1) y sustituyendola en la fórmula (2), queda la siguiente expresión:

$$S \%_r = \frac{(S \%_i)(kg_i) + (S \%_{ii})(kg_{ii})}{kg_i + kg_{ii}} \quad (3)$$

La relación 1/10 equivale a una mezcla en la cual, el 10 % del volumen por preparar (500 ml), está constituido por el extracto de estiércol y el 90 % por el agua salada, respectivamente 50 ml y 450 ml. Despejando el valor de la salinidad del agua de mar ($S \%_{ii}$) de la fórmula (3) queda que

$$S \%_{ii} = \frac{(S \%_r)(kg_i + kg_{ii}) - (S \%_i)(kg_i)}{kg_{ii}} \quad (4)$$

Sustituyendo símbolos por valores queda

$$S \%_{ii} = \frac{(30 \%)(0.05 \text{ kg} + 0.45 \text{ kg}) - (38 \%)(0.05 \text{ kg})}{0.45 \text{ kg}} \quad (5)$$

El valor calculado para la salinidad del agua de mar es 29.1 ‰; en otras palabras, se necesitan 450 ml de agua de mar a una salinidad de 29.1 ‰ para que al mezclarse con los 50 ml de extracto de estiércol, la salinidad sea 30 ‰. Para hacer la dilución, previamente se hace un cálculo muy similar al anterior, utilizando la fórmula (3) en la cual se sustituye la unidad kilogramo por la de litro, despejándose así la variable correspondiente al volumen del agua de mar (l_{ii}) como sigue:

$$l_{ii} = \frac{(S \%_r)(l_i + l_{ii}) - (S \%_i)(l_i)}{S \%_{ii}} \quad (6)$$

El contenido de sales del agua dulce o de la llave (I_1), es inferior a 1 ‰ (aproximadamente 0.13 ‰, valor que se ha determinado para la dureza total en el suministro de agua al Laboratorio de Ciencias Marinas) y por razones de practicidad será considerada como 0 ‰. Esta asunción introduce un error muy pequeño y por consiguiente despreciable. Debido a esto la fórmula (6) se puede abreviar porque el producto de la salinidad del agua dulce por su volumen es nulo. Sustituyendo símbolos por valores en la fórmula (6) abreviada, queda:

$$I_{II} = \frac{(29.1 \text{ ‰})(0.45 \text{ l})}{33 \text{ ‰}} \quad (7)$$

El valor estimado para el volumen del agua salada es 0.397 l; esto significa que mezclando 397 ml de agua de mar a 33 ‰ con 53 ml (450 ml - 397ml) de agua dulce, se obtiene una solución de agua salada a 29.1 ‰, que es la deseada finalmente para formular el medio de cultivo con los 50 ml de extracto de estiércol. El agua de la llave utilizada para la dilución, previamente se esteriliza y enfría de la misma forma como se hizo en las soluciones de agua salada y de extracto de estiércol (sección 3.2.1).
