

Tecnologías para el cultivo de microalgas en interior y exterior. Propuestas prácticas para operar en granjas acuícolas de pequeña escala.

¹Cruz-y-Cruz I*, ²Sánchez-Ceballos EE, ¹Ocampo-Cervantes JA, ¹Castro-Mejía J,
¹Monroy-Dosta MC, ¹Castro-Mejía G.

1 Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco. Depto. El Hombre y su Ambiente, Licenciatura en Biología. Módulo Ciclos Biogeoquímicos. Calzada del Hueso. No 1100. Col Villa Quietud, México, 04960, DF. Del. Coyoacán, Tel: 5483 7000 Ext. 3114, Fax: 54837469.

2 Grupo multidisciplinario Agua Tierra S. C. de R. L. de C. V., Invernadero experimental “La Joyita”, Tlalpan, D.F., C.P. 14030

* Email responsable: icruz@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

Uno de los principales problemas que afrontan los productores de peces de ornato dulceacuícolas, es la escasa disponibilidad del alimento vivo demandado por muchas especies durante las fases iniciales de desarrollo. Las tecnologías para la producción constante de este tipo de alimento no están al alcance de la mayoría de los productores debido a sus altos costos y lo complicado de los procedimientos que involucran. En la búsqueda de técnicas sencillas y económicas para la producción de microalgas, con potencial de ser efectuadas en pequeñas granjas acuícolas, se desarrollaron procedimientos para cultivo masivo de forma semi-continua, inoculando con muestras de cuerpos de agua superficiales y usando fertilizantes comerciales, en dos formas: 1) en condiciones de interior, con iluminación artificial continua, y 2) en condiciones de exterior, con iluminación y fotoperiodo naturales. Para el primer caso se diseñó un foto-biorreactor metálico que soportaba bolsas de polietileno colgantes de 10 L de capacidad, iluminación continua con lámparas fluorescentes, aireación constante y temperatura ambiente; en el segundo, se emplearon garrafones de plástico de 20 L dispuestos en un anaquel de lámina metálica, aireación las 24 h, luz solar y temperatura ambiente. Ambos modos de producción generaron cultivos de microalgas verdes con predominancia (> 90% de cél mL⁻¹ en cada caso) del complejo de géneros hermanos *Desmodesmus* (R. Chodat) S. S. An, T. Friedl & E. Hegewald, 1999 - *Scenedesmus* Meyen 1999, demostrando ser eficientes en cuanto al tipo de poblaciones y biomasa producidas. Los tiempos estimados de desarrollo de la densidad poblacional óptima para la cosecha, las condiciones del mantenimiento y la

duración funcional del cultivo, facilitan su puesta en práctica en granjas pequeñas y medianas para establecer una producción constante de alimento vivo; se considera viable su transferencia tecnológica.

Palabras clave: Alimento vivo, cultivos interior/exterior, microalgas dulceacuícolas, transferencia tecnológica.

ABSTRACT

One of the main problems that freshwater ornamental fish producers have is low disponibility of live food demanded by many species during initial stations of development. Technologies for constant development of this type of food are beyond reach of most farmers due to high costs and complicated procedures involving. In the search of simple and economic techniques for microalgae production, with potential to use in small aquaculture farms, procedures for semi-continuous massive culture were develope, inoculating with surface water samples and using commercial fertilizers, in two ways: 1) indoor conditions, with continuous artificial lightning, and 2) outdoor conditions with natural lighting and photoperiod. For indoor conditions, a metallic photo bioreactor that supports pendant polyethylene bags of 10 L capacity was design, with continuous lighting of fluourescent lamps, constant aeration and room temperature; for indoor conditions, plastic carboys of 20 L disposed in a metal foil shelf were use, continuous aeration, sunlight and ambient temperature. Both modes of production generated green microalgae cultures with predominance (>90% of cell mL⁻¹ in both cases) of complex *Desmodesmus* (R. Chodat) S.

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

S. An, T. Friedl & E. Hegewald, 1999 - *Scenedesmus* Meyen 1999, proving being efficient in the type of produced population and biomass. The estimated development times of the optimum population density for harvesting, maintenance conditions and the functional culture duration, facilitate its implementation in small and medium farms to establish a constant live feed production. It is consider viable for technology transfer.

Key words: Live food, indoor/outdoor cultures, freshwater microalgas, technologic transfer.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas a que se enfrentan los productores de peces de ornato dulceacuícolas en el mundo y particularmente en México, en donde la mayoría trabaja en pequeña escala (Ramírez et al. 2010), es la escasa disponibilidad de alimento vivo demandada por muchas especies para la fase de crianza (Polanco 1999; Dhert et al. 2001; Lim et al. 2003), en la que se presenta la mayor tasa de mortalidad; el cultivo de las especies que sirven como alimento es, entonces, la base del desarrollo y diversificación de la producción acuícola (Polanco 1999). Las tecnologías para la producción constante y de calidad de alimento vivo no están al alcance de la mayoría de los productores debido a lo costoso y complicado que es la implementación de cultivos monoclonales de algas para sostener la producción de zooplancton, considerando el costo de la construcción o acondicionamiento de las instalaciones para el mantenimiento de condiciones asépticas para el adecuado crecimiento de monocultivos de microalgas, el costo de adquisición de una cepa pura y su difícil mantenimiento, así como el costo de los reactivos y la complicada elaboración de los medios de cultivo empleados en laboratorios, aunados a la alta demanda de tiempo y mano de obra calificada requeridos.

En el nivel biológico, la producción masiva de algas se encuentra condicionada por diversos factores que actúan sinérgicamente, como son: la temperatura, el pH, la concentración de sales, la disponibilidad de nutrimentos, el tipo e intensidad de

luz, la densidad del propio cultivo y la presencia de organismos consumidores (Malgas 2013); adicionalmente, en el nivel tecnológico, el éxito de la producción de las microalgas depende, entre otros factores, del desarrollo de sistemas de cultivo rentables, lo cual es un proceso gradual (Borowitzka 1999). Al efectuar un cultivo, se considera que el componente que tiene una importancia principal como limitante del crecimiento es la luz, puesto que los nutrimentos y, en algunos casos, el bióxido de carbono, pueden incorporarse en exceso al medio para evitar que actúen como factor limitante, mientras que la luz necesariamente debe suministrarse en el tiempo, dado que la irradianza no es acumulable (Molina-Grima et al. 1996; Borowitzka 1999; Janssen 2002); así, un principio básico en los diseños de foto-biorreactores es tomar en cuenta la calidad y cantidad de luz disponible para cada célula (Borowitzka 1999). La energía lumínica necesaria para la producción implica uno de los costos más importantes cuando se trata de sistemas de interior (Borowitzka 1999), por ello, se considera preferible el empleo de la luz solar como fuente de energía (Janssen 2002).

En la exploración de procedimientos simples y económicos para la producción de microalgas de agua dulce, susceptibles de ser utilizados en pequeñas granjas acuícolas, se implementaron y ajustaron técnicas para el cultivo masivo de microalgas de forma semi-continua (Leavens y Sorgeloos 1996) bajo condiciones de interior con iluminación artificial, y de exterior con irradianza natural, a partir de inóculos procedentes de cuerpos de agua superficiales, empleando fertilizantes comunes en el mercado y económicos; se buscaba: 1) evaluar la eficiencia de los procesos de producción de microalgas con respecto a la cantidad y el tipo de biomasa generados, observando el efecto simultáneo de selección de los fertilizantes y las condiciones de cultivo sobre la mixtura de organismos fotosintéticos inoculados, y 2) probar la eficacia de dos distintos fertilizantes comerciales en tres diferentes concentraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

Los sistemas de producción.

Se utilizaron dos sistemas de cultivo:

1) En interior, con condiciones de luz y aireación constantes y temperatura ambiente. En un espacio cerrado de 2 x 2 m se diseñó un fotobiorreactor consistente en una estructura metálica de 1.2 x 0.45 x 2.0 m con un sistema de iluminación mediante ocho lámparas fluorescentes marca Philips de luz blanca fría de 40 W, dispuestas sobre los muros trasero y laterales, y un sistema conductor de aire desde una bomba externa, hecho con tubos de PVC –policloruro de vinilo– (Fig. 1); sobre esta estructura se colocaron bolsas colgantes de polietileno de baja densidad de 5-10 L de capacidad, mediante varillas metálicas desmontables (Helm y Bourne 2006).

2) En exterior, sujetos a la intemperie. Se emplearon garrafones de plástico de grado alimenticio, de 10 y 20 L de capacidad, dispuestos en un anaquel de lámina estándar de 2.1 x 0.85 x 0.3 m, con aireación las 24 h proporcionada por una bomba para acuariofilia de 5 W, luz solar y temperatura ambiente (Fig. 2).

El medio de cultivo

Para el medio de cultivo se utilizó agua del grifo esterilizada químicamente, añadiendo una solución de hipoclorito de sodio comercial (NaClO al 5 %) a razón de 1 mL 10 L⁻¹ de agua, dejando actuar durante 24 h y neutralizando una hora antes de su uso con tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) en proporción de 50 mg 1 mL⁻¹ de NaClO utilizado (Torrentera y Tacon 1989).

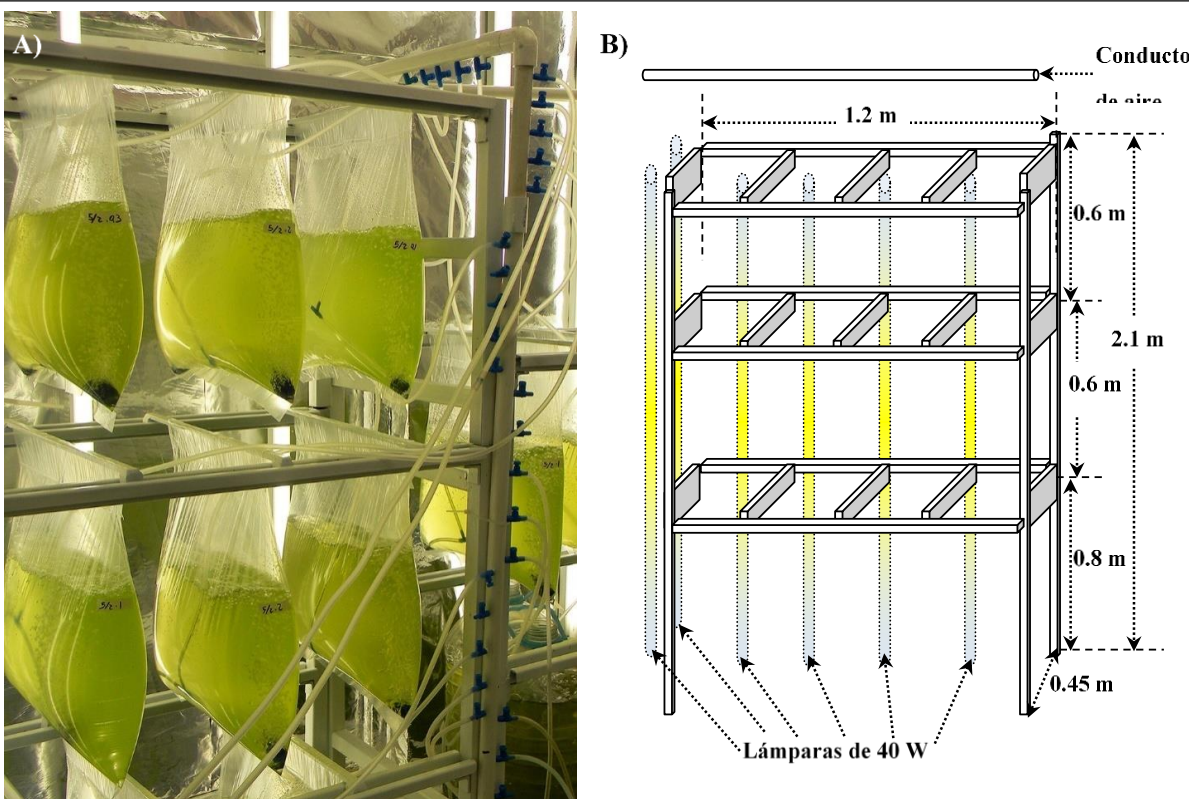


Fig. 1. Fotobiorreactor en interior. A) Imagen parcial en donde se aprecian la disposición de las bolsas de cultivo colgantes y los sistemas de iluminación y aireación. B) Esquema de la estructura, con medidas.

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

Fertilización.

Se utilizaron dos fertilizantes comerciales: Triple 17 de uso agrícola (T-17) y un fertilizante sin marca para cultivos hidropónicos, identificado como “Ferticiencias” (FCh) por ser elaborado y expendido en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Ambos se probaron en tres concentraciones: 0.15, 0.10 y 0.05 mg L⁻¹, con tres réplicas de cada una, en los dos sistemas.

Inóculo y siembra

El inóculo se tomó de un cuerpo de agua superficial ubicado en la Zona Lacustre de Xochimilco, el cual fue observado con un microscopio óptico Leica DM750 con cámara digital ICC50HD, para asegurarse de que contuviera al menos una especie de alga verde unicelular o cenobial. Al detectar presencia de cianofitas,

vinculadas con coloraciones verde-azules o cafés, el agua fue descartada para la experimentación.

El agua fue filtrada con un sistema artesanal de cuatro tamices, construido con telas para serigrafía de luz de malla de 290, 150, 55 y 34 μm, tensadas en tubos de PVC de 160 mm de diámetro y sostenidas por acopladores del mismo material, dispuestas sucesivamente en orden descendente de tamaño de apertura; esta agua se agregó como inóculo en el medio de cultivo a razón del 10 % del volumen total sembrado.

Seguimiento

Diariamente se registraron la temperatura y el pH con un multiparamétrico Hanna HI 98129; se revisó una muestra en el microscopio óptico para comprobar la composición y el efecto de selección de las condiciones de cultivo; se efectuaron conteos en cámara de Neubauer para evaluar el crecimiento de la población; se registraron los cambios de

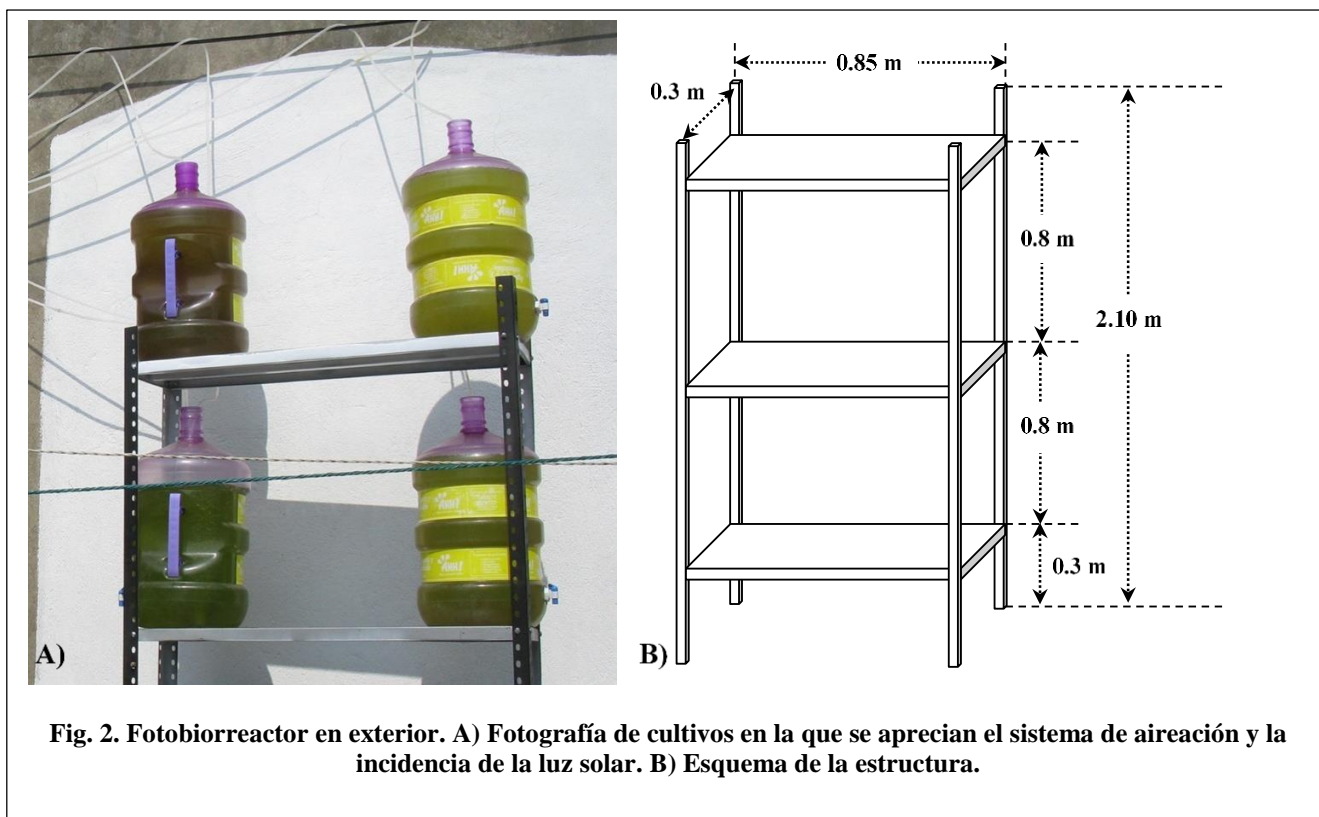


Fig. 2. Fotobiorreactor en exterior. A) Fotografía de cultivos en la que se aprecian el sistema de aireación y la incidencia de la luz solar. B) Esquema de la estructura.

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

coloración y/o composición en el medio. Al momento de la cosecha se efectuaron análisis de nitritos, nitratos y amonio por colorimetría con equipos Nutrafin Test de Hagen.

Tiempos de cosecha y de vida útil del cultivo.

El tiempo adecuado para cosechar se estimó en función de la densidad de cél mL⁻¹ y, de manera indirecta, en función de la coloración y la densidad aparente del cultivo. Se determinó el tiempo de vida útil procediendo al ciclo cosecha-re-inóculo, consistente en cosechar el 50% del volumen de cada contenedor, reponerlo con agua acondicionada y fertilizar; este ciclo se repitió hasta que se presentó un cambio en la coloración y/o textura del medio,

indicativo de que había ocurrido una sucesión de organismos; tal cambio fue confirmado mediante la observación al microscopio óptico.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los resultados promedio de las tres réplicas para los dos sistemas propuestos. A lo largo del periodo de trabajo, en las condiciones de interior y exterior los valores de las variables fueron: temperatura, 20-25 °C y 10.2-25 °C respectivamente; pH, 8.1-9.8 y 8.1-10 respectivamente. De manera independiente del sistema de producción, el comportamiento de los cultivos mostró un patrón semejante tanto en la

Tabla 1. Principales resultados (valores medios e intervalos) con las tres concentraciones de los dos fertilizantes utilizados en los sistemas de cultivo experimentales.

Sistema de cultivo	T (°C)	pH	Fertilizante	Dosis (g L ⁻¹)	Densidad máxima promedio (cél mL ⁻¹)	Días de viabilidad del cultivo	Concentraciones de nutrimentos al cosechar (mg L ⁻¹)		
							NO ₂	NO ₃	NH ₄
En interior	20 – 25	8.1 – 9.8	T-17	0.05	3.1 x 10 ⁶	91	0.3	5	0.6
				0.10	5.6 x 10 ⁶	91	0	5	0
				0.15	7.9 x 10 ⁶	91	0	0	0
			FCh	0.05	3.1 x 10 ⁶	85	0	5	0
				0.10	5.4 x 10 ⁶	85	0	0	0
				0.15	8.0 x 10 ⁶	85	0	0	0
En exterior	10.2 - 25	8.1 – 10.0	T-17	0.05	3.2 x 10 ⁶	91	0.3	5	0.6
				0.10	4.9 x 10 ⁶	91	0	5	0
				0.15	7.4 x 10 ⁶	91	0	0	0
			FCh	0.05	3.3 x 10 ⁶	85	0	5	0
				0.10	5.9 x 10 ⁶	85	0	0	0
				0.15	7.5 x 10 ⁶	85	0	0	0

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

eficiencia de los fertilizantes y sus concentraciones para la generación de biomasa (Fig. 3), como en la selección ejercida sobre la mixtura de algas. La producción de biomasa fue directamente proporcional a la concentración de fertilizante, pudiéndose apreciar una mayor producción en cél mL^{-1} en la concentración de 0.15 g L^{-1} , una menor producción en la concentración de 0.05 g L^{-1} y una producción intermedia en la concentración de 0.1 g L^{-1} en todos los casos; es decir, este comportamiento mostró el mismo patrón entre los fertilizantes y entre las condiciones de interior/exterior. Las concentraciones de nitritos, nitratos y amonio fueron ligeramente elevadas para los cultivos de T-17 únicamente en la concentración de 0.15 g L^{-1} , siendo mínimas en el resto de los casos. Se alcanzaron densidades poblacionales adecuadas para la cosecha (entre 3.1 y $7.5 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$, que no necesariamente son las densidades máximas) entre las 72 y 96 h a partir del inicio del cultivo (Fig. 3), alcanzándose

nuevamente la densidad apropiada cada 72 h durante el ciclo cosecha-re-inóculo y mantenimiento semi-continuo.

La duración de los cultivos en un mismo contenedor fue eficiente durante 10 días (inóculo inicial y dos cosechas, o tres cosechas a partir del re-inóculo con cultivo), transcurridos los cuales fue necesario sembrar –en el caso de los cultivos en interior, en bolsas nuevas, desechando las usadas, y en el de los cultivos en exterior, en garrafones completamente limpios y desinfectados con solución de hipoclorito de sodio–, filtrando previamente con malla de $34 \mu\text{m}$ para evitar la formación de agregados suspendidos o películas adheridas a las paredes. En todos los cultivos generados, las poblaciones desarrolladas en primera instancia fueron de clorofitas unicelulares o cenobiales; la composición mixta de los inóculos cambiaba desde las primeras 24 h de iniciado el cultivo, orientándose hacia el crecimiento de 5 o 6 tipos de clorofitas clorococales

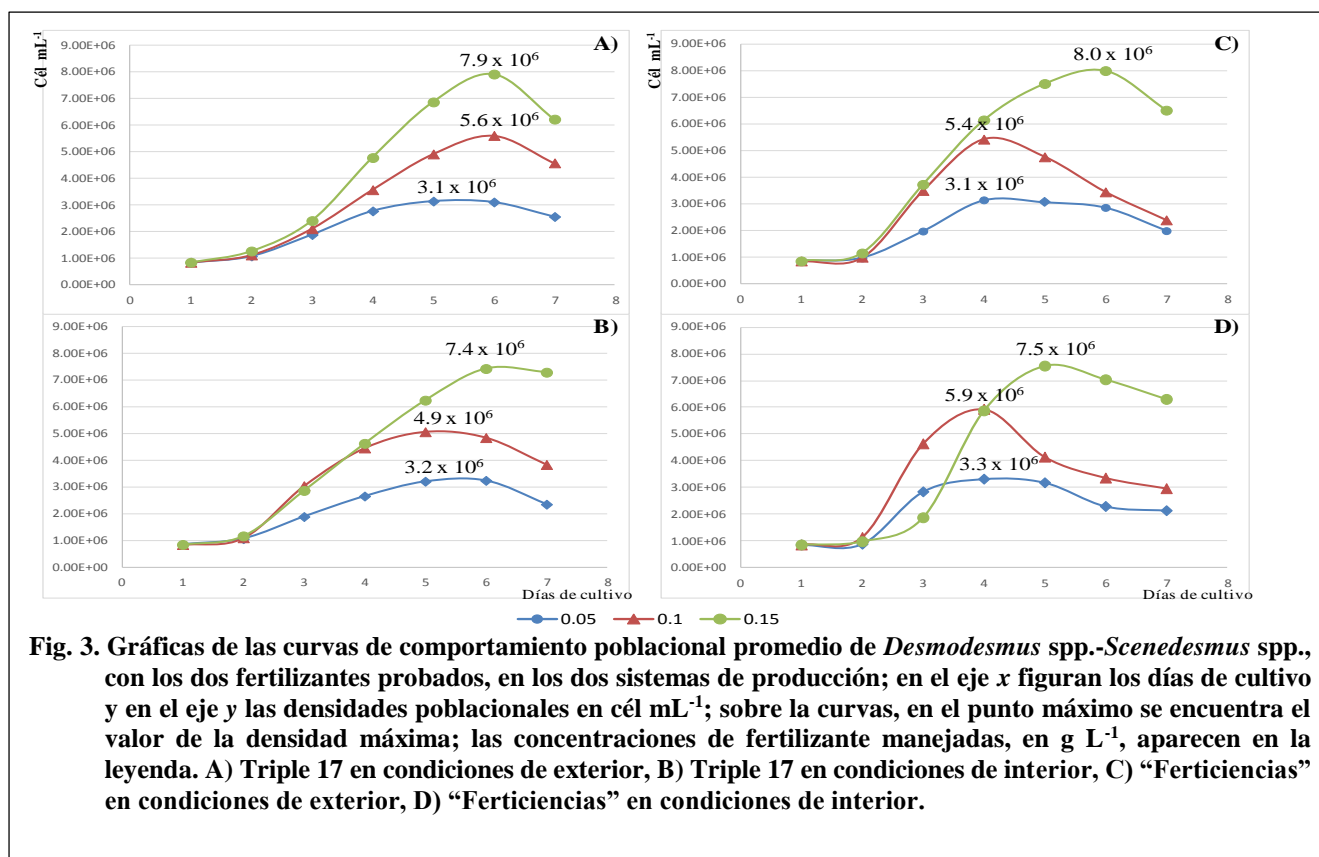


Fig. 3. Gráficas de las curvas de comportamiento poblacional promedio de *Desmodesmus* spp.-*Scenedesmus* spp., con los dos fertilizantes probados, en los dos sistemas de producción; en el eje x figuran los días de cultivo y en el eje y las densidades poblacionales en cél mL^{-1} ; sobre las curvas, en el punto máximo se encuentra el valor de la densidad máxima; las concentraciones de fertilizante manejadas, en g L^{-1} , aparecen en la leyenda. A) Triple 17 en condiciones de exterior, B) Triple 17 en condiciones de interior, C) “Ferticiencias” en condiciones de exterior, D) “Ferticiencias” en condiciones de interior.

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

sensu lato (*s. l.*), con mayor abundancia de uno o dos géneros; después del cuarto día, uno de éstos acababa siendo el más abundante hasta conformar del 90 al 95 % del total; los géneros predominantes obtenidos en este experimento fueron el complejo de géneros hermanos *Desmodesmus* – *Scenedesmus* (Fig.4).

Tanto en las condiciones en interior como en las de exterior, los tiempos de desarrollo de los cultivos con los fertilizantes y las dosificaciones probados fueron similares (Tabla 1), presentándose respuestas de las poblaciones iniciales y de las establecidas durante el cultivo también semejantes en cuanto al crecimiento y alcance de la densidad máxima, así como en lo respectivo a la predominancia en la composición de géneros y/o especies de clorofitas clorococales *s. l.*

El tiempo de vida de los cultivos, considerado en función del cambio de coloración de los mismos, indicador de que la composición de microalgas había mudado, varió entre 85 y 91 días, permitiendo de 28 a 30 cosechas respectivamente, dependiendo del inóculo inicial. Se verificó por observación en el microscopio óptico que cuando los cambios de coloración en los cultivos pasaban del verde brillante hacia los cafés, azulados, amarillentos oscuros, entre otros, implicaban un cambio en las poblaciones predominantes.

En el diseño e implementación de los sistemas productivos se consideraron los requerimientos fundamentales para una adecuada producción fotosintética de las microalgas: disponibilidad de nutrientes, mezcla continua e iluminación. El aporte de nutrientes se efectuó a través de la fertilización. La mezcla permanente, necesaria para la homogenización de los nutrientes y para evitar la sedimentación de las células (Torrentera y Tacon 1989) se consiguió a través de la aireación continua, que permitió además: por un lado mantener las células en movimiento constante, contribuyendo a evitar los efectos de auto-sombreado de las células por la densidad acumulada del medio y la fotoinhibición, debido por el tiempo excesivo de permanencia de las células individuales en un área excesivamente iluminada (Molina-Grima et al. 1996) y por el otro, facilitó el escape del exceso de O₂ producido cuya acumulación tiene un efecto inhibitorio sobre la fotosíntesis (Janssen 2002), al tiempo que favoreció la reincorporación del CO₂ atmosférico hacia el medio evitando que se volviera un factor limitante (Borowitzka 1996). La energía luminosa para la fotosíntesis provino de dos fuentes: iluminación artificial mediante luz fluorescente en el caso del sistema en interior y luz solar en el caso del sistema a la intemperie.

DISCUSIÓN

Eficiencia de los procesos para la producción de microalgas:

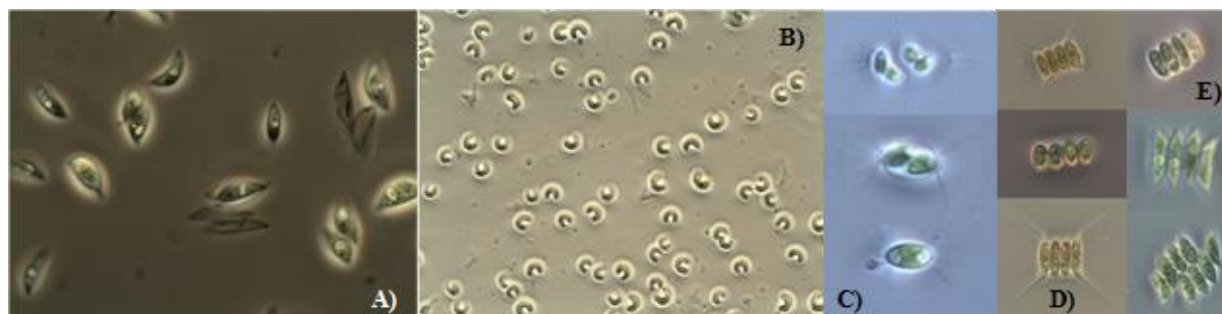


Fig. 4. Imágenes de algunos de los cultivos generados con los sistemas de cultivo descritos. A) *Monoraphidium* sp., B) *Kirchneriella* sp., C) *Lagerheimia ciliata*, D) *Desmodesmus* spp. E) *Scenedesmus* spp.

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

De acuerdo con los conteos de densidad (cél mL^{-1}) de los cultivos, en general los resultados obtenidos en los cultivos de interior no son muy diferentes de los mostrados por los cultivos al exterior. No obstante que los primeros tuvieron iluminación artificial las 24 h del día, mientras que los segundos estuvieron sometidos a iluminación y fotoperiodo naturales (tiempos de exposición más cortos), presentaron crecimiento semejantes, relacionado con la calidad de la energía luminosa disponible. Los dos tipos de clorofila presentes en las clorofitas: la clorofila *a* (Cl-*a*) y la clorofila *b* (Cl-*b*) tienen dos picos de absorción, uno en la región roja y otro en la violeta del espectro electromagnético, siendo a 663 y 430 nm, y a 645 y 435 nm respectivamente (Lee 2008). A pesar del tiempo de exposición más corto, la luz solar fue aparentemente más favorable que la artificial para la producción fotosintética, debido a la gama de longitudes de onda disponibles.

El espectro de emisión de la luz blanca fría de las lámparas utilizadas, si bien abarca casi completamente el espectro luminoso de la luz de día, tiene picos de emisión en aproximadamente los 586, 558, 440 y 406 nm, mostrando una emisión débil en el resto del espectro (Philips 2015). Las longitudes de onda de estos picos de emisión no coinciden con las de los picos de absorción de las clorofilas *a* y *b*, lo que permite inferir que tal desfase incide en una menos eficiente captación de la energía luminosa disponible y, por tanto, en una menor producción fotosintética, no obstante la iluminación constante en este experimento.

Kommareddy y Anderson (2003), en un estudio sobre la calidad de la luz en un foto biorreactor, como un parámetro en el crecimiento poblacional de las algas, evaluaron la eficiencia de seis diferentes fuentes de energía radiante, entre ellas lámparas fluorescentes de luz fría, incandescentes, de halógeno y LEDs (*light emitting diodes*), encontrando que la intensidad y el porcentaje de luz con respecto al total emitido, en el rango de longitudes de onda favorables para la fotosíntesis de algas verdeazules y clorofitas (entre 400-500 nm y 600-700 nm) a 2.4 m de distancia de la fuente de luz, es de 45.65 % para la luz fría fluorescente; en comparación, el porcentaje respectivo para las

lámparas incandescentes es de 4.28 % y para las lámparas de LEDs de alta y media densidades (643 nm) es de 98.38 y 98.42 % respectivamente. Esto se refleja en una mayor eficiencia de la actividad fotosintética y por lo tanto una mayor producción de biomasa en esta última fuente de iluminación con respecto a las otras fuentes. Esta información es congruente con lo observado en este trabajo.

Es también importante señalar que el crecimiento y la división celular son afectados por la intensidad de la luz y el fotoperiodo o proporción de horas de iluminación y oscuridad (Torrentera y Tacon 1989). El fotoperiodo que alterna fases de luz/oscuridad es necesario para un adecuado crecimiento de algunos tipos de microalgas. La iluminación intensa y/o continua, que por principio podría estimular la fotosíntesis, puede ser un factor de estrés metabólico para muchas especies. Para implementar cultivos de microalgas suele asumirse que el uso de iluminación prolongada produce crecimientos rápidos. No obstante, también es de considerarse que un fotoperiodo con lapsos de luz y oscuridad semejantes al fotoperiodo solar, mantiene un crecimiento normal y saludable de las poblaciones de microalgas (Torrentera y Tacon 1989), ya que permiten la recuperación o descanso metabólico de los organismos. Cuando hay aumento en la intensidad de la energía luminosa o en el tiempo de exposición a ella, se presentan mecanismos de auto-protección celular. Por ejemplo comportamientos de fotofobia con desplazamiento hacia regiones menos iluminadas, o aumento en la producción de pigmentos accesorios (Lee 2008).

Cuando tales mecanismos son insuficientes para aminorar el estrés metabólico, como ocurre en un foto biorreactor, se presenta la foto inhibición o cese de la actividad fotosintética por sobresaturación del aparato fotosintético, pudiendo ocurrir daño celular (Molina-Grima et al. 1996) que, si bien no es irreversible, resulta en una disminución del crecimiento poblacional y, por tanto, en una menor productividad del cultivo. En el caso de los cultivos de interior, la foto inhibición causada por la iluminación continua pudo haberse sumado al efecto de eficiencia no óptima del tipo de luz utilizada, resultando en un crecimiento poblacional que no

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

presentó diferencias significativas con respecto a los cultivos de exterior.

Lo anteriormente mencionado es congruente con el comportamiento en la coloración de los cultivos, que fue muy diferenciado entre ambos experimentos (interior y exterior). En los cultivos al exterior el aspecto verde brillante era muy intenso durante cuatro a cinco días antes de pasar a los tonos verde-amarillentos que indicaban la senescencia de la población (que no la sucesión), mientras que en los de interior la coloración verde era pálida y duraba un tan solo tres a cuatro días. Estas coloraciones pueden asociarse con la condición de “salud” de los cultivos en los distintos ambientes de producción si se considera, como en las plantas, la coloración verde brillante intenso, un indicador de “bienestar” en este tipo de organismos fotosintéticos, entonces los cultivos de exterior, sujetos a fotoperiodo solar y probablemente sin estrés por la duración y/o la intensidad luminosa, vendrían siendo más saludables.

Es notorio que, no obstante la mayor regularidad de las condiciones de temperatura e iluminación en los cultivos de interior, el tiempo de vida del cultivo antes de la sucesión biológica fue muy semejante entre ambos experimentos, por lo que, aun cuando los ambientes de cultivo en interior requieren una inversión económica mayor que los de exterior, en esta serie de experimentos mostraron ser sólo ligeramente más exitosos que los segundos (Tabla 1, Fig. 3).

Efecto de selección del tipo de fertilizante y de las condiciones de cultivo.

En todos los cultivos producidos se desarrollaron poblaciones de algas verdes unicelulares o cenobiales cuya composición mixta presentaba predominancia (> 90%) de uno o dos géneros y/o especies. Las poblaciones producidas en el experimento aquí descrito pertenecieron a los géneros hermanos *Desmodesmus-Scenedesmus*. Dos especies de este último género: *S. obliquus* y *S. quadricauda* son reportadas por Becker (2013) como de uso común en acuicultura como alimento para zooplancton de agua dulce, rotíferos marinos y

Artemia. Al respecto del género *Desmodesmus* no se encontró información al respecto.

En otros bloques experimentales trabajados con inóculos procedentes de la misma o distintas fuentes de aguas superficiales, empleando los mismos o distintos fertilizantes, se obtuvieron resultados similares en lo respectivo al comportamiento de los cultivos que, después del cuarto día y a lo largo de su tiempo de vida útil, estuvieron conformados por clorofitas clorococales *s. l.*, mostrando predominancia (> 90% de cél mL⁻¹) de algas pertenecientes a los taxones: *Franceia* sp. Lemmermann, 1898, *Golenkinia radiata* Chodat, 1894, *Kirchneriella* sp. Schmidle, 1893, *Lagerheimia ciliata* (Lagerheim) Chodat 1895 y *Monoraphidium* sp. Komárková-Legnerová, 1969 (Fig. 4), alcanzando densidades de entre 4 x 10⁶ cél mL⁻¹ hasta 9.7 x 10⁶ cél mL⁻¹. Estos cultivos fueron probados eficientemente como alimento para producir rotíferos y ciliados dulceacuícolas también extraídos de aguas naturales.

Los procedimientos y las condiciones de cultivo probados, favorecieron el crecimiento de algas adecuadas como alimento para la producción de organismos zooplanctónicos, con la ventaja de su baja o nula presencia de sustancias tóxicas para animales acuáticos. Considerando que el comportamiento general descrito para el experimento detallado en este estudio se ha repetido en los otros bloques experimentales mencionados, se observa un cuerpo de procedimientos repetibles y replicables con resultados semejantes, que respaldan la posibilidad de que sean implementados en otros contextos con resultados favorables.

Eficacia de los fertilizantes y sus concentraciones.

Los dos fertilizantes utilizados y sus respectivas concentraciones dieron resultados convenientes al generar una producción de microalgas con densidades apropiadas para usarse como alimento. La diferencia en este aspecto entre los dos tipos de sistemas implementados no es muy notoria y se explica en función de la calidad de la irradiación. Con respecto a la producción de biomasa de microalgas de agua dulce afines a las producidas en este trabajo,

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

reportada por otros autores, se encontró que Andrade et al. (2009) obtuvieron densidades de *Scenedesmus* sp. de $8.05 \pm 0.55 \times 10^6$ cél mL⁻¹ y $7.39 \pm 0.18 \times 10^6$ cél mL⁻¹ en cultivos fertilizados con agua residual de pescadería y Nitrofoska Foliar (5 mL L⁻¹), respectivamente, realizados en condiciones de iluminación y fotoperiodo naturales. Por su parte, Toyub et al. (2008) reportan densidades máximas en el décimo día del cultivo de *Scenedesmus obliquus*, de 9.7, 8.32, 6.52 y 5.12×10^6 cél mL⁻¹ en medio fertilizado con desechos de una fábrica de caramelos en concentraciones de 2.5, 2.0 and 1.5 % respectivamente, y de 13.63×10^6 cél mL⁻¹ en el control con Medio Bold Basal. Eustance et al. (2013) reportan densidades celulares obtenidas para *Scenedesmus* sp. de 2×10^6 cél mL⁻¹ en el cuarto día de cultivo, y de 11.5×10^6 cél mL⁻¹ al octavo día de cultivo, utilizando en el primer caso amonio y en el segundo nitrato y urea como fuentes de nitrógeno, cultivando en un foto-biorreactor tubular cerrado con 5% de burbujeo de CO₂. Las densidades obtenidas en este trabajo concuerdan en el límite superior con las reportadas por Andrade et al. (2009); coinciden con varias de las reportadas por Toyub et al. (2008) y, no obstante el sofisticado sistema de cultivo usado por Eustance et al. (2013), coinciden con las obtenidas por ellos en el medio fertilizado con amonio, mientras que las de los medios fertilizados con nitrato y urea se encuentran muy por encima de las aquí generadas.

En lo concerniente a las concentraciones remanentes de compuestos nitrogenados al momento de la cosecha: nitritos (NO₂), nitratos (NO₃) y amonio (NH₄), Camargo y Alonso (2007) reportan que la concentración letal 50 % a las 96 h (CL50-96 h) de compuestos nitrogenados para animales acuáticos relativamente sensibles, se presenta con las siguientes dosis: NO₂: 0.01 mg L⁻¹ para el salmónido *Oncorhynchus mykiss*, hasta 10.9 mg L⁻¹ para el molusco *Planorbella trivolvis*; NO₃: 17 mg L⁻¹ para el anuro *Pseudacris triseriata*, hasta 269.5 mg L⁻¹ para el tricóptero *Hydropsyche exocellata*; NH₄: 0.08 mg L⁻¹ para el salmónido *Oncorhynchus gorbuscha*, hasta 0.65 mg L⁻¹ para el anfípodo *Echinogammarus toletanus*. No se encontraron datos específicos sobre la tolerancia a las concentraciones de compuestos

nitrogenados de especies de rotíferos y cladóceros, pero si se toman como referencia las reportadas para otros animales con el fin de minimizar las pérdidas por ensayos infructuosos, puede decirse que únicamente el uso del T-17 en la concentración de 0.15 g L⁻¹ presenta riesgo de toxicidad, mientras el resto de los ensayos no presenta riesgo alguno.

En cuanto al tiempo de vida del cultivo, mostraron ser un poco más longevos los generados con T-17 que los crecidos con “Ferticiencias”; esto pudo deberse a la diferencia en las concentraciones iniciales de nutrimentos entre los dos fertilizantes que, hacia el tiempo de cosecha, se evidencia en la mayor concentración de compuestos nitrogenados remanentes del primero con respecto al segundo en la dosis de 0.15 g L⁻¹. En el caso del T-17, la sucesión pudo haber sido más lenta a causa de que tales concentraciones de nutrimentos eran suficientemente tóxicas como para impedir la proliferación de organismos heterótrofos como protozoarios del tipo de ciliados y amibas, y de rotíferos oportunistas de pequeño tamaño; la sucesión en estos cultivos invariablemente se debió a la proliferación de cianofitas, mientras que en los cultivos generados con “Ferticiencias” la sucesión y el consecuente término de la vida útil del cultivo se debió a la proliferación excesiva de pequeños heterótrofos oportunistas y de cianofitas.

De acuerdo con Chaumont (1993), comparar la productividad entre distintos sistemas de cultivo masivo de microalgas es difícil debido a que factores como las diferentes ubicaciones geográficas, las estrategias de cultivo (*e. g.* por lotes, semi-continuos y continuos), las distintas especies de algas, y otros, afectan de manera imponderable la producción de la biomasa. No obstante, los dos sistemas probados en este trabajo, a pesar de sus diferencias fundamentales en cuanto a tipo de iluminación y duración del fotoperiodo, y demás variables inherentes a su condición de desarrollo en interior/exterior, mostraron resultados muy semejantes y, por tanto, eficiencias semejantes y adecuadas como sistemas de producción susceptibles de ser transferidos para su uso hacia los productores, en su condición actual.

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

CONCLUSIONES

Los procedimientos de bajo costo para la producción de microalgas de agua dulce en condiciones de interior y de exterior descritos en este trabajo son sencillos de implementar y operar. Las densidades poblacionales de los cultivos, obtenidas en tiempos relativamente cortos, y la ausencia de toxicidad al momento de la cosecha, acreditan la viabilidad de los sistemas y los procedimientos usados como modos de producción de alimento vivo primario.

Los fertilizantes utilizados, junto con las condiciones de cultivo, favorecieron el crecimiento de clorofitas clorococales *s. l.* con predominancia de uno o dos géneros y/o especies, apropiados como alimento para la producción de organismos zooplanctónicos.

Los tiempos estimados de desarrollo de la densidad poblacional óptima para la cosecha, las condiciones del mantenimiento en forma semi-continua y la duración funcional del cultivo, facilitan su implementación en granjas de pequeñas a medianas, permitiendo tomar las previsiones necesarias para establecer un escalamiento de cultivos que sostengan una producción continua de alimento vivo que, a su vez, permita programar la producción y crianza de larvas.

Es deseable afinar las tecnologías considerando y evaluando en experimentos posteriores el papel de la foto inhibición, el del espectro de emisión de la fuente de luz utilizada (probando el efecto con el uso de las lámparas fluorescentes especiales para jardines, terrarios y acuarios plantados, o el de lámparas de LEDs) y el de la temperatura. Sin embargo, en el estado actual de desarrollo de los procedimientos, puede efectuarse la transferencia tecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade R C E, A L Vera, C H Cárdenas y E D Morales. 2009. Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de

pescadería. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. Vol. 32, Nº 2, 126 – 134.

Becker E W. 2013. Microalgae for Aquaculture: Nutritional Aspects. In: Richmond A and Q Hu (eds.). 2013. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2th ed. Wiley-Blackwell. P. 671-691.

Borowitzka M A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology 70:313–321.

Camargo JA y A Alonso. 2007. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. Ecosistemas 16 (2): 98-110.

Dhert P, G Rombaut, G Suantika, P Sorgeloos. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. Aquaculture. 200:129–146.

Eustance E, R D Gardner, K M Moll, J Menicucci, R Gerlach & B M Peyton. 2013. Growth, nitrogen utilization and biodiesel potential for two chlorophytes grown on ammonium, nitrate or urea. J. Appl. Phycol. 25:1663–1677.

Helm M, N Bourne. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero: Un manual práctico. FAO, Documento Técnico de Pesca 471. Roma. 206 p.

Janssen M. 2002. Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 184 p.

Kommareddy A & G Anderson, 2003. Study of Light as a parameter in the growth of algae in a Photo-Bio Reactor (PBR). ASAE Meeting Presentation Number: 034057. ASAE Annual International Meeting. Las Vegas, Nevada, USA.

Leavens P, P Sorgeloos. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. Roma. 295 p.

Lee R E. 2008. Phycology. 4th ed. Cambridge University Press. 547 p.

Lim L, C P Dhert, P Sorgeloos. 2003. Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. Aquaculture, 227:319–331.

Malgas. 2013. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. Malgas, Oportunidades Empresariales Alrededor de las Microalgas en el Mar Cantábrico. Acción gratuita cofinanciada por el FSE. AST ingeniería. Gijón, Asturias. 68 p.

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.

- Martínez M J, C F Espinosa. 1994. A laboratory-scale system for mass culture of freshwater microalgae in polyethylene bags. *Journal of Applied Phycology*. 6(4):423-425.
- Molina-Grima E, J M Fernández Sevilla, J A Sánchez Pérez & F García Camacho. 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology* 45:59-69.
- Philips. 2015. Lámparas fluorescentes. 'TL'D Colores Standard. Disponible en línea, en: http://www.silheriluminacion.com.ar/luces/philips/sp_lamps_fluo_tldstandard.pdf, consultado el 08/07/2015.
- Polanco E. (Dir. y Coord.), 1999. La acuicultura: Biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial. Tomo I: Análisis del desarrollo de los cultivos: medio, agua y especies. Fundación Alfonso Martín Escudero, España. 246 p.
- Ramírez Martínez C, R Mendoza-Alfaro y C Aguilera-González. 2010. Estado actual y perspectivas de la producción y comercialización de peces de ornato de agua dulce en México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto Nacional de Pesca. México. 116 p.
- Torrentera Blanco L y A G J Tacon. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Una diagnosis. FAO, Brasil. 90 p.
- Toyub M A, M I Miah, M A B Habib and M M Rahman. 2008. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. *Bang. J. Anim. Sci.* 37(1):86 – 93.

Cultivo de microalgas interior-exterior

Cruz-y-Cruz I, Sánchez-Ceballos EE, Ocampo-Cervantes JA, Castro-Mejía J, Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía G.