


RESUMEN de la tesis de María del Pilar Sánchez Saavedra presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en OCEANOLOGIA con opción en ECOLOGIA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Julio de 1989.

DISEÑO DE UN BIODIGESTOR AEROBICO DE ALIMENTACION PERIODICA  
Y UTILIZACION DE LOS NUTRIENTES PRODUCIDOS PARA EL  
CULTIVO DE MICROALGAS

Resumen aprobado por:

  
Dr. Luis Fernando Buckle Ramírez  
Director de Tesis

Como una forma alternativa de producir nutrientes para el cultivo de microalgas, se diseñó y construyó un sistema de biodigestión aeróbica, con alimentación y producción periódica de nutrientes a partir de productos orgánicos. Los productos ensayados fueron: excretas de gallina, excretas de vaca y la macroalga Macrocystis pyrifera (L.) C. Agardh.

Para cada biodigestor se probaron diferentes porcentajes de carga (2, 5, 10 y 20 por ciento). Los criterios para seleccionar los porcentajes más adecuados fueron: el funcionamiento mecánico del biodigestor, una adecuada razón de nitrificación y la estabilidad de las variables de nitrificación (amonía, nitritos y nitratos) y de la razón de carga (DBO y DQO) durante la etapa de alimentación periódica. Los porcentajes de carga seleccionados fueron: excretas de gallina, 5 por ciento; excretas de vaca y M. pyrifera 10 por ciento. En los tres casos con la determinación de las fluctuaciones de las variables de nitrificación y de razón de carga se establecieron tres etapas: la etapa inicial principió con la primera adición de material y se caracterizó por la rapidez de los procesos microbiológicos; al final de esta etapa comenzó la incorporación regular de nuevo material, que inicialmente resultó en un período de adaptación de las poblaciones bacterianas (etapa de transición) y en una alta variabilidad de los parámetros medidos. Finalmente los sistemas se estabilizaron, en tasas constantes de nitrificación (etapa periódica).

El balance de nitrógeno inorgánico se estimó con la secuencia de nitrificación, en cada uno de los sistemas de biodigestión, cuyo comportamiento básico corresponde a un sistema de filtración biológica (tratamiento secundario de las aguas residuales), que termina en un balance negativo entre líquido influente y efluente.

En una serie de bioensayos con recipientes de volumen progresivamente mayor, se evaluó un medio de cultivo para crecer microalgas formulado a partir de los productos de la biodigestión y no se encontró una diferencia significativa en el crecimiento de Pavlova (Monochrysis) lutheri (Droop) Green, cultivada con el medio orgánico y con el medio químico empleado como control.

El contenido inicial de nitrógeno inorgánico del medio de cultivo orgánico experimental es casi 30 veces inferior a la concentración del nitrógeno celular calculado para la biomasa producida al final de la etapa exponencial de crecimiento de las microalgas, lo que revela la existencia en el medio de cultivo experimental de una fuente alternativa de nitrógeno accesible a las microalgas.

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA MARINA

DISEÑO DE UN BIODIGESTOR AEROBICO DE ALIMENTACION PERIODICA  
Y UTILIZACION DE LOS NUTRIENTES PRODUCIDOS PARA  
EL CULTIVO DE MICROALGAS

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios  
para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS presenta:

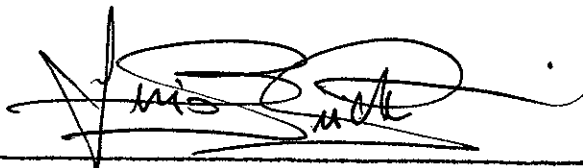
MARIA DEL PILAR SANCHEZ SAAVEDRA

Ensenada, B.C., Julio de 1989.

---

TESIS DEFENDIDA POR: MARIA DEL PILAR SANCHEZ SAAVEDRA

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE:



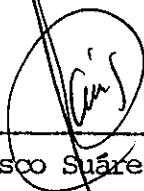
Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, Director del Comité



M.C. Blanca Claudia Farfán, miembro del Comité



Dr. Domenico Voltolina Lobina, Miembro del Comité



M.C. Francisco Suárez Vidal, Miembro del Comité



M.C. Gilberto Gaxiola Castro, Jefe del Departamento de Ecología



Dr. José Rubén Lara Lara, Director de la División de Oceanología



Dr. Héctor Echavarría Heras, Director Académico Interino

Julio 06, 1989

DEDICATORIA

a mi hija

a mi compañero

El tiempo es más complejo cerca del mar  
que en cualquier otro lugar, porque además  
del ciclo del sol y el cambio de las estaciones,  
las olas imprimen con sus golpes el paso del tiempo  
sobre las rocas y las mareas ascienden y descienden  
como una gran clepsidra (Steinbeck, 1947).

---

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, por su ayuda y asesoramiento en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Domenico Voltolina, por su continua ayuda, apoyo y asesoramiento en este trabajo.

A los sinodales M.C. Blanca Claudia Farfán, M.C. Franciso Suárez Vidal y al Dr. Domenico Voltolina, por sus valiosas observaciones y sugerencias durante la elaboración de este trabajo.

A mi técnico particular, que a pesar de todos estos años todavía no pide sabatico: gracias Guillermo.

Al P.O. Salvador Sánchez por su asesoría en las determinaciones bioquímicas.

A los dibujantes: Jose María Dominguez Olachea, Fabian Cabrera y Tito Armando Valdez Lopez por su valiosa ayuda en la elaboración de las figuras y tablas.

A la Sra. Felicitas Montejano por su incondicional disposición a ayudar en todo momento.

A Eloisa Talavera y al personal del Centro de Cómputo del C.I.C.E.S.E.

A mis compañeros: Teresa Gutierrez Wing, Jose Antonio Lopez Elias, Beatriz Cordero y Francisco Correa por su constante apoyo.

A todo el personal de la Guardería infantil del C.I.C.E.S.E.: Sara, Angelina, Tere, Magui, Lupe, Guadalupe, Blanca, Angelina\* y a la Sra. Ana Lopez, quienes hicieron el papel de "mamas" para Teresa mientras me dediqué a esta tesis.

A Amparo y Lew Riley quienes me brindaron apoyo moral y económico durante este período.

A mi Madre y Hermanos.

Al C.O.N.A.C.Y.T. y al C.I.C.E.S.E. por haberme otorgado becas para mis estudios de postgrado.

A quienes nunca me abandonaron: Campbell's, Lipton, Huggies, Beach Nuts y ese fiel abrelatas que nunca se cansó.

## CONTENIDO

	<u>Páginas</u>
I. INTRODUCCION	1
I.1. Antecedentes	4
II. METODOS Y MATERIALES	12
II.1. Diseño del biodigestor	12
II.2. Colecta de la materia prima	18
II.3. Pruebas del balance de carga orgánica	20
II.4. Preparación del medio de cultivo	26
II.5. Bioensayos de crecimiento	27
II.6. Análisis estadístico	31
III. RESULTADOS	35
III.1. Carga orgánica	35
III.1.a. Biodigestor que funcionó con excretas de gallina	35
III.1.b. Biodigestor que funcionó con excretas de vaca	45
III.1.c. Biodigestor que funcionó con macroalga	54
III.2. Sólidos recuperados en el sistema de remoción	62
III.3. Balance de nitrógeno inorgánico	65
III.4. Bioensayos de crecimiento	65
III.5. Análisis estadístico	77
IV. DISCUSION	86
V. CONCLUSIONES	108
VI. RECOMENDACIONES	111
LITERATURA CITADA	112

---

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figuras</u>	<u>Páginas</u>
1. Sistema de biodigestor aeróbico periódico.	13
2. Sistema de remoción de sólidos (S.R.S.). a. Posición abierta para la colecta de sólidos. b. Sistema cerrado para la evacuación de sólidos.	15
3. Variación de los compuestos de nitrógeno en el digestor alimentado con excretas de gallina. Amonia: * ; nitritos: ●; nitratos: o . Los datos punteados se refieren al influente, los unidos con trazo continuo al efluente.	40
4. Variación de la demanda biológica (DBO: ●) y química (DQO:Δ) de oxígeno (en mg/l) y la razón DBO/DQO ( * ), para el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con excretas de gallina.	41
5. Variaciones de la temperatura, oxígeno, pH y flujo, en el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo), del digestor que funcionó con excretas de gallina.	42
6. Variación de los compuestos de nitrógeno en el digestor alimentado con excretas de vaca. Amonia: * ; nitritos: ● ; nitratos: o . Los datos punteados se refieren al influente, los continuos al efluente.	49



LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<u>Figuras</u>	<u>Páginas</u>
7. Variación de la demanda biológica (DBO: ●) y química (DQO:Δ) de oxígeno (en mg/l) y la razón DBO/DQO ( * ), para el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con excretas de vaca.	50
8. Variación de la temperatura, oxígeno, pH y flujo, en el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con excretas de vaca.	51
9. Variación de los compuestos de nitrógeno en el digestor alimentado con macroalga. Amonia: * ; nitritos: ● ; nitratos: o . Los datos punteados se refieren al influente, los continuos al efluente.	57
10. Variación de la demanda biológica (DBO: ●) y química (DQO:Δ) de oxígeno (en mg/l) y la razón DBO/DQO ( * ), para el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con macroalga.	58
11. Variación de la temperatura, oxígeno, pH y flujo, en el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con macroalga.	59
12. Curvas de crecimiento de <u>P. lutheri</u> en el medio químico (trazo continuo) y en el medio orgánico (trazo punteado), cultivadas en Erlenmeyer (A), Fernbach (B), Carboy (C) y Tanque (D). Cultivos con agua de mar sin enriquecer en los Erlenmeyer (E:Δ) y los Fernbach (E:*).	68

## LISTA DE TABLAS

<u>Tablas</u>		<u>Páginas</u>
I.	Composición proximal del alimento consumido por las gallinas en la granja avícola "Vista del Mar", durante el período de colecta de las excretas de gallina.	19
II.	Composición porcentual de algunos estiércoles (tomado de Porras, 1981).	21
III.	Resultados obtenidos con los diferentes porcentajes de carga ensayados, para los tres tipos de producto utilizados en los sistemas de biodigestión.	36
IV.	Pruebas de Beta (significancia de las pendientes de las líneas de regresión) para las variables medidas en el influente del biodigestor que funcionó con excretas de gallina. Nivel de decisión $\alpha \leq 0.05$ .	37
V.	Promedios y varianzas, de las variables medidas en el influente (A) y el efluente (B) durante la etapa periódica, para los tres tipos de productos utilizados en los sistemas de biodigestión. Unidades: flujo en l/min, temperatura en °C. Variables químicas en mg/l. En el caso de la macroalga, las concentraciones de fosfatos resultaron inferiores a los límites de detección del método (N.D.).	39
VI.	Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el efluente durante la etapa inicial (I) de transición (T) y periódica (P) para el biodigestor que funcionó con excretas de gallina.	43

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tablas</u>	<u>Páginas</u>
VII. Pruebas de Beta para las variables medidas en el efluente durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con excretas de gallina. Nivel de decisión $\alpha \leq 0.05$ .	43
VIII. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el influente (I) y el efluente (E) durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con excretas de gallina.	46
IX. Pruebas de Beta para las variables medidas en el influente para el biodigestor que funcionó con excretas de vaca. Nivel de decisión $\alpha \leq 0.05$ .	47
X. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el efluente durante la etapa inicial (I) de transición (T) y periódica (P) para el biodigestor que funcionó con excretas de vaca.	47
XI. Pruebas de Beta para las variables medidas en el efluente durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con excretas de vaca. Nivel de decisión $\alpha \leq 0.05$ .	53
XII. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el influente (I) y el efluente (E) durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con excretas de vaca.	53
XIII. Pruebas de Beta para las variables medidas en el influente para el biodigestor que funcionó con macroalga. Nivel de decisión $\alpha \leq 0.05$ .	55

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tablas</u>	<u>Páginas</u>
XIV. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el efluente durante la etapa inicial (I) de transición (T) y periódica (P) para el biodigestor que funcionó con macroalga.	55
XV. Pruebas de Beta para las variables medidas en el efluente durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con macroalga. Nivel de decisión $\alpha \leq 0.05$ .	61
XVI. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el influente (I) y el efluente (E) durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con macroalga.	61
XVII. Cantidad de sólidos recuperados por día (en gramos de peso húmedo) en el S.R.S., para los tres sistemas de biodigestión.	63
XVIII. Pruebas de Beta realizadas con la cantidad de sólidos recuperados por día (en gramos de peso húmedo) en el S.R.S., para los tres sistemas de biodigestión, durante la etapa periódica. Nivel de decisión $\alpha \leq 0.05$ .	64
XIX. Valores promedio ( $\times 10^{23}$ ), diferencias (DIF.) de átomos de las diferentes formas de nitrógeno inorgánico y de su total en el influente (I) y el efluente (E), durante la etapa periódica, para los tres sistemas de biodigestión.	66

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tablas</u>	<u>Páginas</u>
XX. Valores promedio, desviación estandard y prueba de diferencia de medias, con el contenido de nitrógeno inorgánico en el influente y el efluente (durante la etapa periódica), en los tres sistemas de biodigestión.	67
XXI. Valores promedio de densidad (cel/ml x 10 <sup>4</sup> ) y parámetros poblacionales calculados para el medio químico (A) y el medio orgánico (B), en un cultivo de <u>P. lutheri</u> en Erlenmeyer. $\mu$ : tasa de crecimiento específico y Tg: tiempo medio de generación.	70
XXII. Valores promedio de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y prueba de diferencia de medias, durante la fase de crecimiento exponencial, así como el tiempo medio de generación (Tg) durante el mismo período, para los diferentes volúmenes de cultivo en el medio químico (A) y el medio orgánico (B).	71
XXIII. Valores promedio de densidad (cel/ml x 10 <sup>4</sup> ) y parámetros poblacionales calculados para el medio químico (A) y el medio orgánico (B), en un cultivo de <u>P. lutheri</u> en Fernbach. $\mu$ : tasa de crecimiento específico y Tg: tiempo medio de generación.	72
XXIV. Valores promedio de densidad (cel/ml x 10 <sup>4</sup> ) y parámetros poblacionales calculados para el medio químico (A) y el medio orgánico (B), en el cultivo de <u>P. lutheri</u> en Carboy. $\mu$ : tasa de crecimiento específico y Tg: tiempo medio de generación.	74

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tablas</u>	<u>Páginas</u>
XXV. Valores promedio de densidad (cel/ml x 10 <sup>4</sup> ) y parámetros poblacionales calculados para el medio químico (A) y el medio orgánico (B), en un cultivo de <u>P. lutheri</u> en Tanques. $\mu$ : tasa de crecimiento específico y Tg: tiempo medio de generación.	75
XXVI. Prueba de validez estadística para un modelo de regresión lineal y significancia de Beta, con las densidades celulares de <u>P. lutheri</u> en los diferentes recipientes y en los dos tipos de medio de cultivo.	78
XXVII. Prueba de Bartlett y ajuste a la distribución normal con los residuos de las densidades celulares de <u>P. lutheri</u> , en los diferentes recipientes y en los dos tipos de medio de cultivo.	79
XXVIII. Análisis de Covarianza con las densidades celulares de <u>P. lutheri</u> , en los diferentes recipientes y en los dos tipos de medio de cultivo.	80
XXIX. Valores promedio, desviación estandar y prueba de diferencia de medias con las densidades celulares de <u>P. lutheri</u> , en Tanques y en los dos tipos de medio de cultivo.	81
XXX. Contenido de nitrógeno y fósforo inorgánico en un Carboy con medio orgánico (A) y medio químico (B).	84
XXXI. Densidad promedio de <u>P. lutheri</u> y contenido de nitrógeno celular, durante la fase de crecimiento exponencial, en el medio químico (A) y en el medio orgánico (B).	85

DISEÑO DE UN BIODIGESTOR AEROBICO DE ALIMENTACION  
PERIODICA Y UTILIZACION DE LOS NUTRIENTES  
PRODUCIDOS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

I. INTRODUCCION

Los cultivos de fitoplancton marino han sido utilizados en la investigación de su ciclo de vida y de sus procesos fisiológicos, en ensayos para medir la producción primaria y los factores que la modifican, como alimento para el hombre y organismos cultivados y como material para la industria médica (farmacéutica) y agrícola (fertilizantes, abonos) (Kinne, 1976; Richmond, 1986).

El alimento convencionalmente utilizado en Acuicultura para la mayoría de los estadios larvales y para algunos adultos de moluscos, crustáceos y peces son las microalgas ya que, a pesar de varios esfuerzos para desarrollar alimentos alternativos (Gabbot et al., 1976; Langdon y Waldock, 1981; Langdon y Siegfried, 1984; Langdon et al., 1985; Laing y Millican, 1986), la práctica acuicultural seguirá dependiendo durante unos años más de la producción de microalgas como alimento vivo ya que hasta el momento ninguna de las formulaciones alternativas garantiza niveles comparables de

---

sobrevivencia y de crecimiento (Droop, 1975a; Laing y Millican, op.cit; Becker, 1986; Laing, 1987; Laing et al., 1987). Es por ésto que se sigue investigando sobre el valor alimenticio de estos microorganismos y sobre posibles técnicas de modificarlo (Parsons et al., 1961; Gallager y Mann, 1982; Wikfors, 1986; Whyte, 1987). Debido a este interés, la literatura sobre el cultivo de microalgas es extensa (Provasoli et al., 1957; Myers, 1962; Mathiessen y Toner, 1966; Stein, 1973) y en continuo aumento. Se han aprovechado en el laboratorio las técnicas de esterilización, aislamiento, manipulación y siembra desarrolladas en bacteriología, y se han desarrollado metodologías para el cultivo masivo hasta niveles industriales (Richmond, op.cit.).

Existen diferentes tipos de medio de cultivo: los químicamente definidos, los de agua enriquecida con productos químicos inorgánicos, y los enriquecidos con productos no convencionales. El uso de uno u otro tipo de medio depende principalmente de los requerimientos nutricionales específicos de la microalga, de los costos de producción y de la facilidad para la preparación (elaboración) del medio de cultivo.

El aprovechamiento de medios de cultivo no convencionales forma parte de las técnicas alternativas que



se han desarrollado para cultivar las microalgas con metodologías que tienen como finalidad la disminución de los costos de producción y la del empleo de productos orgánicos y de desecho. Estos métodos incluyen: utilización de aguas de desecho de tratamientos secundarios (Dunstan y Menzel, 1971; Goldman y Ryther, 1975; Tarifeño-Silva et al., 1982 a y b), de fertilizantes agrícolas (González-Rodríguez y Maestrini, 1984) y de compuestos orgánicos (De la Cruz y Alfonso, 1975).

En esta última categoría, Paniagua-Michel y Bückle-Ramírez (1984), Granados-Machuca y Bückle-Ramírez (1984) y Paniagua-Michel (1984), demostraron la posibilidad de utilizar excretas de gallina, excretas de vaca y macrofitas biodigeridas aeróbicamente en un sistema discontinuo, como una fuente de nutrientes para el cultivo de las microalgas.

Esta investigación tiene como objetivo primario el diseñar un sistema de biodigestión aeróbica de alimentación y producción periódica de nutrientes para el cultivo de microalgas. Los objetivos específicos son:

a) Encontrar la carga orgánica adecuada para que cada biodigestor alimentado individual y separadamente con: excretas de gallina, excretas de vaca y macroalga

(Macrocystis pyrifera (L.) C. Agardh), funcione periódicamente y en forma estable.

b) Probar el crecimiento de la microalga Pavlova (Monochrysis) lutheri (Droop) Green, en un medio de cultivo orgánico elaborado con la mezcla de los biodigeridos de las excretas de gallina, de vaca y de la macroalga, según la formulación propuesta por Paniagua-Michel (1984).

#### I.1. Antecedentes

Existe una gran cantidad de formulaciones de medios de cultivo para las microalgas marinas, desde recetas sencillas basadas en la solución de Miquel (mencionada en Kinne, 1976), hasta mezclas complejas desarrolladas recientemente (Ukeles, 1976). Las fórmulas de medios de cultivo pueden ser completamente definidas químicamente, o estar basadas en agua de mar enriquecida con productos químicos o con extractos de suelos y/o productos orgánicos.

Una de las técnicas alternativas para el cultivo masivo de fitoplancton utilizada en México, es la mezcla llamada "DIX MIX" que sustituye los macronutrientes de una fórmula

tradicional, por fertilizantes comerciales del tipo de los superfosfatos. Sin embargo, es necesario agregar vitaminas que deben ser importadas (Zebal, 1984).

Para cultivar peces en estanques y lagunas, en muchos países se acostumbra utilizar compuestos orgánicos e inorgánicos (fertilizantes agrícolas) con el fin de incrementar la producción primaria del sistema.

El cultivo de algas planctónicas en condiciones semicontroladas con productos orgánicos y con fertilizantes también se ha practicado exitosamente. De la Cruz y Alfonso (1975) demostraron la factibilidad de efectuar cultivos masivos utilizando proporciones definidas de harina de pescado, harina de girasol, levadura de cerveza seca, nitrato de amonio y superfosfatos. Otros autores, como De Pauw et al. (1978) y De Pauw y Leenheer (1979) también lograron una buena producción de fitoplancton marino y de agua dulce en cultivos masivos recurriendo al estiércol de cerdo como fertilizante.

En las décadas de los años sesentas y setentas se inició una serie de trabajos sobre técnicas de remoción de nutrientes en aguas residuales, industriales, urbanas, agrícolas y ganaderas (Ehrlich, 1965; Irgens y Halvorson, 1965; Tenney et al., 1972; Prakasam y Loehr, 1972; Gray y

Biddlestone, 1974; Vavilin et al., 1980; Hopwood y Barnes, 1982). Este tipo de descargas se caracterizan por tener altas cantidades de nutrientes, principalmente nitrógeno, fósforo y carbono orgánico.

Dentro de las técnicas de tratamiento de aguas residuales existen tres procesos básicos: a) Tratamiento primario: en este caso los sólidos son removidos por medio de un sistema de filtración mecánica y sedimentación. b) Tratamiento secundario: los compuestos orgánicos son degradados por procesos biológicos (nitrificación). c) Tratamiento terciario: los compuestos resultantes de los dos procesos anteriores se extraen con métodos físico-químicos o biológicos, ya que su descarga al medio acuático es causa de fenómenos de eutroficación.

El nitrógeno es un nutriente clave que controla el crecimiento del fitoplancton en muchos medios ambientes, principalmente en las aguas costeras (Goldman y Stanley, 1974). Para removerlo de las aguas residuales que desembocan al océano generalmente se utilizan varias técnicas, como: intercambio de iones, degradación térmica, osmosis inversa, lagunas de oxidación, biodegradación (Reeves, 1972; Goldman et al., 1974a) y "Eutroficación controlada" (Ryther et al., 1972). Esta última técnica comprende dos aspectos básicos. En primer lugar, el agua residual que ha sido procesada en un

sistema convencional de tratamiento secundario es diluída con agua de mar para promover el cultivo masivo de microalgas marinas. En segundo lugar, la biomasa de fitoplancton producida puede ser consumida por organismos filtroalimentadores en un sistema de cultivo paralelo. Alternativamente, las microalgas se separan con métodos físicos o químicos, y se utilizan directamente.

Con la eutroficación controlada se puede extraer hasta el 95 por ciento del nitrógeno y del fósforo (Dunstan y Menzel, 1971; Dunstan y Tenore, 1972; Goldman y Stanley, 1974; Goldman et al., 1974 a y b; Goldman y Ryther, 1975; Goldman, 1976; Kawasaki et al., 1982; Tarifeño-Silva et al., 1982 a y b; Gordon et al., 1982).

La producción de alimentos en Latinoamérica se encuentra encaminada hacia el aprovechamiento de todo tipo de recursos naturales. Los desperdicios animales y vegetales que resultan de la actividad agropecuaria y los subproductos derivados de las granjas y de las agroindustrias, son fuentes importantes de recursos. Los desperdicios animales al ser procesados liberan y desdoblan un alto contenido de compuestos nitrogenados y fosfatados que pueden disponerse para otros fines (Porrás, 1981).

Una de las técnicas para la recuperación de nutrientes y

estabilización de desechos es la biodigestión. Esta puede ser anaeróbica y aeróbica. La biodigestión anaeróbica o "metanización", puede ser definida como un sistema de estabilización de la materia orgánica en un medio sin oxígeno a partir de bacterias acidificantes y metanógenas. Este proceso tiene tres etapas básicas: a) licuación de la materia orgánica, b) formación de ácidos volátiles y c) formación de metano (Baquedaño et al., 1979). La ventaja en este tipo de sistema es que los efluentes fermentados son excelentes abonos, debido a que tienen una alta concentración de nutrientes y materia orgánica. Se ha comprobado también que los fertilizantes sólidos del digestor contienen de dos a tres veces más nitrógeno asimilable que los resultantes de cualquier transformación aeróbica (Penagos, 1967). Mediante esta técnica se ha encontrado que para el estiércol de cerdo se puede reducir la DBO (demanda biológica de oxígeno) en un 80 por ciento, la DQO (demanda química de oxígeno) en un 50 por ciento y la concentración de ácidos grasos hasta un 100 por ciento. También se logra la eliminación de olores desagradables. Este tipo de sistema, en lugar de requerir energía para el proceso, genera gases como resultado de la fermentación (hasta un 70 por ciento como gas metano) (Young et al., 1983). La desventaja principal de los sistemas anaeróbicos es que requieren una infraestructura específica para su operación: sistemas herméticamente cerrados, gasómetros, termostatos, una fuente permanente de materia

orgánica y otros.

La digestión aeróbica se define como la destrucción de sólidos orgánicos degradables a partir de mecanismos biológicos aeróbicos (Adams et al., 1974). Esta es una técnica utilizada en el tratamiento de aguas residuales, en donde los compuestos orgánicos complejos son oxidados a productos orgánicos e inorgánicos terminales estables (Brody, 1979).

Las ventajas de la digestión aeróbica comparada con la anaeróbica son su bajo costo y el hecho que el residuo resultante es estable, tiene una baja DBO, pocos sólidos en suspensión y el producto es menos oloroso (Loehr, 1965; Brody, op. cit.).

Durante la digestión aeróbica ocurren procesos biológicos intermedios que producen varias formas de nitrógeno. Estos son: a) Amonificación: es el cambio de nitrógeno orgánico a amonio. b) Asimilación: es el uso y transformación de los compuestos orgánicos nitrógenados resultantes de la descomposición de proteínas de plantas o animales. c) Nitrificación: describe la oxidación bioquímica de amonía a nitrito y posteriormente a nitrato. El proceso inverso a este último es la denitrificación, que consiste en la reducción de nitrato o nitrito a nitrógeno

---

gaseoso (Bishop y Farmer, 1978; Wong-Chong y Loehr, 1978).

La nitrificación es un proceso de dos pasos en el cual el amonio se convierte a nitrito y el nitrito a nitrato. El primer paso de esta reacción se lleva a cabo por bacterias autotróficas del género Nitrosomonas y el segundo por las bacterias Nitrobacter. Las bacterias autotróficas tienen tiempos de generación largos en comparación con las heterotróficas (Wheaton, 1977).

Las reacciones de amonificación y nitrificación requieren de ciertas condiciones para que se lleven a cabo adecuadamente. Los principales factores que las afectan son el pH y la temperatura, que deben estar respectivamente entre 7.0 - 8.4 y 5 - 35 °C, y el oxígeno disuelto, cuya concentración debe ser superior a 0.5 mg/l (Bishop y Farmer, op. cit.; Srinath et al., 1976).

En años recientes se ensayaron varios extractos biodigeridos de diferentes fuentes orgánicas como las macrofitas Macrocystis pyrifera y Zostera marina (Paniagua-Michel y Bückle-Ramírez, 1984), estiércoles de vaca y de gallina (Granados-Machuca y Bückle-Ramírez, 1984) y mezclas de los biodigeridos anteriores (Paniagua-Michel, 1984; Paniagua-Michel et al., 1987). Los resultados de estos trabajos indicaron la factibilidad de utilizar los

---



productos de la digestión aeróbica de estas materias primas, y la mezcla de éstos, para promover un crecimiento de microalgas similar al obtenido con medios químicos convencionales.

## II. METODOS Y MATERIALES

### II.1.-Diseño del biodigestor

Se diseñó un modelo de biodigestor aeróbico de alimentación y producción periódica, del cual se construyeron tres estructuras iguales, tomando como base los modelos de alimentación discontinua utilizados por Paniagua-Michel y Granados-Machuca (1981) y Paniagua-Michel (1984).

En la figura 1 se muestra un diagrama del biodigestor diseñado. Este consta de un recipiente cilíndrico de plástico con 28 cm de base y 84 cm de altura, con una capacidad de 200 l, que contiene internamente un recipiente de 15 l de volumen para la materia prima, abierto profusamente con orificios de 2 mm de diámetro en la base y en las paredes (Fig. 1-1). El contenedor interno está situado por medio de tres soportes de plástico igualmente perforados (Fig. 1-2) y fijados sobre el sistema de remoción de sólidos (SRS) (Fig. 1-3).

En la parte interna del recipiente cilíndrico de 200 l se colocó un piso de grava de 2-5 mm de diámetro (Fig. 1-4) con un espesor de 10 cm. En la parte central de la grava se instaló un tubo de "ABS" de 10 cm de diámetro (Fig. 1-5) con

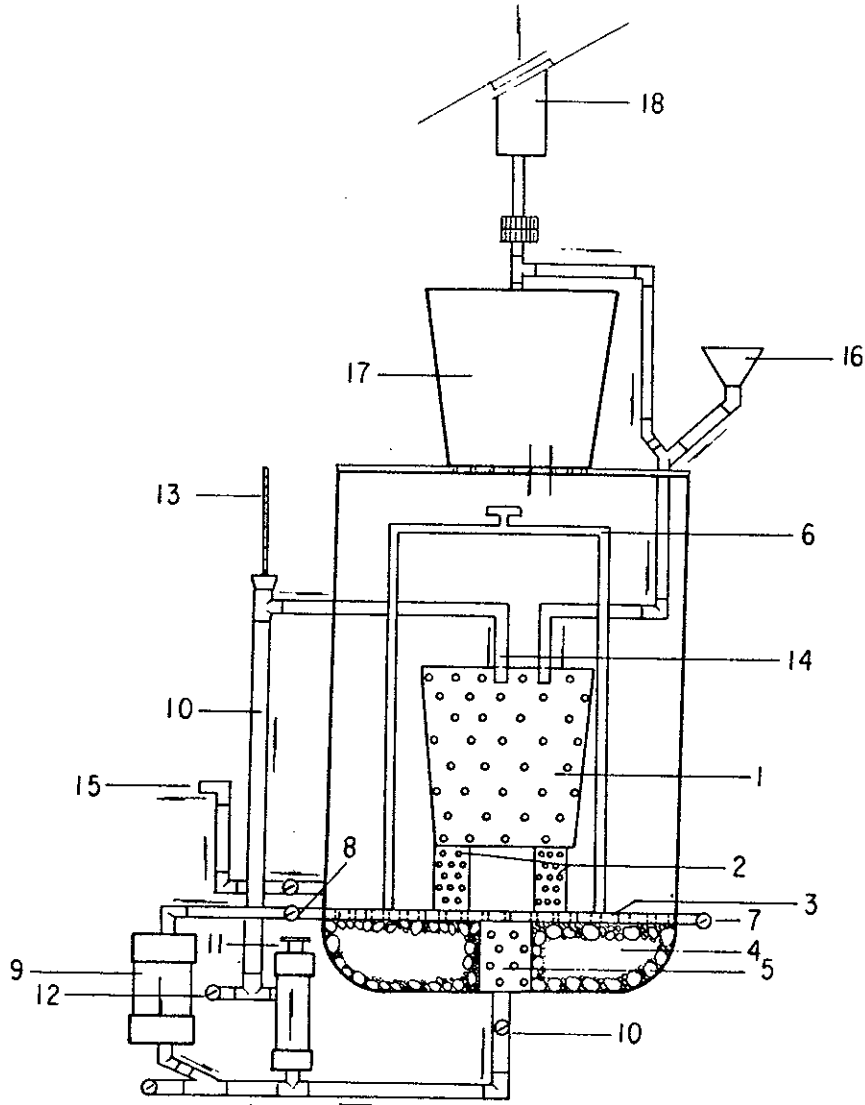


Figura 1. Sistema de biodigestor aeróbico periódico.  
 Las flechas indican el sentido de los fluidos.

1. Recipiente contenedor de la materia prima.
2. Soportes del recipiente contenedor.
3. Sistema de remoción de sólidos.
4. Base con grava.
5. Tubo perforado de "ABS".
6. Manivela del S.R.S.
7. Inyección de aire para el S.R.S.
8. Llave para la colecta de sólidos.
9. Ducto de filtración.
10. Sistema de recirculación.
11. Calentador.
12. Inyección de aire para la recirculación.
13. Termómetro.
14. Retorno del líquido biodigerido.
15. Colecta del líquido biodigerido (efluente).
16. Embudo de alimentación (influyente).
17. Eliminador de espuma.
18. Desfogue de gases.

numerosas perforaciones de diámetro menor al del tamaño de la grava para que el flujo de agua pasara a través de este cilindro.

Sobre el piso de grava se instaló un sistema para la remoción de los sólidos acumulados (SRS) (Figs. 1-3 y 2). Este sistema consiste de tres láminas de acrílico (Fig. 2); de éstas, la lámina inferior (Fig. 2-1) tiene perforaciones de 2 mm de diámetro, la intermedia (Fig. 2-2) y superior (Fig. 2-3) tienen orificios de 2.0 cm. La lámina inferior e intermedia están unidas por una serie de soportes de 2 cm de altura (Fig. 2-4), mientras que en la parte externa los une una pared de goma de neumático de 2.5 cm de altura (Fig. 2-5).

La tercera lámina de acrílico tiene una manivela en forma de "U" invertida (Figs. 1-6 y 2-6) con la cual es posible girar esta superficie. Esto permite disponer de dos posiciones: en la primera (abierto) (Fig. 2a), al hacer coincidir los orificios de las láminas intermedia y superior (Fig. 2-7), es posible coleccionar los sólidos acumulados por sedimentación y por la continua acción mecánica del líquido recirculante sobre la materia prima. En la segunda posición (cerrado) (Fig. 2b), por medio de un giro de la manivela se desplaza la lámina superior hasta un par de topes (Fig. 2-8) donde los orificios de ambas láminas quedan desfasados.

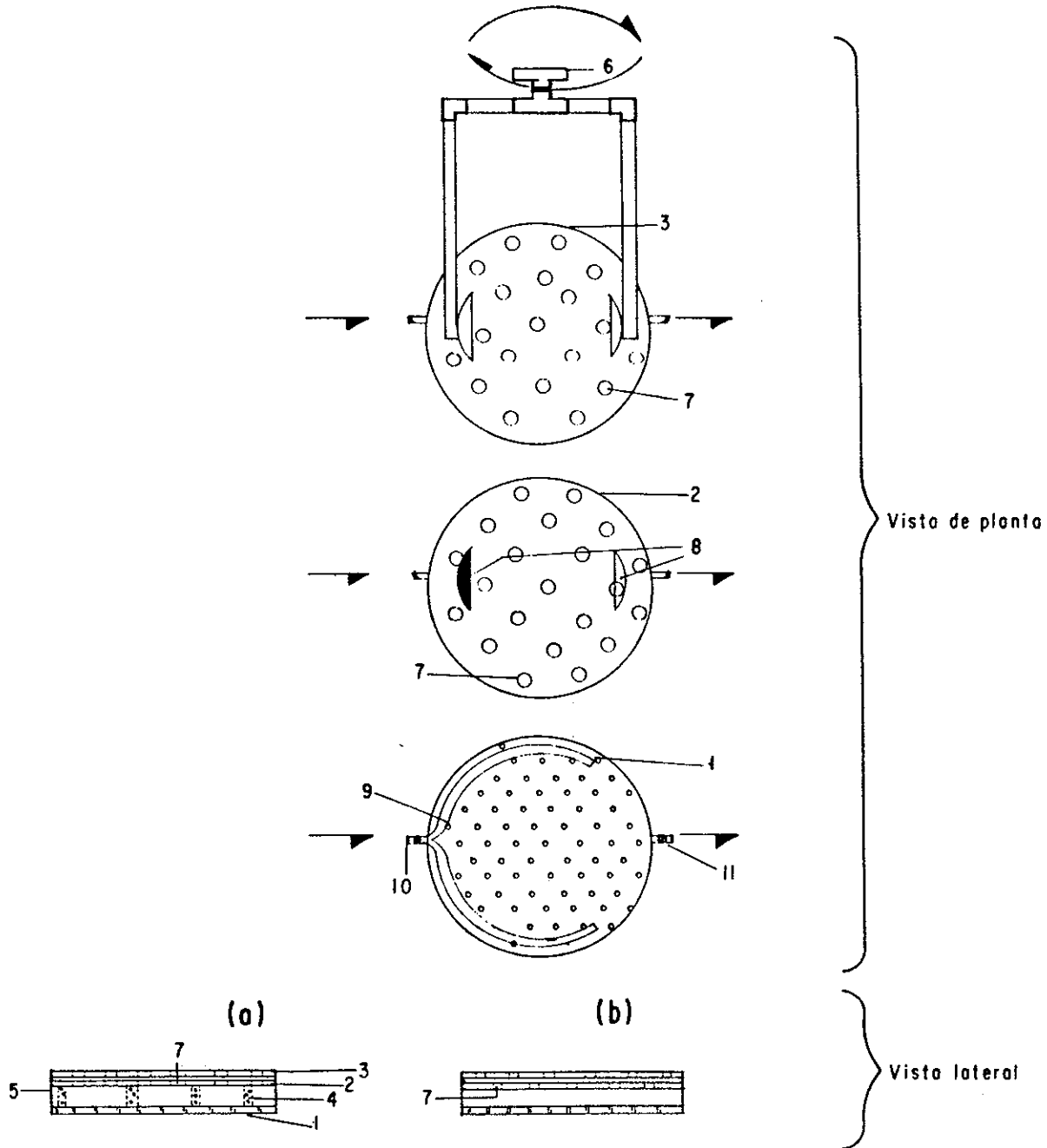


Figura 2. Sistema de remoción de sólidos (S.R.S.).  
 a. Posición abierta para la colecta de sólidos.  
 b. Sistema cerrado para la evacuación de sólidos.

1. Lamina inferior.	7. Orificios para la colecta de sólidos
2. Lamina intermedia.	8. Topes para abertura y cierre.
3. Lamina superior.	9. Manguera con perforaciones.
4. Soportes entre laminas.	10. Entrada de aire.
5. Paredes de goma.	11. Llave para la colecta de sólidos.
6. Manivela para abertura y cierre del S.R.S.	

Entre las láminas inferior e intermedia se instaló una manguera de plástico perforada y en forma de "Y" (Fig. 2-9). La base de esta manguera se unió a una llave de paso conectada con un sistema de inyección de aire a presión (Figs. 1-7 y 2-10). Al abrir esta llave, y al mantener el SRS "cerrado", es posible desplazar los sólidos acumulados y no degradados hasta un extremo y sacarlos por medio de otra llave de paso (Fig. 1-8) conectada a un ducto de filtración (Fig. 1-9), que consta de un tubo de "PVC" de 6.25 cm de diámetro y 25 cm de altura, relleno con algodón plástico, que actúa a manera de criba para retener la fracción sólida y permite que la parte líquida sea reintegrada al biodigestor, por medio del sistema de recirculación (Fig. 1-10).

El sistema de recirculación del líquido (Fig. 1-10) consiste de una línea de tubería de "PVC" de 1.25 cm de diámetro, con una llave de paso que sale de la parte central del piso de grava, que está en el fondo del recipiente de 200 l. Esta línea de recirculación se conecta a un contenedor que aloja un calentador de inmersión (Fig. 1-11) el cual incrementa la temperatura del líquido manteniéndola en el rango adecuado para el proceso de biodigestión. Del contenedor emerge una unión tipo "t", que en un extremo se conecta a una llave de inyección de aire a presión (Fig. 1-12), que tiene la función de desplazar el líquido contenido

hacia el otro extremo de la tubería, siguiendo el principio de impulsión de aire (Wheaton, 1977).

En un extremo de la línea de recirculación se situó un termómetro de escala de 0 a 50 °C (Fig. 1-13) para obtener un registro de la temperatura del proceso. La línea de recirculación descarga el líquido (Fig. 1-14) en la parte interna del recipiente contenedor de la materia prima, ayudando a distribuir el líquido recirculado, a incrementar los niveles de oxigenación necesarios para el proceso de biodigestión y a mantener una acción mecánica continua. Para la colecta del líquido biodigerido se instaló una llave de paso conectada con un sistema de nivel en la parte externa del recipiente de 200 l (Fig. 1-15).

El sistema de biodigestión se mantuvo tapado para evitar pérdidas de líquido y espuma en el proceso de degradación de los materiales y para conservar la temperatura y evitar la dispersión de posibles patógenos presentes en los productos.

De la tapa que cubre el biodigestor sale un ducto que se conecta a un embudo (Fig. 1-16) que sirve para alimentar periódicamente el sistema con la materia prima a tratar, cada determinado intervalo de tiempo. El producto adicionado descarga internamente en la parte central del recipiente contenedor.

Para convertir a líquido la espuma generada en el proceso, se instaló un recipiente con el fondo perforado (25 cm de base y 35 cm de altura, Fig. 1-17) ajustado en un corte circular de la tapa del digestor. La espuma entra al recipiente por las perforaciones y el líquido generado retorna al sistema a través de los mismos.

En la parte superior del eliminador de espuma, un ducto de 7.5 cm de diámetro (Fig. 1-18) desfoga los gases generados por el proceso. La porción terminal de esta línea descarga fuera del laboratorio.

## II.2.-Colecta de la materia prima.

Para la alimentación de los tres biodigestores se utilizaron excretas de gallina, excretas de vaca y la macroalga Macrocystis pyrifera, que se colectaron en los siguientes lugares circunvecinos a la ciudad de Ensenada, B.C., México.

El estiércol de gallina provino de la granja avícola "Vista del Mar", ubicada en el kilómetro 7 sobre la carretera a Tecate, B.C. La Tabla I muestra la composición proximal del alimento consumido por las gallinas durante el período de



Tabla I. Composición proximal del alimento consumido por las gallinas en la granja avícola "Vista del Mar", durante el período de colecta de las excretas de gallina.

## LAYINA<sup>MR</sup>

Todos los Plantas Registro SARH A 0207-018 Contenido Neto: 40 Kg.

**ANALISIS  
GARANTIZADO**

HUMEDAD	12.0 % MAX	CALCIO	2.75 % MIN
PROTEINA	14.0 % MIN	FOSFORO	0.60 % MIN
GRASA	2.0 % MIN	LISINA	0.6 % MIN
FIBRA	5.0 % MAX	METIONINA +	
CENIZAS	12.0 % MAX	CISTINA	0.6 % MIN
E. L. N.	55.0 % MIN		

**INGREDIENTES:**

CEREALES MOLIDOS COMBINACION DE PASTAS OLEAGINOSAS.  
HARINAS DE ORIGEN ANIMAL, SUBPRODUCTOS DE CEREALES  
ALFALFA DESHIDRATADA, MELAZA DE CAÑA DE AZUCAR.

VITAMINA A RIBOFLAVINA, NIACINA, CLORURO DE COLINA.  
VITAMINA B-12 PANTONATO DE CALCIO, VITAMINA D,  
VITAMINA K

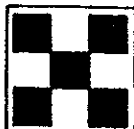
CARBONATO DE CALCIO, ROCA FOSFORICA, CLORURO DE SODIO -  
FOSFATODICALCICO, OXIDO CUPRICO, SULFATO FERROSO, OXIDO DE  
MANGANESO, YODURO DE POTASIO, OXIDO DE ZINC ANTIOXIDANTE,  
PIGMENTOS VEGETALES, LISINA, METIOTINA, CISTINA.

**INSTRUCCIONES  
PARA SU  
EMPLEO:**

ALIMENTO COMPLETO PARA GALLINAS DE POSTURA (PISO O JAULA)  
LIBRE ACCESO A ESTE NUTRIMIENTO, ASI COMO A BEBEDEROS CON  
AGUA FRESCA Y LIMPIA, DESDE LAS 20 SEMANAS DE EDAD 0.5 %  
DE POSTURA

CONSULTE AL MEDICO VETERINARIO  
FECHA DE ELABORACION IMPRESA EN EL SACO  
LOTE NUMERO, CORRESPONDE A LA MISMA FECHA DE ELABORACION.

HECHO EN MEXICO



**Purina, S.A. de C.V.**

AVE. CONSTITUYENTES No. 956 MEXICO 10, D.F.

colecta de las excretas. El estiércol de vaca se colectó fresco, de un establo de vacas lecheras en Maneadero. La composición porcentual de algunos estiércoles se presenta en la Tabla II. Macrocystis pyrifera fue recolectada, mediante buceo, de los mantos localizados en el "Rincón de las Ballenas" los días 12 de junio de 1986 y 26 de abril de 1987.

Para mantener una provisión adecuada durante la experimentación, se almacenaron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 60 kg de cada uno de los materiales.

### II.3.-Pruebas del balance de carga orgánica.

Con el propósito de obtener una población inicial adecuada de bacterias nitrificantes, los sistemas de biodigestión se inocularon con "tierra virgen de jardín", que previamente se mantuvo con agua y aireación durante tres semanas (Paniagua-Michel, 1984). Después de introducir el inóculo al biodigestor, se dejó recircular el agua del sistema durante una semana antes de adicionar el producto a tratar.

Los sistemas de bioconversión se alimentaron inicialmente con las proporciones de material y volumen de

Tabla II. Composición porcentual de algunos estiércoles (tomado de Porras, 1981).

	AGUA	N	P	K	MATERIA ORGANICA
CERDAZA PUERCO	74	0.5	0.2	0.4	15
GALLINAZA GALLINA	76	1.1	0.4	0.4	17
VACAZA VACA	64	0.7	0.3	0.3	17
BORREGO	79	0.5	0.1	0.5	17

agua (carga orgánica óptima = máxima nitrificación) determinadas por Paniagua-Michel (op.cit.). Estas relaciones fueron: 550 gramos de estiércol de gallina, 420 gramos de estiércol de vaca y 660 gramos de Macrocystis pyrifera, para 15 litros de agua en cada caso.

Cada sistema fue cargado con su respectivo material, extrapolando las relaciones de carga orgánica determinadas por Paniagua-Michel en 15 litros a un volumen de 100 litros. El primer biodigestor funcionó con 3.7 kg de excretas de gallina, el segundo con 2.8 kg de excretas de vaca y el tercero con 4.4 kg de M. purifera (fronda y estipe), previamente homogenizada en una licuadora. A cada unidad se adicionaron 100 litros de agua de uso doméstico y se determinó la velocidad de flujo de cada sistema, midiendo el tiempo necesario para llenar un recipiente de volumen conocido con el líquido colectado de la parte terminal del sistema de recirculación.

Por la importancia que tienen las reacciones de amonificación y nitrificación en la mineralización y oxidación de los productos orgánicos, es necesario mantener las condiciones apropiadas para que estas reacciones se lleven a cabo (Prakasan y Loehr, 1972; Martin y Loehr, 1976). Por lo tanto la temperatura del líquido recirculante se mantuvo a  $28 \pm 1$  °C, que se considera un intervalo

adecuado para el crecimiento y la reproducción de las bacterias nitrificantes (Srinath et al., 1976).

La velocidad de nitrificación en cada sistema, se determinó con un espectrofotómetro portátil marca Hach modelo DR-EL/4, haciendo mediciones rutinarias, con la metodología descrita en el manual del instrumento (Hach, 1981), a intervalos de cinco días, de la concentración de los siguientes compuestos en el efluente (líquido resultante de la mezcla en agua de los productos naturales introducidos al digester, después de ser recirculados en el sistema):  
Nitratos: con el método de reducción con cadmio y diazotación con sulfanilamida y etilenodiamina. Nitritos: por acidificación a ácido nitroso con ácido sulfanílico y la formación de compuestos "azo-dye" con la sal disódica de un ácido cromotrópico. Fosfatos: por formación de fosfomolibdato y su reducción a compuestos fuertemente cromáticos con ácido ascórbico. Todas estos análisis se hicieron inmediatamente después de tomar las muestras. El amoníaco se determinó, después de su basificación, por medio de un electrodo específico de un autoanalizador de iones ORION modelo 901. El pH fue medido con un potenciómetro LITMAX CP-20.

La concentración de oxígeno disuelto se midió con la modificación con azida del método iodimétrico de Winkler. La

demanda química de oxígeno (DQO), se determinó por medio de la oxidación con dicromato de potasio y la demanda biológica de oxígeno (DBO), con la diferencia en los valores de oxígeno después de someter las muestras a un período de incubación (A.P.H.A., 1980). Estos últimos parámetros se midieron para valorar la eficiencia de degradación de los productos y estimar el factor de carga (razón DBO/DQO) en cada sistema de biodigestión.

Cada biodigestor funcionó inicialmente como un sistema discontinuo, y se le transformó en sistema periódico cuando se encontraron valores altos de nitratos y valores mínimos de amonía en el líquido efluente. Los valores máximos y mínimos fueron determinados por comparación con los valores encontrados en el muestreo anterior de cada sistema. En este punto se inició con la incorporación periódica, a intervalos de cinco días, de la materia prima almacenada y descongelada de acuerdo al porcentaje de carga a ensayar. En esta investigación se probaron cuatro porcentajes de carga : 2, 5, 10 y 20 por ciento para cada uno de los biodigestores, en forma individual e independiente en el tiempo.

Los ensayos con los diferentes porcentajes de alimentación se iniciaron con el 5 por ciento para cada producto. La fase de alimentación periódica se continuó hasta lograr una estabilidad (falta de cambios

significativos) de las variables en cada biodigestor, por lo menos durante cinco observaciones consecutivas efectuadas a intervalos de cinco días. De no lograrse tal estabilidad, se procedió a desalojar el biodigestor y a ensayar el siguiente porcentaje de carga en la misma forma.

Se consideró que el porcentaje de alimentación era el adecuado en cada biodigestor, si permitía el funcionamiento mecánico del sistema y el establecimiento de una verdadera etapa periódica, es decir si los cambios en las variables medidas durante la etapa periódica no eran significativos en relación al tiempo.

En el líquido influente (mezcla del producto crudo aún no tratado en el digestor, con el volumen de agua que se agregó a cada uno de los sistemas) se analizaron las mismas variables medidas en el efluente.

Cada 5 días, durante la etapa periódica, se tomó una muestra de 3.7 l de cada uno de los efluentes, que se preservó en un congelador a - 20 °C, para su utilización posterior como fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas. La extracción de los sólidos acumulados en el sistema de remoción se hizo durante 15 min antes de introducir el líquido influente. Este intervalo de tiempo se determinó tomando en cuenta la eficiencia máxima de remoción

---

en un tiempo dado.

El balance de nitrógeno inorgánico se calculó por diferencia entre las sumas de los átomos de nitrógeno (amonia, nitritos y nitratos) presentes en el influente y efluente de cada biodigestor, durante la etapa periódica.

#### II.4.-Preparación del medio de cultivo orgánico

Para preparar el medio de cultivo orgánico se eligió al azar el extracto congelado de un día de experimentación de cada uno de los productos, y se filtró una alicuota a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Con los filtrados y agua de mar se preparó el medio de cultivo experimental utilizando las proporciones recomendadas por Paniagua-Michel (1984): 40, 20 y 10 ml de extracto de M. pyrifera, estiércol de vaca y de gallina respectivamente, por cada litro de medio de cultivo.

El agua de mar utilizada en este trabajo fue la proveniente de un sistema cerrado de laboratorio que recibió el siguiente tratamiento: eliminación de productos catabólicos a través de un filtro biológico, irradiación con rayos ultravioleta y filtración a través de filtros cuno en



serie de 10 a 1  $\mu\text{m}$ .

El pH del medio orgánico preparado para los bioensayos fue ajustado entre 4 y 5 para evitar la desnaturalización de las eventuales vitaminas presentes durante el proceso de esterilización que se realizó en una autoclave a 1.05 kilos/cm<sup>2</sup> y 121 °C durante media hora. Posteriormente el pH de los medios se reajustó al rango adecuado para el crecimiento del fitoplancton (7.5-8.2).

#### II.5.-Bioensayos de crecimiento

Para medir la eficiencia del medio de cultivo orgánico se realizaron bioensayos con la microalga Pavlova lutheri, y los resultados se compararon con los obtenidos en el medio de cultivo tradicional "f" (Guillard y Ryther, 1962), llamado en algunos trabajos medio de Mathiessen y Toner (1966).

Las microalgas fueron acondicionadas, tanto al medio químico como al medio orgánico, con el fin de eliminar el efecto debido a posibles reservas de nutrientes intracelulares (Droop, 1975b). La técnica para el acondicionamiento fue la de cultivar las microalgas secuencialmente en recipientes de volumen progresivamente

mayor (Erlenmeyer: 75 ml, Fernbach: 2000 ml, Carboy: 14 l, Tanque: 200 l). Los experimentos se iniciaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad y se comenzaron con 75 ml de cada uno de los medios ensayados, a saber: medio químico, medio orgánico y agua de mar sin enriquecer. Este último fue el blanco. Los cultivos se hicieron en triplicado para cada caso. El inóculo inicial consistió en 4 ml de un cultivo en fase exponencial de P. lutheri, mantenido en medio "f". Los recipientes se colocaron en condiciones constantes de luz (2 lámparas SOLAR de 40 watts y dos marca SYLVANIA de 40 watts de luz fría), y la temperatura se mantuvo a  $19 \pm 1.5$  °C, que constituye el rango adecuado para el crecimiento de esta microalga.

La densidad celular se registró todos los días, para lo cual se tomaron muestras de los cultivos con una pipeta automática de 1.0 ml marca Oxford P-7000. Una vez que las células fueron inmovilizadas con una gota de solución de Utermöhl (Guillard, 1973), el recuento se efectuó con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad.

Para inocular un grupo de tres matraces Fernbach de 2.8 l, con un volumen de medio de cultivo de 2.0 l cada uno, se utilizó una mezcla de los tres Erlenmeyer. El inóculo se extrajo de los Erlenmeyer cuando los cultivos estaban en crecimiento exponencial y se calculó un volumen adecuado para

lograr una concentración inicial de 10,000 cel/ml.

Cuando los cultivos realizados en Fernbach se encontraban en la fase exponencial de crecimiento, se siguió el mismo proceso que en el caso anterior para inocular los Carboys de 20 l de capacidad con 14 l de cada uno de los medios, manteniendo el experimento por triplicado. La serie de agua de mar fue descontinuada a este punto. El inóculo consistió en un volumen suficiente para lograr una concentración inicial de 45,000 cel/ml.

Cuando los cultivos estaban en la fase de crecimiento lento, se procedió con la misma técnica que en el cultivo anterior. Se inoculó un número igual de células para lograr una concentración de 25,000 cel/ml en tanques de fibra de vidrio de 500 l de capacidad, uno con 200 l de medio químico y el otro con igual volumen de medio orgánico. En este nivel de cultivo no se hicieron repeticiones.

Los datos diarios de concentración celular recabados por cada uno de los medios y de los recipientes de cultivo se transformaron en los respectivos logaritmos de base 2, se promediaron y se emplearon para calcular la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) y el tiempo medio de generación ( $T_g$ ) empleando las fórmulas 1 y 2 respectivamente (Guillard, 1973). Se utilizó la transformación a logaritmo de base dos

por ser la más adecuada, debido a que esta especie de microalga se reproduce por fisión binaria.

$$\mu = \frac{3.322 (\log N_2 - \log N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

y

$$T_g = \frac{1}{\mu} \quad (2)$$

en donde

N2 = concentración celular al tiempo t2 (en días)

N1 = concentración celular al tiempo t1 (en días)

La concentración de los compuestos nitrogenados medidos en los líquidos cosechados de los biodigestores y utilizados para la preparación del medio de cultivo, se relacionaron con las proporciones de cada producto en el medio, para calcular el total de nitrógeno inorgánico presente en un Carboy (14

1).

Para determinar los miligramos de proteínas en un millón de células de P. lutheri se relacionó el peso seco de un millón de células (0.028 mg) (Rico-Mora, 1987), con el contenido de proteínas de esta especie (aproximadamente 50 por ciento), durante la fase de crecimiento exponencial (Parsons et al., 1961). El valor obtenido se transformó en mg de nitrógeno celular, dividiendo por el factor 6.25.

Conociendo el contenido de nitrógeno por millón de células, y las densidades celulares obtenidas en los dos tipos de medio, es posible estimar la cantidad de nitrógeno fijado en un día por P. lutheri durante la fase de crecimiento exponencial en un Carboy con 14 l, tanto para el medio químico como para el medio orgánico biodigerido.

También se calculó la relación atómica entre N:P inorgánicos en los dos tipos de medio y se estimó, de la misma forma que para el nitrógeno, la cantidad de fósforo fijada por las microalgas.

## II.6.-Análisis estadístico

### a) Carga orgánica

Con el propósito de detectar cambios en la calidad de los productos orgánicos por efecto del tiempo de congelado, se realizó un análisis de regresión simple entre las variables de nitrificación y de razón de carga en el líquido influente de cada biodigestor y el tiempo de almacenamiento del producto crudo y se verificó la significancia de la pendiente obtenida (Prueba de Beta) (Sokal y Rohlf, 1969). Para la caracterización de las diferentes etapas en el proceso de biodigestión, se compararon los valores promedio de cada una de las variables medidas en el efluente de cada sistema, utilizando el análisis de varianza de una vía (caso no paramétrico) según Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, op.cit.).

Se utilizó la misma prueba para comparar los valores promedio de las variables medidas en el influente y el efluente, en cada biodigestor, para averiguar el efecto del proceso de biodigestión sobre la concentración de las diferentes formas de nitrógeno inorgánico y de la DBO y DQO del líquido influente.

La técnica de Kruskal-Wallis fue utilizada en preferencia a otras, debido a la falta de repeticiones en las mediciones y porque los datos no cumplieron las condiciones de homogeneidad de varianzas y de ajuste a la distribución normal (Morrison, 1976; Sokal y Rohlf, op.cit.).

Para determinar el grado de variación en la cantidad de sólidos recuperados en el S.R.S. de cada sistema de biodigestión, se efectuó una prueba de Beta.

b) Balance de nitrógeno

Se averiguó la significancia de los cambios del contenido de nitrógeno inorgánico entre los líquidos influente y efluente de los tres sistemas, usando una prueba "t" de diferencia de medias (Sokal y Rohlf, op.cit.).

c) Bioensayos de crecimiento

Las posibles diferencias en los resultados de los bioensayos con el medio químico y el medio orgánico, así como en sus respectivas repeticiones, se averiguaron con un análisis de covarianza después de transformar a logaritmos de base dos las densidades celulares calculadas durante la fase de crecimiento exponencial (Snedecor y Cochran, 1962). Para esta prueba se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan dicho análisis (Sokal y Rohlf, op.cit.) que son la prueba de validez estadística para un modelo de regresión lineal, efectuada con las densidades celulares de P. lutheri, y las pruebas de Bartlett y de ajuste a la distribución normal con los residuos derivados de la regresión entre las densidades celulares y el tiempo. El

análisis de covarianza se hizo para todos los cultivos, con excepción de los efectuados en Tanques, que no tuvieron repeticiones; para estos últimos, debido al escaso número de observaciones, se aplicó una prueba "t" de diferencia de las medias (Sokal y Rohlf, op.cit) de las densidades celulares registradas durante la fase exponencial, en los dos tipos de medio de cultivo.

Las pruebas de normalidad, bondad de ajuste, Kruskal-Wallis, prueba de Beta y análisis de Covarianza y sus hipótesis, fueron realizadas con el paquete de programas ESIMSL, preparado por el Dr. Alejandro Chagoya Guzmán en la computadora PRIME 400 del C.I.C.E.S.E.



### III. RESULTADOS

Los resultados que se presentan a continuación se refieren a los porcentajes de carga que garantizaron la estabilidad de las variables de nitrificación y de razón de carga. Los obtenidos con porcentajes de carga diferentes se resumen en la tabla III.

#### III.1.-Carga orgánica

a) Biodigestor que funcionó con excretas de gallina.

El porcentaje de carga del 5 por ciento resultó ser el más adecuado para el funcionamiento mecánico (Tabla III), y garantizó la estabilidad de las variables en el transcurso del tiempo durante el proceso de alimentación y producción periódica de nutrientes del sistema.

Con la prueba de Beta (significancia estadística de las pendientes de las líneas de regresión) (Tabla IV) efectuada para cada una de las variables medidas en el líquido influente se demostró que, con excepción de los fosfatos, la calidad de las excretas de gallina no cambia significativamente por efecto del tiempo de almacenamiento en

Tabla III. Resultados obtenidos con los diferentes porcentajes de carga ensayados, para los tres tipos de producto utilizados en los sistemas de biodigestión.

PRODUCTO	PORCENTAJE DE CARGA	RESULTADOS
GALLINA	2	BAJA NITRIFICACION
	5	FUNCIONA
	10	NO FUNCIONA MECANICAMENTE
VACA	5	BAJA NITRIFICACION
	10	FUNCIONA
	20	NO FUNCIONA MECANICAMENTE
MACROALGA	5	BAJA NITRIFICACION
	10	FUNCIONA
	20	NO FUNCIONA MECANICAMENTE

Tabla IV. Pruebas de Beta (significancia de las pendientes de las líneas de regresión) para las variables medidas en el influente del biodigestor que funcionó con excretas de gallina. Nivel de decisión  $\alpha \leq 0.05$ .

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	RELACION F	g. L.	DECISION
EXCRETAS DE GALLINA	O <sub>2</sub> (mg/l)	0.4899	6	ACEPTA
	T (°C)	1.6383	6	ACEPTA
	pH	- 1.4444	6	ACEPTA
	DBO (mg/l)	- 0.5923	6	ACEPTA
	DQO (mg/l)	- 2.2269	6	ACEPTA
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	1.1412	6	ACEPTA
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	- 2.3939	6	ACEPTA
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0.6768	6	ACEPTA
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/l)	2.5751	6	RECHAZA

el congelador.

Las figuras 3 a 5 muestran las variaciones de todas las variables medidas (amonía, nitritos, nitratos, DBO, DQO, temperatura, oxígeno, pH y flujo) en este biodigestor. En general se encontró que los valores de amonia fueron mayores en el influente que en el efluente. Para el resto de las variables los valores medidos fueron menores en el influente (Tabla V). Esta tendencia se mantuvo durante todo el período de experimentación.

En base al comportamiento de los valores de los compuestos de nitrógeno y de la DBO y de la DQO en el líquido efluente (Figs. 3 y 4), y por medio de una prueba de Kruskal-Wallis (Tabla VI), se caracterizaron tres etapas diferentes durante el proceso de biodigestión: etapa inicial (I), de transición (T) y periódica (P).

La etapa inicial comprendió del día 0 al 25 de experimentación. En este intervalo el sistema se mantuvo funcionando con la carga orgánica inicial, sin la incorporación de nuevo material. Durante este período los valores de amonia tendieron a disminuir en el transcurso del tiempo (de 90.70 a 7.12 mg/l), en tanto que los valores de nitritos y nitratos se incrementaron respectivamente de 0.13 a 0.52 y de 17.60 a 66.60 mg/l (Fig. 3). Los valores de DBO

---

Tabla V. Promedios y desv. estandard, de las variables medidas en el influente (A) y el efluente (B) durante la etapa periódica, para los tres tipos de productos utilizados en los sistemas de biodigestión. Unidades: flujo en l/min, temperatura en °C. Variables químicas en mg/l. En el caso de la macroalga, las concentraciones de fosfatos resultaron inferiores a los límites de detección del método (N.D.).

## A

TIPO DE PRODUCTO	PROM. Y DESV. EST.	O <sub>2</sub>	T °	pH	DBO	DGO	NH <sub>4</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>
EXCRETAS DE GALLINA	$\bar{x}$	7.42	22.90	7.80	292.67	550.46	85.80	0.037	4.60	1.45
	S	0.34	0.91	0.18	58.42	202.59	4.37	0.20	1.15	0.26
EXCRETAS DE VACA	$\bar{x}$	7.57	22.70	7.70	443.92	785.62	38.83	0.006	4.70	0.33
	S	0.43	0.74	0.17	123.76	234.55	6.45	0.002	2.26	0.02
MACROALGA	$\bar{x}$	8.14	22.7	8.0	318.27	274.76	20.36	0.002	0.57	N.D.
	S	0.36	0.84	0.17	3.78	10.36	1.86	0.0005	0.50	N.D.

## B

TIPO DE PRODUCTO	PROM. Y DESV. EST.	FLUJO	O <sub>2</sub>	T °	pH	DBO	DGO	NH <sub>4</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>
EXCRETAS DE GALLINA	X	2.50	7.90	29.10	8.10	1618.50	733.39	12.70	0.340	43.20	5.27
	S	0.14	0.18	0.51	0.06	568.03	485.51	1.95	0.20	5.11	2.03
EXCRETAS DE VACA	$\bar{x}$	0.52	7.69	27.40	8.00	1212.90	506.51	5.49	0.075	5.78	2.46
	S	0.03	0.25	1.32	0.07	138.58	58.76	1.83	0.06	2.48	0.71
MACROALGA	$\bar{x}$	2.76	7.97	27.57	8.00	2662.30	865.27	12.25	0.0003	20.60	N.D.
	S	0.11	0.50	1.03	0.09	230.04	92.74	1.17	0.001	4.22	N.D.

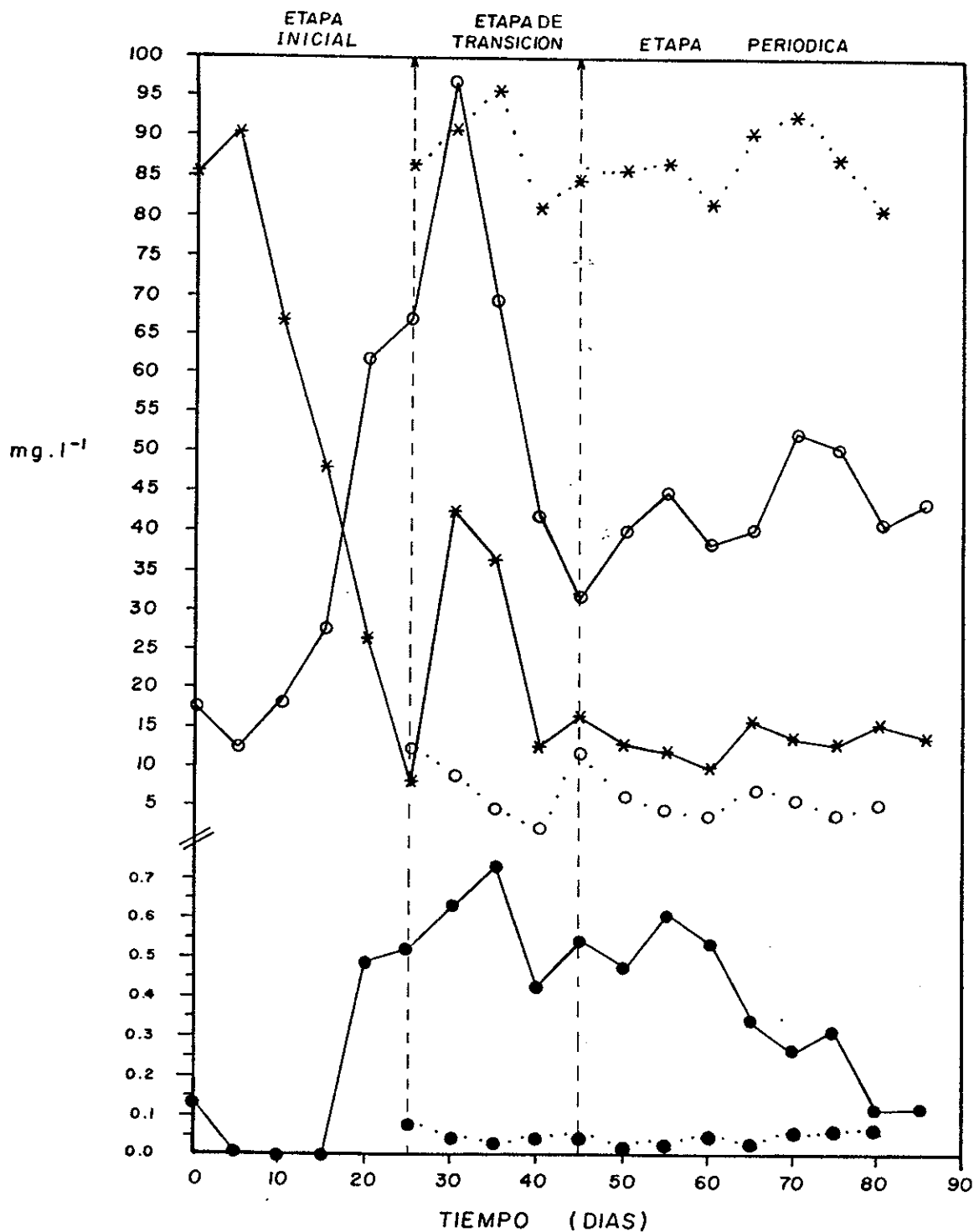


Figura 3. Variación de los compuestos de nitrógeno en el digester alimentado con excretas de gallina. Amonia: \* ; nitritos: ● ; nitratos: ○. Los datos punteados se refieren al influente, los unidos con trazo continuo al efluente.

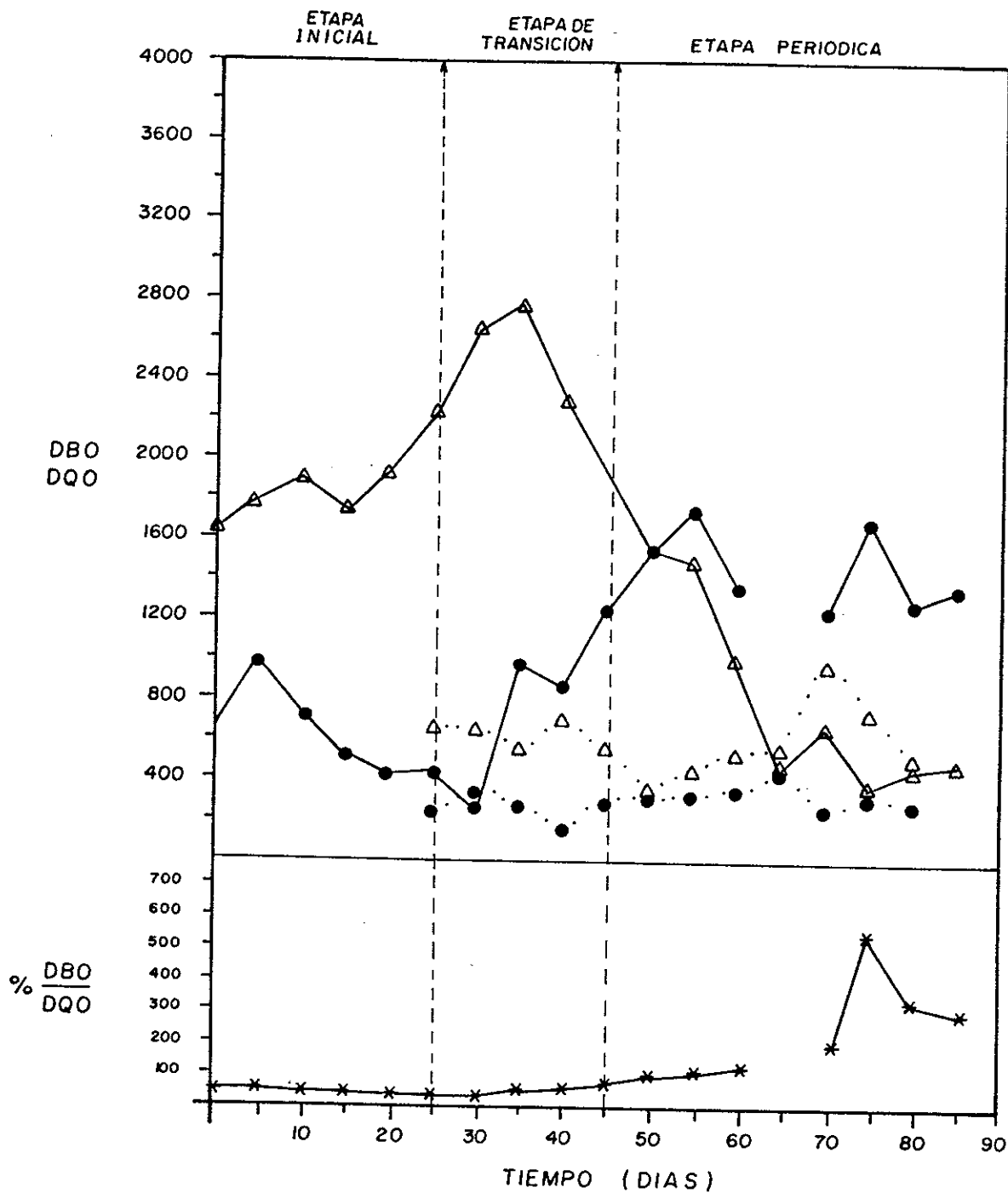


Figura 4. Variación de la demanda biológica (DBO: ●) y química (DQO:Δ) de oxígeno (en mg/l) y la razón DBO/DQO (\*), para el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con excretas de gallina.

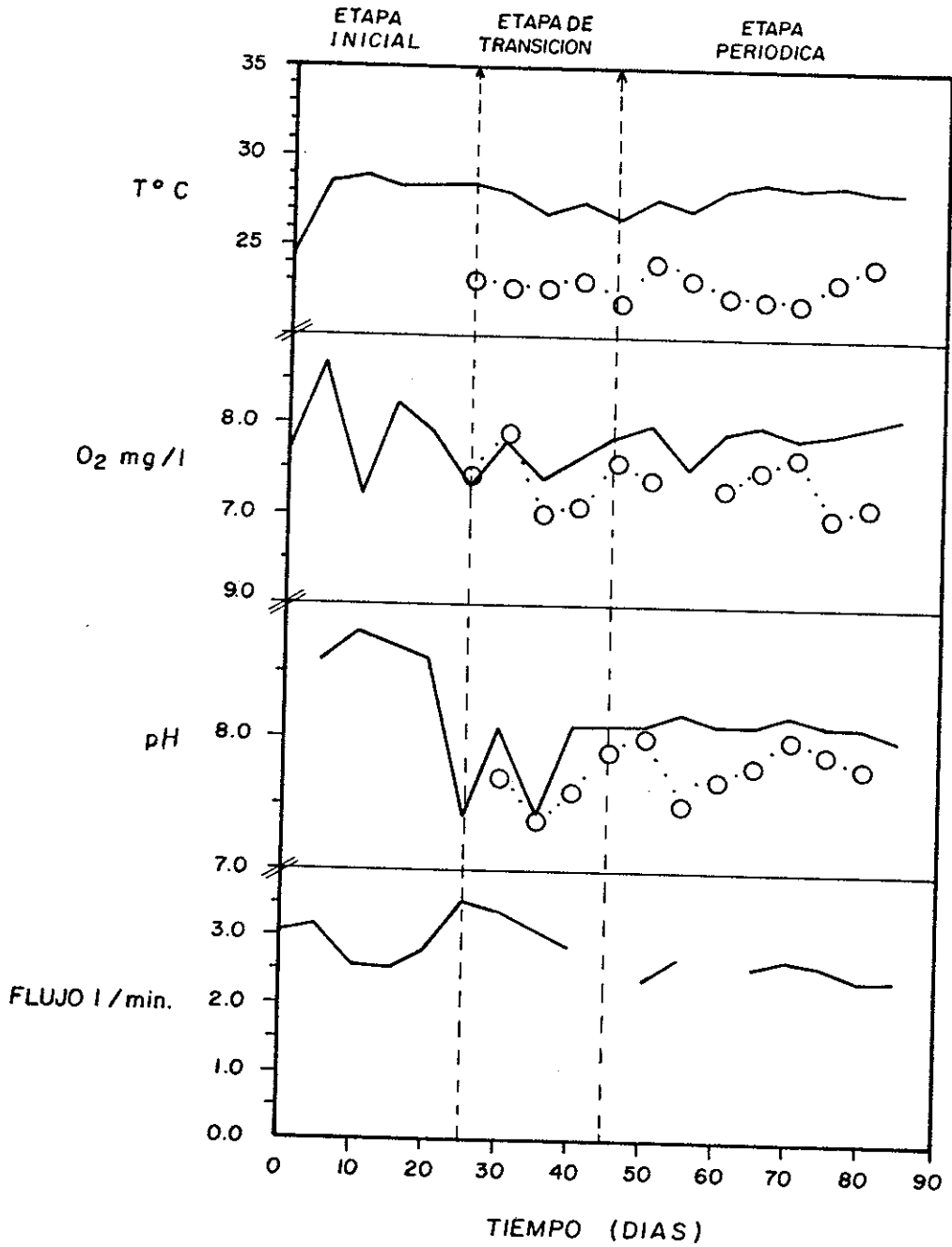


Figura 5. Variaciones de la temperatura, oxígeno, pH y flujo, en el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo), del digester que funcionó con excretas de gallina.



Tabla VI. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el efluente durante la etapa inicial (I) de transición (T) y periódica (P) para el biodigestor que funcionó con excretas de gallina.

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	VALOR ESTIMADO DE (H)	PROBABILIDAD	DECISION	COMPARACIONES A POSTERIOR VIA S.N.K		
					E	T	P
EXCRETAS DE GALLINA	O <sub>2</sub> (mg/l)	1.150	0.5804	N.S.	_____	_____	_____
	T (°C)	6.184	0.0374	*	_____	_____	_____
	pH	2.101	0.3688	N.S.	_____	_____	_____
	DBO (mg/l)	10.422	0.0011	**	_____	_____	_____
	DQO (mg/l)	12.788	0.0000	***	_____	_____	_____
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	11.133	0.0081	**	_____	_____	_____
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	13.124	0.0002	***	_____	_____	_____
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	10.134	0.0049	**	_____	_____	_____
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/l)	9.138	0.0045	**	_____	_____	_____

Tabla VII. Pruebas de Beta para las variables medidas en el efluente durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con excretas de gallina. Nivel de decisión  $\alpha \leq 0.05$ .

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	RELACION F	g.L.	DECISION
EXCRETAS DE GALLINA	O <sub>2</sub> (mg/l)	0.4899	6	ACEPTA
	T (°C)	1.6383	6	ACEPTA
	pH	-1.4444	6	ACEPTA
	DBO (mg/l)	-0.5923	6	ACEPTA
	DQO (mg/l)	-2.2269	6	ACEPTA
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	1.1412	6	ACEPTA
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	-2.3939	6	ACEPTA
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0.6768	6	ACEPTA
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/l)	2.5751	6	RECHAZA

disminuyeron (de 990.6 a 416.7 mg/l) mientras que los de DQO aumentaron (1631.7 a 2231.7 mg/l). La razón de degradación (porcentaje DBO/DQO) se mantuvo sin cambio (Fig. 4). En este período la temperatura se incrementó de 24.7 a 28.9 °C durante los primeros diez días (Fig. 5) y se mantuvo constante durante el resto de la etapa (Tabla VI). Los valores de oxígeno y pH (Fig. 5) no resultaron significativamente diferentes en las tres etapas (Tabla VI).

La etapa de transición abarcó del día 25 al 45. Su inicio coincidió con el máximo valor de nitratos (66.60 mg/l) y el mínimo de amonía (7.12 mg/l) (Fig. 3). En este punto se inició la adición periódica de nuevo material al sistema.

En esta segunda etapa las variables de nitrificación tuvieron un comportamiento "Gausiano", los valores tendieron a incrementar hasta llegar a un máximo, después del cual disminuyeron (Fig. 3). Los valores máximos y mínimos encontrados para el amonía, nitritos y nitratos fueron respectivamente: 42.46 y 12.26 mg/l; 0.73 y 0.42 mg/l; 96.80 y 31.20 mg/l.

La tendencia de la DQO fue análoga a la de las variables de nitrificación, y los valores máximo y mínimo fueron 2766.1 y 1933.4 mg/l. Durante este lapso la DBO se incrementó de 236.1 a 1231.8 mg/l (Fig. 4).

Las variables medidas en el líquido efluente durante la etapa periódica no manifestaron cambios, con excepción de los fosfatos (Figs. 3, 4 y 5), como lo demuestran las pruebas de Beta realizadas (Tabla VII).

Para comprobar si el proceso de biodigestión causa variaciones significativas en la calidad de los productos adicionados, se efectuaron pruebas de Kruskal-Wallis (Tabla VIII) con las variables medidas en el influente y el efluente durante la etapa periódica (Tabla IV). Con esta prueba se encontró que existen diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ) en la magnitud de las variables de nitrificación, de los fosfatos y de las demandas biológica y química de oxígeno. Para los valores de oxígeno, temperatura y pH, no se encontraron diferencias por efecto del proceso de biodigestión.

b) Biodigestor que funcionó con excretas de vaca

Siguiendo los mismos criterios descritos en el primer inciso, se determinó que el 10 por ciento de carga es el porcentaje más adecuado para este sistema.

Para determinar si existen variaciones temporales en la calidad de los productos almacenados por congelamiento, se

Tabla VIII. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el influente (I) y el efluente (E) durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con excretas de gallina.

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	VALOR ESTIMADO DE (H)	PROBABILIDAD	DECISION
EXCRETAS DE GALLINA	O <sub>2</sub> (mg/l)	0.179	0.6710	N. S.
	T (°C)	0.487	0.5042	N. S.
	pH	1.116	0.3006	N. S.
	DBO (mg/l)	9.134	0.0017	* *
	DQO (mg/l)	12.600	0.0000	* * *
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	4.645	0.0286	*
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	12.600	0.0000	* * *
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	7.616	0.0070	* *
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/l)	4.029	0.0202	*

Tabla IX. Pruebas de Beta para las variables medidas en el influente para el biodigestor que funcionó con excretas de vaca. Nivel de decisión  $\alpha \leq 0.05$ .

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	RELACION F	g.L.	DECISION
EXCRETAS DE VACA	O <sub>2</sub> (mg/l)	0.1583	12	ACEPTA
	T (°C)	- 0.1146	13	ACEPTA
	pH	0.4346	12	ACEPTA
	DBO (mg/l)	2.5699	13	RECHAZA
	DQO (mg/l)	2.7093	12	RECHAZA
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	- 1.1185	13	ACEPTA
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	- 0.8700	13	ACEPTA
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	- 0.8077	13	ACEPTA
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/l)	3.4250	6	RECHAZA

Tabla X. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el efluente durante la etapa inicial (I) de transición (T) y periódica (P) para el biodigestor que funcionó con excretas de vaca.

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	VALOR ESTIMADO DE (H)	PROBABILIDAD	DECISION	COMPARACIONES A POSTERIOR VIA S.N.K		
					E	T	P
EXCRETAS DE VACA	O <sub>2</sub> (mg/l)	0.750	0.7086	N.S.	_____	_____	_____
	T (°C)	2.322	0.3332	N.S.	_____	_____	_____
	pH	0.794	0.6946	N.S.	_____	_____	_____
	DBO (mg/l)	7.881	0.0094	**	_____	_____	_____
	DQO (mg/l)	9.168	0.0029	**	_____	_____	_____
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	10.003	0.0089	**	_____	_____	_____
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	6.032	0.0308	*	_____	_____	_____
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	11.366	0.0002	***	_____	_____	_____
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/l)	5.123	0.0691	N.S.	_____	_____	_____

efectuó una prueba de Beta (Tabla IX) para cada una de las variables medidas en el líquido influente. Se encontró que los cambios respecto al tiempo fueron significativos únicamente para las variables DBO, DQO y fosfatos.

En cuanto a la magnitud de las variables de nitrificación en el líquido influente y en el efluente, se encontró un comportamiento análogo al descrito para el biodigestor con excretas de gallina (Fig. 6, Tabla V). Los valores de DBO, DQO, temperatura, oxígeno y pH (Figs. 7 y 8, Tabla V) también tuvieron variaciones similares a las descritas para el primer biodigestor.

También en este sistema se encontraron tres etapas diferentes durante su funcionamiento (Figs. 6 y 7). Estas se caracterizaron con los mismos criterios que para el biodigestor que funcionó con excretas de gallina, y su existencia se comprobó por medio de una prueba de Kruskal-Wallis (Tabla X).

La etapa inicial comprendió los días 0 a 10 de experimentación. Durante este período no se agregó nuevo material al sistema. Los valores de amonía disminuyeron (de 60.36 a 12.08 mg/l), mientras que los de nitritos y nitratos se incrementaron, cambiando respectivamente de 0.05 a 0.09 y de 14.10 a 48.24 mg/l (Fig. 6).

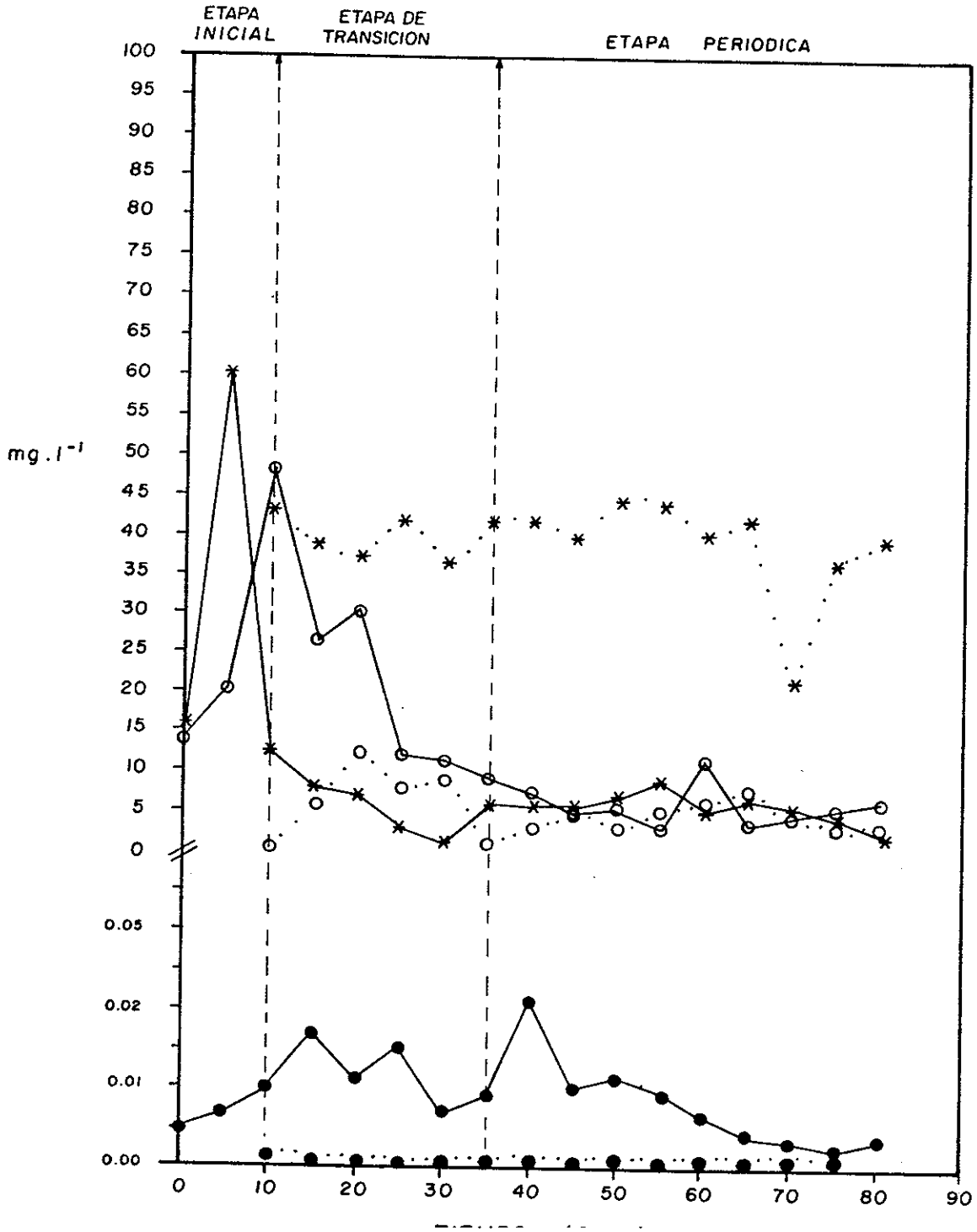


Figura 6. Variación de los compuestos de nitrógeno en el digester alimentado con excretas de vaca. Amonia: \* ; nitritos: ● ; nitratos: o . Los datos punteados se refieren al influente, los continuos al efluente.

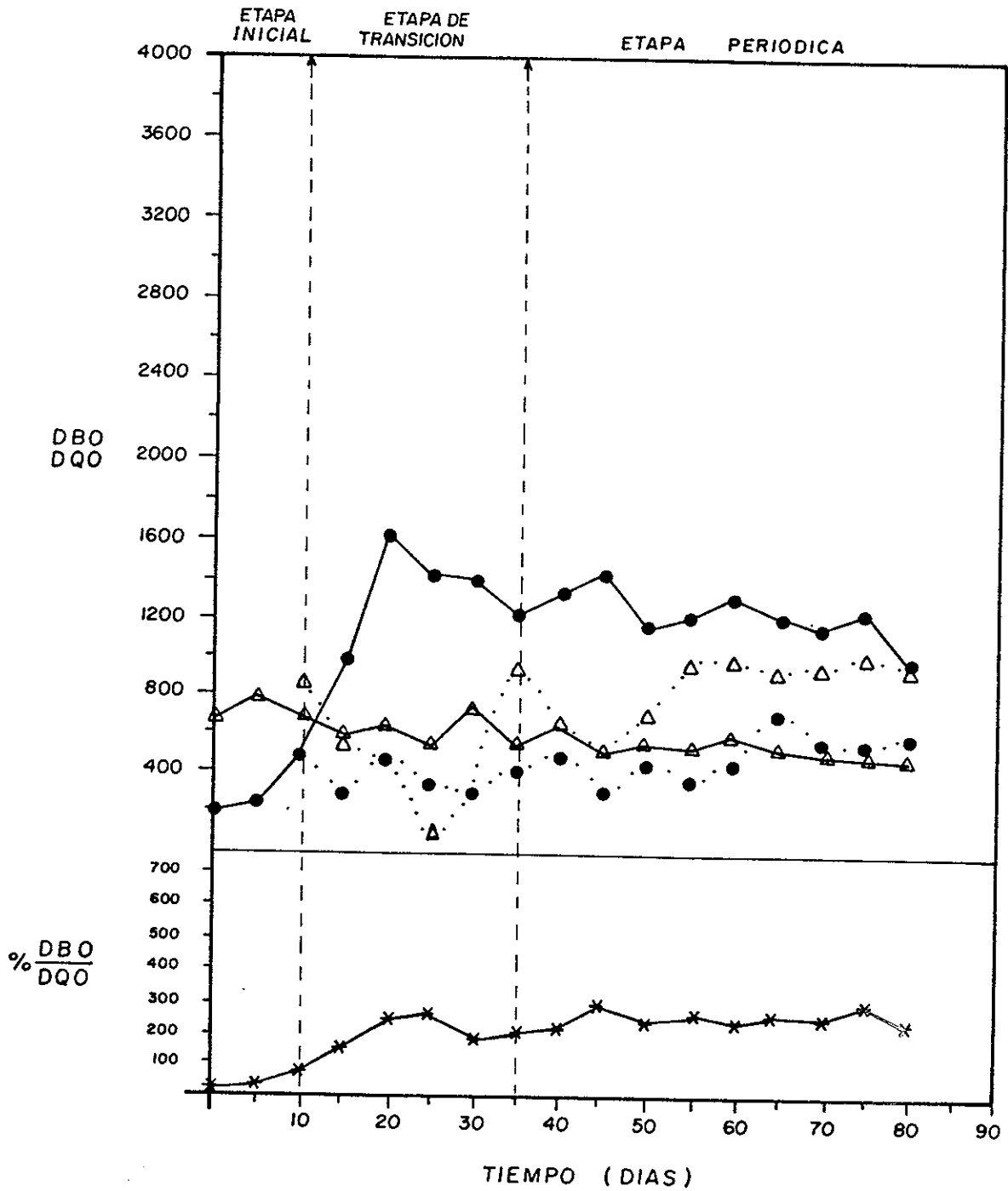


Figura 7. Variación de la demanda biológica (DBO: ●) y química (DQO:Δ) de oxígeno (en mg/l) y la razón DBO/DQO (\*), para el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con excretas de vaca.



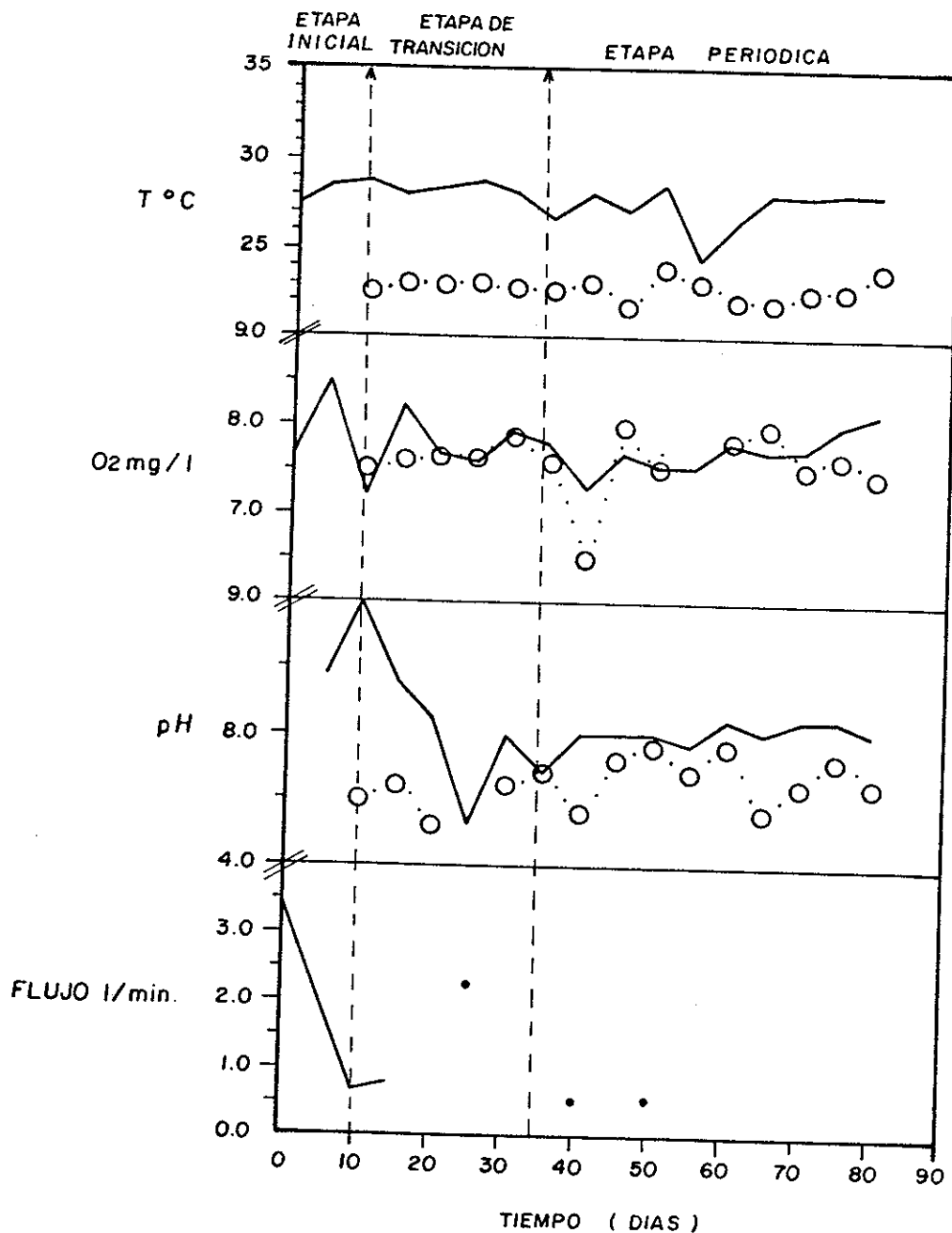


Figura 8. Variación de la temperatura, oxígeno, pH y flujo, en el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digester alimentado con excretas de vaca.

En este período la DBO tuvo una tendencia a incrementar sus valores (196.1 a 490.8 mg/l) (Fig. 7), mientras que la DQO no cambió apreciablemente. La razón DBO/DQO tuvo un comportamiento similar a la DBO. No se encontraron diferencias significativas en los valores de temperatura, oxígeno y fosfatos (Tabla X y Fig. 8).

La incorporación de nuevo material al sistema (el día 10 de experimentación) marcó el inicio de la etapa de transición, que coincidió con el máximo valor de nitratos (48.24 mg/l) y el mínimo de amonía (12.08 mg/l). Durante esta fase, la cual concluyó el día 35 de experimentación, se observó un decremento continuo en la concentración del amonía y de los nitratos en el líquido efluente. La concentración de los nitritos no fue significativamente diferente a la concentración encontrada en la etapa anterior. Los valores de DBO se incrementaron (490.7 a 1630.1 mg/l) (Fig. 7), mientras que la DQO continuó sin variación.

La etapa periódica se caracterizó por la estabilidad de las variables medidas (Figs. 6, 7 y 8). Las pruebas de Beta demostraron que, con excepción de los nitritos, los cambios temporales de las diferentes variables no fueron significativos (Tabla XI).

Tabla XI. Pruebas de Beta para las variables medidas en el efluente durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con excretas de vaca. Nivel de decisión  $\alpha \leq 0.05$ .

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	RELACION F	g.L.	DECISION
EXCRETAS DE VACA	O <sub>2</sub> (mg/l)	0.8231	8	ACEPTA
	T (°C)	0.7387	8	ACEPTA
	pH	2.2727	8	ACEPTA
	DBO (mg/l)	- 2.0841	8	ACEPTA
	DQO (mg/l)	- 2.2898	8	ACEPTA
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	- 1.6877	8	ACEPTA
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	- 3.8088	8	RECHAZA
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	- 0.9456	8	ACEPTA
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/l)	- 0.3571	8	ACEPTA

Tabla XII. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el influente (I) y el efluente (E) durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con excretas de vaca.

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	VALOR ESTIMADO DE (H)	PROBABILIDAD	DECISION
EXCRETAS DE VACA	O <sub>2</sub> (mg/l)	0.001	0.9734	N. S.
	T (°C)	8.712	0.0016	* *
	pH	2.888	0.0913	N. S.
	DBO (mg/l)	8.257	0.0018	* *
	DQO (mg/l)	7.748	0.0037	* *
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	4.868	0.0253	*
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	16.200	0.0000	* * *
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	4.368	0.0063	* *
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/l)	6.272	0.0098	* *

Al igual que en el primer biodigestor, se efectuó una prueba de Kruskal-Wallis entre las variables medidas en el líquido influente y en el efluente durante esta etapa, para establecer si el proceso de biodigestión afecta la calidad del producto. Con excepción del oxígeno y del pH, todas las otras variables (amonía, nitritos, nitratos, DBO, DQO y temperatura) presentaron diferencias significativas (Tabla XII).

c) Biodigestor que funcionó con la macroalga

También en este caso el 10 por ciento de carga fue el más adecuado.

Todas las variables medidas en el influente, con la excepción de la DQO, no variaron significativamente en el tiempo, lo cual se comprobó comparando las pendientes de las líneas de regresión entre el tiempo de almacenamiento y los valores de cada una de las variables (Tabla XIII).

Durante los primeros 30 días la concentración de amonía en el líquido efluente resultó ser muy alta y variable (entre 26 y 100 mg/l aproximadamente) y la de los nitratos tuvo una tendencia similar, con valores elevados (entre 12 y 97 mg/l) hasta el día 35. Después de estas fechas las dos

Tabla XIII. Pruebas de Beta para las variables medidas en el influente para el biodigestor que funcionó con macroalga. Nivel de decisión  $\alpha \leq 0.05$ .

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	RELACION F	g. L.	DECISION
MACROALGA	O <sub>2</sub> (mg/l)	- 0.3139	11	ACEPTA
	T (°C)	- 0.0280	11	ACEPTA
	pH	0.6995	11	ACEPTA
	DBO (mg/l)	- 1.9112	8	ACEPTA
	DQO (mg/l)	- 2.3681	11	RECHAZA
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	- 1.1417	11	ACEPTA
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	- 0.5066	9	ACEPTA
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0.9890	11	ACEPTA

Tabla XIV. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el efluente durante la etapa inicial (I) de transición (T) y periódica (P) para el biodigestor que funcionó con macroalga.

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	VALOR ESTIMADO DE (H)	PROBABILIDAD	DECISION	COMPARACIONES A POSTERIOR VIA S.N.K.		
					E	T	P
MACROALGA	O <sub>2</sub> (mg/l)	3.002	0.2343	N. S.	_____	_____	_____
	T (°C)	2.260	0.3417	N. S.	_____	_____	_____
	pH	1.158	0.5443	N. S.	_____	_____	_____
	DBO (mg/l)	9.102	0.0038	**	_____	_____	_____
	DQO (mg/l)	6.677	0.0259	*	_____	_____	_____
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	12.888	0.0000	***	_____	_____	_____
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	5.459	0.0278	*	_____	_____	_____
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	9.774	0.0020	**	_____	_____	_____

concentraciones disminuyeron, y se estabilizaron en la etapa periódica (días 40 a 85) alrededor de 12 y 20 mg/l respectivamente. Los nitritos fueron muy variables (entre 0.003 y 0.020 mg/l) hasta el día 20, y después de esta fecha se mantuvieron aproximadamente constantes en valores inferiores a 0.005 mg/l (Fig. 9). De relativamente bajos valores iniciales, la DBO (1420.6 mg/l) y la DQO (1822.6 mg/l) aumentaron en las etapas inicial y parte de la de transición (de 8222.7 y 2340.8 mg/l respectivamente en el día 20) para disminuir a valores de 2742.1 y 944.2 mg/l durante el resto del período de experimentación (Fig. 10). El resto de las variables no demostraron tendencias evidentes (Fig. 11).

En base a las características químicas del líquido efluente de este sistema se pudieron caracterizar las tres etapas descritas en los casos anteriores (Figs. 9, 10 y 11) cuya existencia fue igualmente comprobada con una prueba de Kruskal-Wallis (Tabla XIV).

La etapa inicial, que comprendió del día 0 al 10, el comportamiento del amonio fue análogo a los sistemas ya descritos, los nitritos y nitratos se incrementaron ligeramente al día 5 de experimentación (Fig. 9), la DBO aumentó de 1420.6 a 3426.9 mg/l y la DQO disminuyó de 1822.6 a 1642.3 mg/l (Fig. 10).

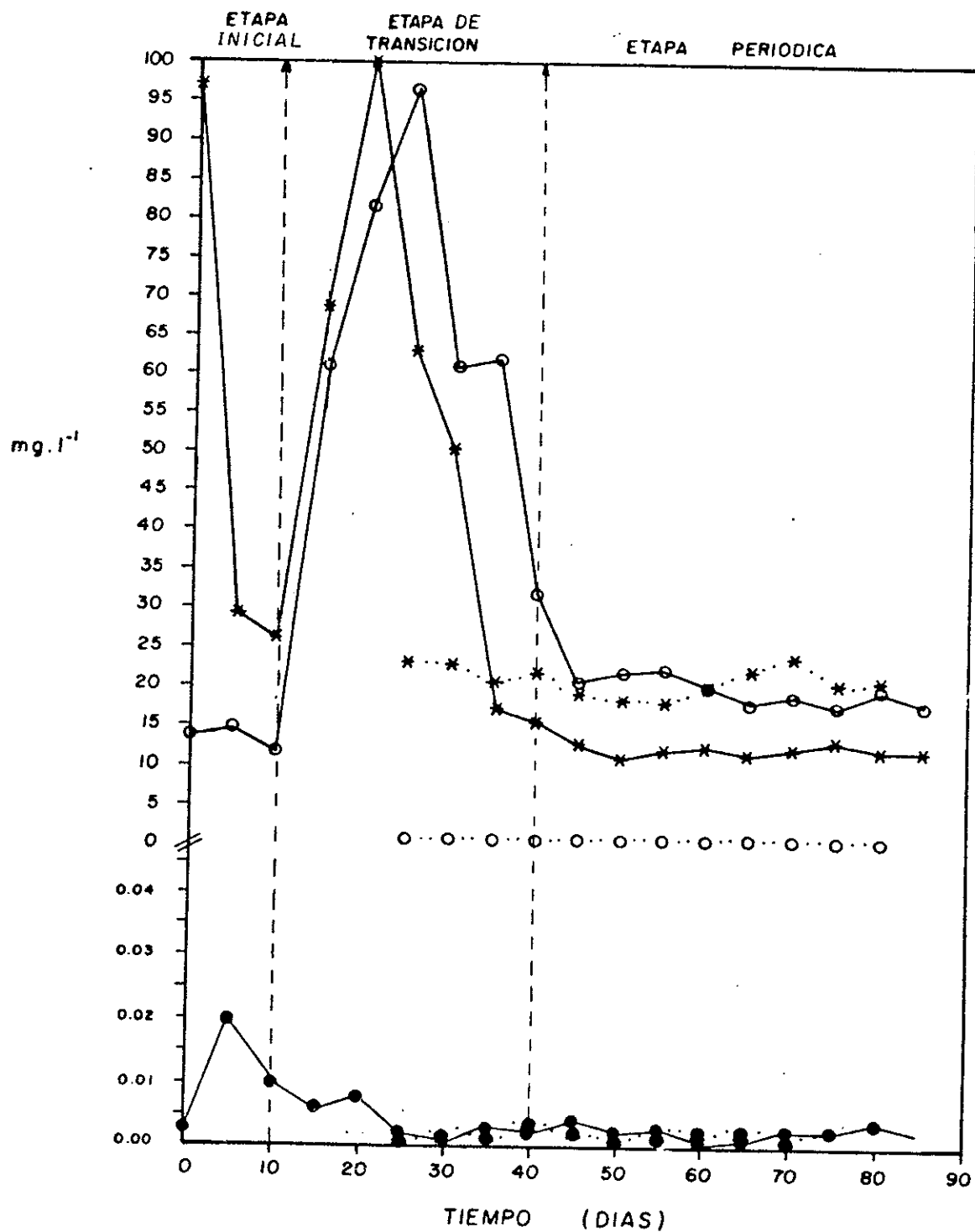


Figura 9. Variación de los compuestos de nitrógeno en el digester alimentado con macroalga. Amonia: \* ; nitritos: ● ; nitratos: ○ . Los datos punteados se refieren al influente, los continuos al efluente.

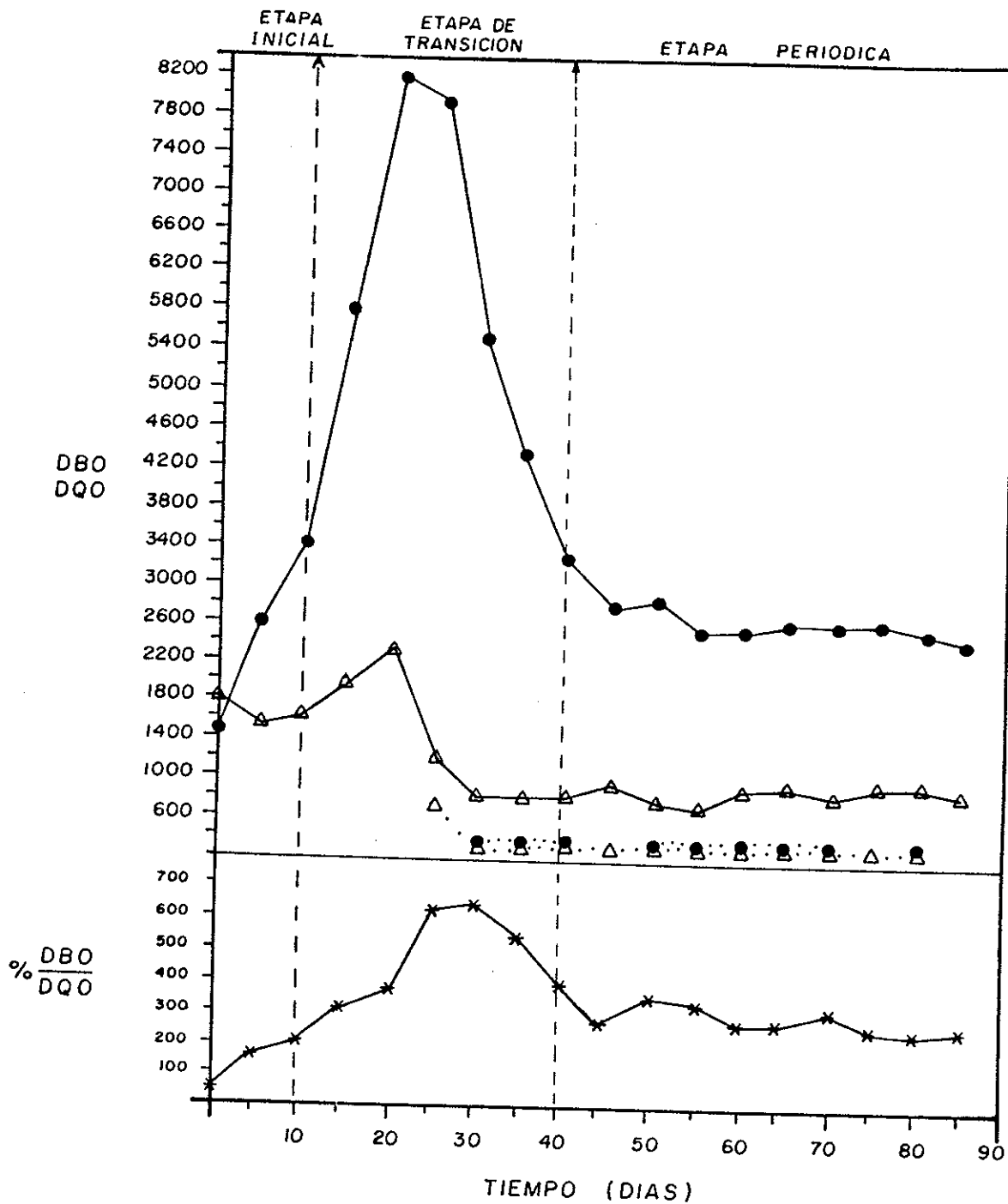


Figura 10. Variación de la demanda biológica (DBO: ●) y química (DQO:Δ) de oxígeno (en mg/l) y la razón DBO/DQO (\*), para el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con macroalga.



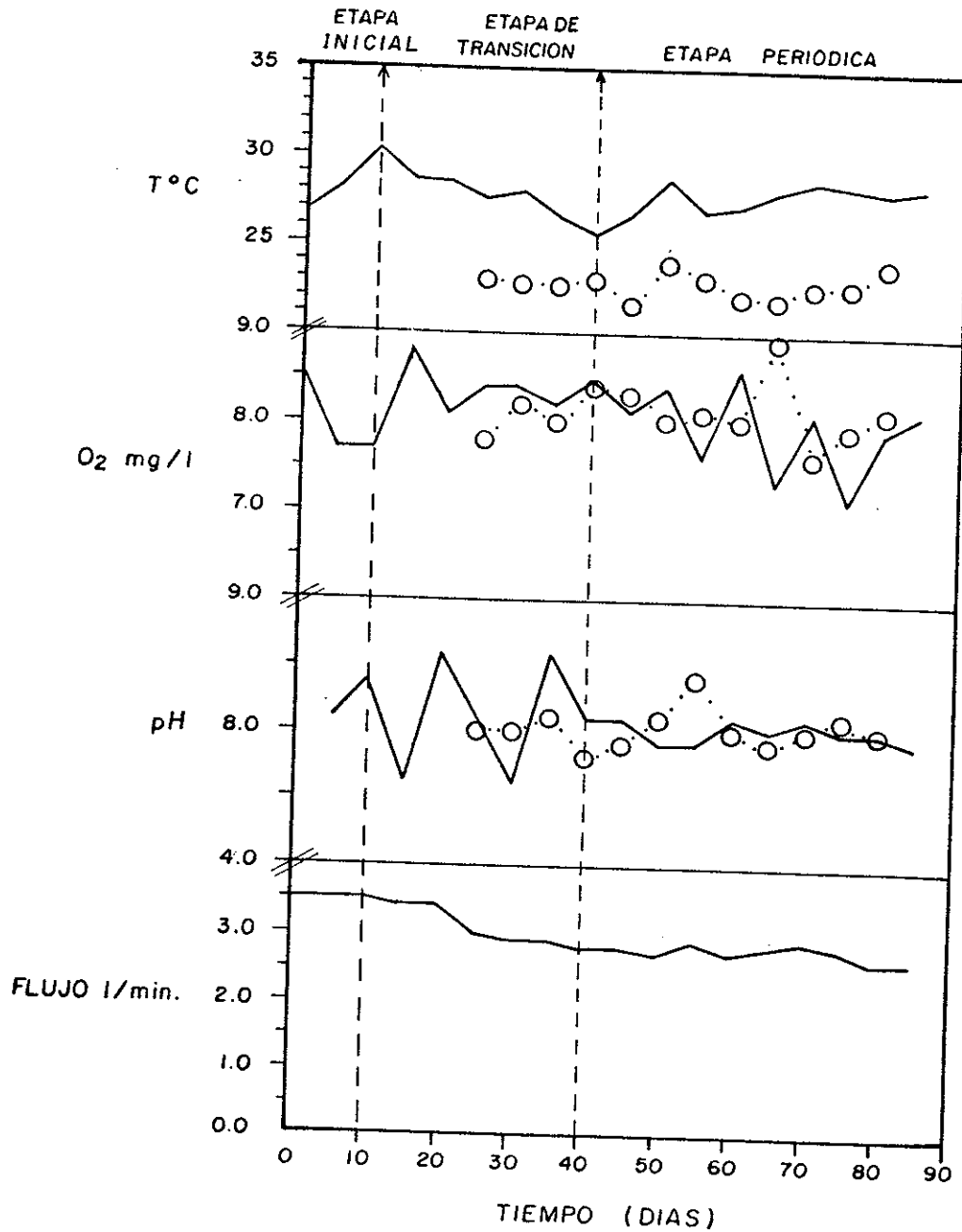


Figura 11. Variación de la temperatura, oxígeno, pH y flujo, en el influente (trazo punteado) y el efluente (trazo continuo) en el digestor alimentado con macroalga.

Para los valores de oxígeno, temperatura y pH (Fig. 11, Tabla XIV), no se encontró una diferencia significativa en la magnitud de las variables a lo largo del período de experimentación.

La etapa de transición comprendió del día 10 al 40. En este período los valores de la mayoría de las variables (amonía y nitratos en Fig. 9; DBO y DQO en Fig. 10) tendieron a disminuir. Los valores máximos y mínimos para cada variable fueron: amonía 99.7 y 15.1 mg/l, nitritos 0.008 y 0.002 mg/l, nitratos 96.43 y 31.60 mg/l, DBO 822.72 y 3221.6 mg/l y DQO 2340.8 y 821.6 mg/l (Fig. 9).

En la etapa de transición y en coincidencia con los valores máximos de nitratos y los mínimos de amonía (día 25), se dió principio a la incorporación de nuevo material al sistema (Fig. 9). Esta fecha coincidió también con los valores máximos de la mayoría de las variables. La etapa periódica abarcó del día 40 al 85 del proceso y se caracterizó de manera análoga a los sistemas de biodigestión ya descritos, sobresaliendo el poco cambio que se detectó en la magnitud de las variables respecto al tiempo, comparativamente con lo ocurrido en las etapas precedentes (Figs. 9, 10 y 11). Para determinar la significancia de los cambios temporales de las variables medidas en el líquido

Tabla XV. Pruebas de Beta para las variables medidas en el efluente durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con macroalga. Nivel de decisión  $\alpha \leq 0.05$ .

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	RELACION F	g.L.	DECISION
MACROALGA	O <sub>2</sub> (mg/l)	- 1.2804	8	ACEPTA
	T (°C)	2.5531	8	ACEPTA
	pH	- 0.9474	8	RECHAZA
	DBO (mg/l)	- 2.1552	8	ACEPTA
	DQO (mg/l)	1.2280	8	ACEPTA
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	- 1.3202	8	ACEPTA
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	- 0.5922	8	ACEPTA
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	- 2.1364	8	ACEPTA

Tabla XVI. Pruebas de Kruskal-Wallis con las variables medidas en el influente (I) y el efluente (E) durante la etapa periódica, para el biodigestor que funcionó con macroalga.

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	VALOR ESTIMADO DE (H)	PROBABILIDAD	DECISION
MACROALGA	O <sub>2</sub> (mg/l)	3.881	0.0483	*
	T (°C)	2.677	0.0051	**
	pH	0.090	0.7582	N. S.
	DBO (mg/l)	11.827	0.0000	***
	DQO (mg/l)	5.368	0.0100	**
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	9.165	0.0038	**
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	7.368	0.0069	**
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	15.261	0.0000	***

efluente, se realizó una prueba de Beta para cada caso (Tabla XV) y se encontró que la magnitud del cambio no era significativo para la mayoría de las variables, con la única excepción del pH.

De manera similar a los casos anteriores se efectuó una prueba de Kruskal-Wallis (Tabla XVI) con las variables medidas en el influente y en el efluente durante la etapa periódica, para comprobar si el proceso de biodigestión causa cambios en los productos adicionados. Se encontró que para la mayoría de las variables existe una diferencia significativa, con la única excepción del pH. Este no cambió significativamente con el proceso de biodigestión.

### III.2.- Sólidos recuperados en el S.R.S.

Desde la incorporación de nuevo material en cada biodigestor, se comenzó la eliminación de los sólidos acumulados.

Las cantidades de sólidos obtenidos en cada sistema de biodigestión decrecieron durante la etapa de transición, posteriormente los valores se mantuvieron relativamente estables (Tabla XVII). Para comprobar tal estabilidad se efectuaron pruebas de Beta con los sólidos recuperados

Tabla XVII. Cantidad de sólidos recuperados por día (en gramos de peso húmedo) en el S.R.S., para los tres sistemas de biodigestión.

TIEMPO (DIAS)	TIPO DE PRODUCTO		
	EXCRETAS DE GALLINA	EXCRETAS DE VACA	MACROALGA
0			
5			
10		45.10	
15		30.23	
20		48.11	39.80
25	60.80	29.14	27.31
30	46.26	19.27	23.00
35	43.00	18.36	15.90
40	38.00	15.27	17.39
45	29.00	17.33	13.00
50	26.10	20.15	12.69
55	29.60	26.19	15.03
60	25.40	23.36	12.80
65	23.18	25.27	17.26
70	26.37	26.31	15.29
75	27.15	29.30	17.11
80	25.23	21.40	10.23
85	24.60		15.37

Tabla XVIII. Pruebas de Beta realizadas con la cantidad de sólidos recuperados por día (en gramos de peso húmedo) en el S.R.S., para los tres sistemas de biodigestión, durante la etapa periódica. Nivel de decisión  $\alpha \leq 0.05$ .

TIPO DE PRODUCTO	VARIABLE	RELACION F	g. l.	DECISION
EXCRETAS DE GALLINA	PESO	0.4988	6	ACEPTA
EXCRETAS DE VACA	PESO	1.2380	7	ACEPTA
MACROALGA	PESO	2.2780	7	ACEPTA

durante las fases periódicas (Tabla XVIII) y se concluyó que en los tres biodigestores no hubo cambios significativos.

### III.3.- Balance de nitrógeno inorgánico

En base a los valores promedio de nitrógeno (átomos de nitrógeno) medidos durante la etapa periódica en el influente (I) y en el efluente (E) de los tres sistemas de biodigestión, se encontró que las concentraciones de amonía (Tabla XIX) son mayores en el influente y que los nitritos y nitratos son más abundantes en el efluente.

El número total de átomos de nitrógeno calculado para la etapa periódica (Tabla XIX) en el líquido influente es significativamente mayor que en el efluente de los tres sistemas de biodigestión (Tabla XX).

### III.4.- Bioensayos de crecimiento

#### a) Crecimiento de las microalgas

Después de transformar a logaritmos de base dos los valores obtenidos promediando los resultados del recuento diario de las tres repeticiones de cada situación

---

Tabla XIX. Valores promedio ( $\times 10^{23}$ ), diferencias (DIF.) de átomos de las diferentes formas de nitrógeno inorgánico y de su total en el influente (I) y el efluente (E), durante la etapa periódica, para los tres sistemas de biodigestión.

TIPO DE PRODUCTO	$N-NH_4^+$			$N-NO_2^-$			$N-NO_3^-$			TOTAL		
	I	E	DIF	I	E	DIF	I	E	DIF	I	E	DIF
EXCRETAS DE GALLINA	28.5900	4.2710	-24.3190	0.0049	0.0445	0.0396	0.5226	4.1992	3.6766	29.1220	8.5147	-20.6073
EXCRETAS DE VACA	12.9440	1.8333	-11.1107	0.0049	0.0098	0.0089	0.4442	0.3611	0.1169	13.3890	2.4046	-10.9844
MACROALGA	6.7987	3.9857	-2.8130	0.0003	0.0004	0.0001	0.0552	1.8864	1.8312	6.6960	5.8724	-0.8236



Tabla XX. Valores promedio, desviación estándar y prueba de diferencia de medias, con el contenido de nitrógeno inorgánico en el influente y el efluente (durante la etapa periódica), en los tres sistemas de biodigestión.

TIPO DE PRODUCTO	INFLUENTE			EFLUENTE			DECISION ( $\alpha = 0.05$ )
	n	$\bar{X}$ at-gr de N/l	S	n	$\bar{X}$ at-gr de N/l	S	
EXCRETAS DE GALLINA	8	4.8344	0.2330	8	1.4137	0.1350	T = 35.884 SE RECHAZA ( P = 0.0000 )
EXCRETAS DE VACA	9	2.2230	0.3920	9	0.3992	0.0975	T = 13.543 SE RECHAZA ( P = 0.0000 )
MACROALGA	7	1.1117	0.0888	9	0.9750	0.0397	T = 3.791 SE RECHAZA ( P = 0.0068 )

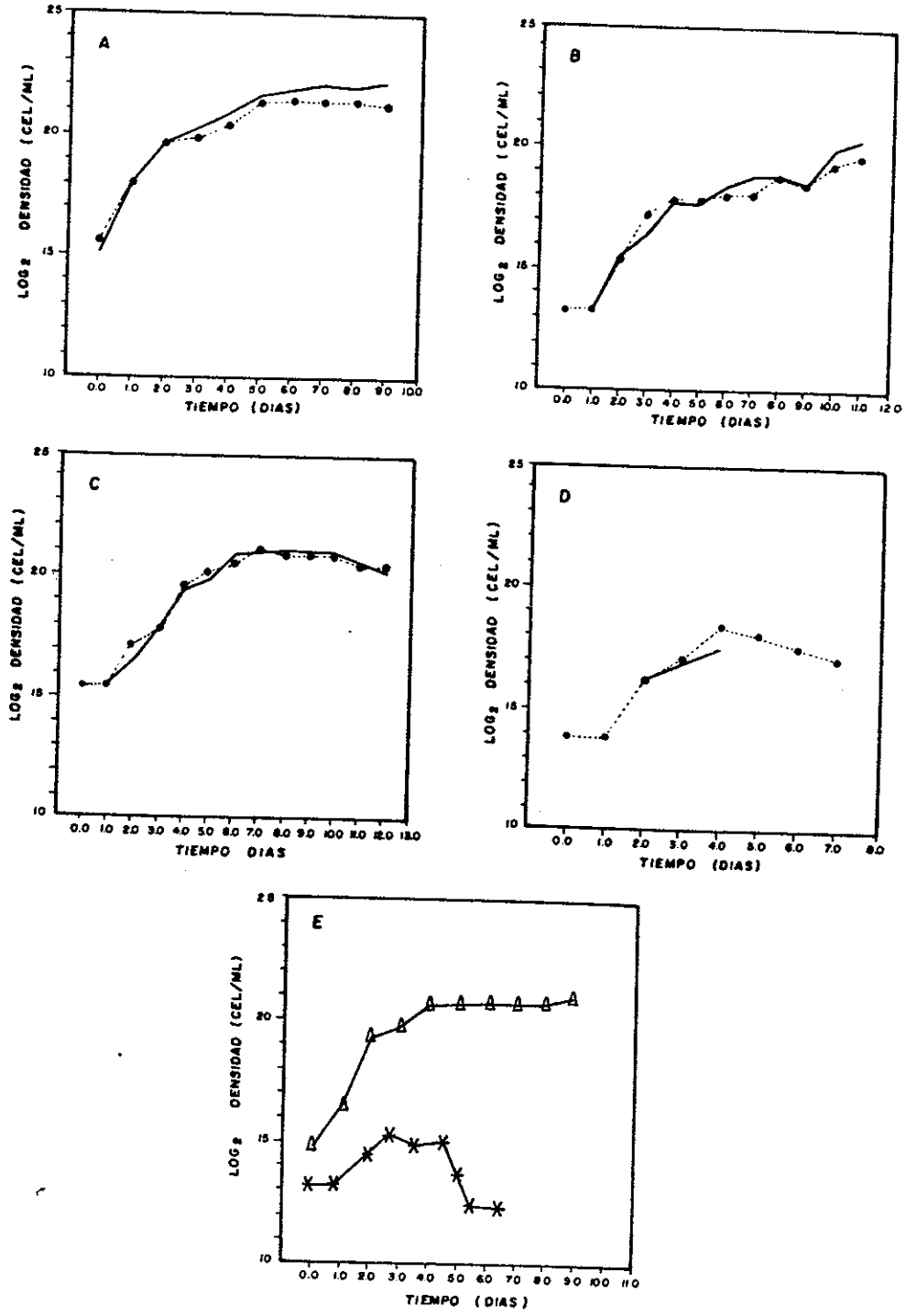


Figura 12. Curvas de crecimiento de *P. lutheri* en el medio químico (trazo continuo) y en el medio orgánico (trazo punteado), cultivadas en Erlenmeyer (A), Fernbach (B), Carboy (C) y Tanque (D). Cultivos con agua de mar sin enriquecer en los Erlenmeyer (E:Δ) y los Fernbach (E: \* ).

experimental: Erlenmeyer, Fernbach, Carboy y Tanque, en el medio orgánico y en el medio control de los bioensayos con P. lutheri, se hicieron las curvas de crecimiento (Fig. 12) y se calcularon los parámetros poblacionales. Un cambio abrupto en los valores de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y del tiempo medio de generación (Tg) se consideró como una indicación del comienzo de la fase estacionaria.

Los cultivos realizados en Erlenmeyer (Fig. 12 A) generaron una fase de crecimiento exponencial del día 0 al 5 de experimentación. Después de esta fecha y hasta el día 9 la densidad de los cultivos se mantuvo aproximadamente constante. Durante la fase exponencial se obtuvo en promedio una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de 1.4410 y un tiempo de generación (Tg) de 1.0742 días y una biomasa máxima:  $317 \times 10^4$  cel/ml en el medio químico y valores de  $\mu$ : 1.1966, Tg: 1.9108 y biomasa máxima:  $258 \times 10^4$  cel/ml en el medio orgánico (Tablas XXI y XXII). Con la prueba de diferencia de medias efectuada con los valores promedio de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) durante la fase de crecimiento exponencial, no se detectó diferencia significativa entre los valores obtenidos (Tabla XXII).

En los cultivos realizados en Fernbach (Fig. 12 B) se encontró una fase de acondicionamiento de un día de duración, después de la cual y hasta el cuarto día continuó una fase de

Tabla XXI. Valores promedio de densidad (cel/ml x 10<sup>4</sup>) y parámetros poblacionales calculados para el medio químico (A) y el medio orgánico (B), en un cultivo de *P. lutheri* en Erlenmeyer.  $\mu$ : tasa de crecimiento específico y Tg: tiempo medio de generación.

A TIEMPO (días)	DENSIDAD	$\mu$	Tg
0	3.42		
1	25.83	2.9171	0.3428
2	81.00	1.6490	0.6064
3	120.17	0.5691	1.7572
4	185.83	0.6289	1.5905
5	317.83	0.7743	1.2915
6	367.00	0.2076	4.8170
7	413.83	0.1731	5.7770
8	401.67	-0.0429	-23.3100
9	441.67	0.1369	7.3046

B TIEMPO (días)	DENSIDAD	$\mu$	Tg
0	5.00		
1	27.50	2.4583	0.4068
2	81.50	1.5699	0.6370
3	94.33	0.2093	4.7781
4	138.00	0.5491	1.8211
5	258.16	0.9036	1.1067
6	264.67	0.0359	27.8725
7	252.16	-0.2698	-14.3345
8	254.66	0.0143	69.9300
9	229.00	-0.1535	-6.5157

Tabla XXII. Valores promedio de la tasa de crecimiento ( $\bar{\mu}$ ) y prueba de diferencias de medias, durante la fase decrecimiento exponencial, así como el tiempo medio de generación ( $\bar{T}_g$ ) durante el mismo período, para los diferentes volúmenes de cultivo en el medio químico (A) y el medio orgánico (B).

VOLUMEN DEL CULTIVO	n	$\bar{\mu}$	S	t	PROBABILIDAD	$\bar{T}_g$
ERLENMEYER						
A	4	1.4410	1.100	0.325	0.7580	1.0742
B	4	1.1966	1.020			1.9108
FERNBACH						
A	3	1.4641	0.651	-0.088	0.9353	0.7787
B	3	1.5147	0.752			0.5187
CARBOY						
A	5	1.0664	0.418	0.183	0.8611	1.1328
B	5	1.0050	0.624			1.0050
TANQUE						
A	3	0.9879	0.599	-0.331	0.7623	1.2389
B	3	1.1445	0.559			1.1069

Tabla XXIII. Valores promedio de densidad (cel/ml x 10<sup>4</sup>) y parámetros poblacionales calculados para el medio químico (A) y el medio orgánico (B), en un cultivo de *P. lutheri* en Fernbach.  $\mu$ : tasa de crecimiento específico y Tg: tiempo medio de generación.

A TIEMPO (días)	DENSIDAD	$\mu$	Tg
0	1.00		
1	1.00		
2	4.50	2.1699	0.4608
3	8.33	0.8883	1.1257
4	21.00	1.3341	0.7495
5	20.00	-0.0704	-14.1992
6	33.00	0.7226	1.3840
7	43.35	0.3933	2.5424
8	42.33	-0.0342	-29.2256
9	31.75	-0.4149	-2.4101
10	90.00	1.5032	0.6652
11	116.50	0.3724	2.6853

B TIEMPO (días)	DENSIDAD	$\mu$	Tg
0	1.00		
1	1.00		
2	4.17	2.0599	0.4854
3	14.80	1.8278	0.5472
4	23.33	0.6564	0.5234
5	23.50	0.0093	107.5083
6	26.00	0.1472	6.7951
7	26.67	0.0365	27.3658
8	44.50	0.7388	1.3535
9	35.33	-0.3332	-3.0012
10	62.50	0.8228	1.2153
11	78.66	0.3322	3.0104

crecimiento exponencial. Posteriormente se detectó una fase estacionaria hasta el día 11. Para este caso, durante la fase de crecimiento exponencial en el medio químico se obtuvo en promedio (Tabla XXIII);  $\mu$ : 1.4641, Tg: 0.7787 y biomasa máxima:  $21 \times 10^4$  cel/ml. Para el medio orgánico se calcularon en promedio  $\mu$ : 1.5147, Tg: 0.5187 y biomasa máxima:  $23.33 \times 10^4$  cel/ml (Tablas XXIII y XXII). Análogamente al caso anterior, con la prueba de diferencia de medias no se detectó diferencia significativa entre los valores promedio de  $\mu$  durante la fase exponencial de los dos cultivos (Tabla XXII).

Los cultivos efectuados en Carboys (Fig. 12 C), como en el experimento en Fernbach, se acondicionaron en un día, seguido de una fase de crecimiento exponencial hasta el día 6 y un crecimiento lento hasta el día 12. Los promedios de los parámetros poblacionales obtenidos durante la segunda fase fueron, para el medio químico,  $\mu$ : 1.0664, Tg: 1.1328 y una biomasa máxima:  $181.5 \times 10^4$  cel/ml. Para el medio orgánico,  $\mu$ : 1.0050, Tg: 1.3744 y biomasa máxima:  $146.5 \times 10^4$  cel/ml (Tablas XXIV y XXII). Como en los dos casos anteriores, no se encontró diferencia significativa en los dos valores promedio de  $\mu$  del medio experimental y del medio químico.

Para los cultivos realizados en Tanques (Fig. 12 D),

Tabla XXIV. Valores promedio de densidad (cel/ml x 10<sup>4</sup>) y parámetros poblacionales calculados para el medio químico (A) y el medio orgánico (B), en el cultivo de *P. lutheri* en Carboy.  $\mu$ : tasa de crecimiento específico y Tg: tiempo medio de generación.

A TIEMPO (días)	DENSIDAD	$\mu$	Tg
0	4.55		
1	4.55		
2	9.33	1.0521	0.9505
3	25.00	1.4218	0.7033
4	69.33	1.4716	0.6795
5	94.00	0.4392	2.2770
6	181.50	0.9491	1.0537
7	201.50	0.1521	6.6159
8	207.50	0.0422	23.7027
9	198.67	-0.0627	-15.9272
10	194.83	-0.0283	-35.4146
11	150.66	-0.3708	-2.6974
12	116.83	-0.3667	-2.7267

B TIEMPO (días)	DENSIDAD	$\mu$	Tg
0	4.55		
1	4.55		
2	14.33	1.6713	0.5984
3	23.17	0.6933	1.4424
4	74.66	1.6879	0.5925
5	110.83	0.5697	1.7553
6	146.50	0.4027	2.4836
7	215.16	0.5548	1.8025
8	182.00	-0.2418	-4.1349
9	180.17	-0.0143	-70.0054
10	173.67	-0.0532	-18.8139
11	144.00	-0.2700	-3.7026
12	133.17	-0.1129	-8.8536



Tabla XXV. Valores promedio de densidad (cel/ml x  $10^4$ ) y parámetros poblacionales calculados para el medio químico (A) y el medio orgánico (B), en un cultivo de P. lutheri en Tanques.  $\mu$ : tasa de crecimiento específico y Tg: tiempo medio de generación.

A TIEMPO (días)	DENSIDAD	$\mu$	Tg
0	2.50		
1	2.50	1.6783	0.5959
2	8.00	0.6089	1.6422
3	12.20	0.6764	1.4785
4	19.50		

B TIEMPO (días)	DENSIDAD	$\mu$	Tg
0	2.50		
1	2.50	1.5853	0.6308
2	7.50	0.5156	1.9396
3	13.50	1.3327	0.7503
4	34.00		

después de un día de acondicionamiento se inició una fase de crecimiento exponencial que duró hasta el día 4. A partir de esa fecha, por problemas en el control de la temperatura ambiental, el cultivo en el medio químico pasó a la fase de muerte y el del medio orgánico mantuvo un crecimiento lento hasta el día 7. Los valores promedio de los parámetros poblacionales durante la fase de crecimiento exponencial (Tabla XXV) en el medio químico fueron,  $\mu$ : 0.9879, Tg: 1.2389 y biomasa máxima:  $19.5 \times 10^4$  cel/ml y respectivamente para el medio orgánico,  $\mu$ : 1.1445, Tg: 1.1069 y biomasa máxima:  $34 \times 10^4$  cel/ml (Tablas XXV y XXII). A este nivel de cultivo tampoco se encontró una diferencia significativa entre los valores promedio de  $\mu$  de los dos medios de cultivo.

En el caso del agua de mar sin enriquecer, los cultivos en Erlenmeyer (Fig. 12) tuvieron un comportamiento similar al observado en el medio químico y en el orgánico. Para este caso se detectó una biomasa máxima en la fase exponencial de  $174 \times 10^4$  cel/ml. En los Fernbach (Fig. 12 E) la fase de acondicionamiento sucedió en un día, a esta siguieron una breve fase de crecimiento exponencial hasta el tercer día y una de crecimiento lento hasta el quinto día, para llegar a la fase de muerte después de esta fecha. La biomasa máxima alcanzada al final de la fase de crecimiento exponencial fue de  $4.1 \times 10^4$  cel/ml.

La temperatura ambiental mínima durante el transcurso de los bioensayos fue de 17.5 °C y la máxima fue de 21.2 °C.

b) Análisis estadístico

Se efectuó un análisis de regresión lineal simple entre el logaritmo de base dos de las densidades celulares obtenidas durante la fase de crecimiento exponencial en los diferentes recipientes y en los dos tipos de medio de cultivo, y se encontró que para todos los casos (Tabla XXVI) se acepta el ajuste a un modelo de regresión lineal.

Con los residuos de las densidades celulares obtenidos de la regresión, se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett y de ajuste a la distribución normal por Kolmogorov-Smirnov, y se encontró que para todos los casos se cumplen las condiciones que fundamentan el análisis de covarianza (Tabla XXVII). Este último no demostró diferencias significativas entre las pendientes y ordenadas de las curvas de crecimiento generadas con los dos medios, por cada tipo de recipiente (Tabla XXVIII).

Para los cultivos realizados a nivel de Tanque, por no tener repeticiones y por el consiguiente bajo número de observaciones, se efectuó una prueba "t" de diferencia de

Tabla XXVI. Prueba de validez estadística para un modelo de regresión lineal y significancia de Beta, con las densidades celulares de *P. lutheri* en los diferentes recipientes y en los dos tipos de medio de cultivo.

		ERLENMEYER		FERNBACH		CARBOY	
		MEDIO QUIMICO	MEDIO ORGANICO	MEDIO QUIMICO	MEDIO ORGANICO	MEDIO QUIMICO	MEDIO ORGANICO
PRUEBA DE VALIDEZ ESTADISTICA PARA UN MODELO DE REGRESION LINEAL	PROBABILIDAD	0.3071	0.1747	0.2902	0.9714	0.5072	0.0549
	DECISION CON $\alpha = 0.05$	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA
	ECUACION DE REGRESION	$Y = 12.87 + 2.30 X$	$Y = 13.68 + 2.03 X$	$Y = 11.97 + 1.49 X$	$Y = 11.41 + 1.88 X$	$Y = 13.99 + 1.31 X$	$Y = 14.27 + 1.27 X$
PRUEBA DE SIGNIFICANCIA DE BETA ( $\beta$ )	PROBABILIDAD	0.0812	0.0755	0.1291	0.0033	0.0042	0.0117
	DECISION CON $\alpha = 0.05$	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	RECHAZA	RECHAZA	RECHAZA



Tabla XXVIII. Análisis de Covarianza con las densidades celulares de P. lutheri, en los diferentes recipientes y en los dos tipos de medio de cultivo.

		ERLENMEYER		FERNBACH		CARBOY	
		MEDIO QUIMICO (MQ)	MEDIO ORGANICO (MO)	MEDIO QUIMICO (MQ)	MEDIO ORGANICO (MO)	MEDIO QUIMICO (MQ)	MEDIO ORGANICO (MO)
HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE BARTLETT	$\chi^2$	1.2672		0.0002		0.4894	
	PROBABILIDAD	0.2603		0.9893		0.4841	
	DECISION CON $\alpha = 0.05$	ACEPTA		ACEPTA		ACEPTA	
HOMOGENEIDAD DE PENDIENTES (H <sub>1</sub> )	PROBABILIDAD	0.4109		0.1114		0.7544	
	DECISION CON $\alpha = 0.05$	ACEPTA		ACEPTA		ACEPTA	
	COMPARACIONES POR PARES VIA S. N. K.	<u>MQ</u> <u>MO</u>		<u>MQ</u> <u>MO</u>		<u>MQ</u> <u>MO</u>	
HOMOGENEIDAD DE ORDENADAS AL ORIGEN (H <sub>0</sub> )	PROBABILIDAD	0.3153		0.2765		0.2079	
	DECISION CON $\alpha = 0.05$	ACEPTA		ACEPTA		ACEPTA	
	COMPARACIONES POR PARES VIA S. N. K.	<u>MQ</u> <u>MO</u>		<u>MQ</u> <u>MO</u>		<u>MQ</u> <u>MO</u>	

Tabla XXIX. Valores promedio, desviación estandar y prueba de diferencia de medias con las densidades celulares de *P. lutheri*, en Tanques y en los dos tipos de medio de cultivo.

T A N Q U E		
	MEDIO QUIMICO	MEDIO ORGANICO
n	4	4
$\bar{X}$	107 500	141 250
S	70 534	141 267
	T = - 0.427	
DECISION	Se acepta la hipotesis de	
con $\alpha = 0.05$	igualdad de medias (P=0.6910).	

medias en base a las densidades celulares obtenidas en los dos tipos de medio de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial. Esta prueba no detectó ninguna diferencia significativa entre los valores de densidad media de P. lutheri obtenidos en el medio experimental y en el medio químico (Tabla XXIX).

### C) Contenido de nitrógeno inorgánico

El contenido de nitrógeno inorgánico calculado para un Carboy con el medio "f" resultó de 345.8 mg de N/Carboy (Tabla XXX).

El contenido total de nitrógeno inorgánico en los 14 l de medio orgánico de un Carboy fue de 12.58 mg. De éstos, el biodigerido de la macroalga aportó casi la tercera parte, a pesar de su bajo contenido de nitrógeno, debido a que en la formulación propuesta por Paniagua-Michel (1984) y utilizada en este trabajo, se utiliza una mayor cantidad de este producto (40 ml/l, comparado con 20 y 10 ml/l de biodigerido de estiércol de vaca y de gallina respectivamente). Los otros dos productos contribuyeron en partes aproximadamente iguales al total de nitrógeno de este medio. El contenido de fosfatos aportado por las excretas de gallina y de vaca fueron respectivamente, 60 y 40 por ciento (Tabla XXX) ya que

---



no se detectaron fosfatos inorgánicos en el biodigerido de macroalga.

La cantidad de nitrógeno celular sintetizada en cada uno de los medios durante la fase de crecimiento exponencial se encuentra en la Tabla XXXI. Esta indica que al día 4 de experimentación el contenido celular de nitrógeno protéico (23.2064 mg/Carboy) en el medio orgánico es superior a la cantidad contenida en el mismo medio (12.5800 mg/Carboy) y tiende a incrementar llegando a alcanzar un valor de 43.9060 mg de nitrógeno al término de la fase exponencial.

La cantidad de nitrógeno celular obtenido en un Carboy con medio químico durante la fase de crecimiento exponencial (Tabla XXXI) se incrementó con el paso del tiempo, variando de 2.9164 al inicio hasta 56.9184 mg al término de dicha fase, cantidad aproximadamente siete veces menor que el contenido de nitrógeno inorgánico del medio.

#### d) Razón atómica

La razón atómica N:P inorgánicos del medio orgánico fue de 120:1 y la del medio químico utilizado como control fue de 10:1.

Tabla XXX. Contenido de nitrógeno y fósforo inorgánico en un Carboy con medio orgánico (A) y medio químico (B).

<b>A</b>			
PRODUCTOS BIODIGERIDOS	CONTENIDO DE NITROGENO mg de N/CARBOY	CONTENIDO DE FOSFORO mg de P/CARBOY	
GALLINA	2.49	0.1439	
VACA	2.14	0.0831	
MACROALGA	7.95		
TOTAL	12.58	0.2270	
RAZON (ATOMO:ATOMO)			
N: P	120:1		
<b>B</b>			
MEDIO "f" de GUILLARD	345.60	31.42	
RAZON (ATOMO:ATOMO)			
N: P	10:1		

Tabla XXXI. Densidad promedio de *P. lutheri* y contenido de nitrógeno celular, durante la fase de crecimiento exponencial, en el medio químico (A) y en el medio orgánico (B).

A	DIA	$\bar{X}$ CEL. $10^3$	mg de N/CARBOY
	0	45	1.4112
	1	45	1.4112
	2	93	2.9164
	3	250	7.8400
	4	693	21.6384
	5	940	29.4784
	6	1815	56.9184
	7	2015	63.1904
	8	2075	65.0720

B	DIA	$\bar{X}$ CEL. $10^3$	mg de N/CARBOY
	0	45	1.4112
	1	45	1.4112
	2	140	4.3404
	3	230	7.2128
	4	746	23.2064
	5	1100	34.4960
	6	1460	43.9040
	7	2150	65.8560

#### IV. DISCUSION

##### Digestor que funcionó con excretas de gallina

Las heces y orina de las aves se juntan en un orificio común (cloaca). Por ésto, el contenido de nitrógeno de sus excretas es más alto que en otros animales con sistemas excretorios separados (Tabla V). Debido a este tipo de evacuación y a su uricotelicidad, las gallinas producen excretas con un alto contenido de ácido úrico, en formas solubles e insolubles, que constituyen la principal fuente de nitrógeno de este producto (Murray et al., 1975).

Como en el caso de otros animales, las características de las excretas de gallina pueden ser afectadas por varios factores, entre los cuales son particularmente importantes el tipo y la composición del alimento, su asimilación, la edad, la salud, el estado fisiológico del animal y las condiciones ambientales (Laak, 1970). Por este motivo, los datos obtenidos durante este trabajo podrían ser limitados a este particular tipo de excretas. Sin embargo, Porras (1981) considera que se puede predecir el rango de variación de las excretas de gallina, que en general se alimentan con piensos

---

balanceados.

La composición química del líquido influente no varió significativamente (Tabla IV) en el transcurso del tiempo, con excepción de los fosfatos que tendieron a incrementarse, posiblemente debido a la acción de alguna bacteria psicrófila o a causa de algún fenómeno autohidrolítico.

El funcionamiento del biodigestor fue estudiado en base a las variables indicadoras del metabolismo bacteriano, como son los cambios en la concentración de los productos nitrogenados (amonía, nitritos y nitratos) y las demandas biológica y química de oxígeno, y a las variables físico-químicas relacionadas con estos procesos (velocidad de flujo, temperatura, pH, concentración de oxígeno). Los cambios observados (Figs. 3, 4 y 5) indicaron la presencia de tres diferentes etapas: inicial, de transición y periódica. Esta secuencia indica que el biodigestor siguió el principio básico de un sistema de filtración biológica, en el cual los valores de amonia tienden a disminuir por acción de las bacterias nitrificantes que oxidan secuencialmente este compuesto a nitritos y nitratos (Wheaton, 1977).

Los organismos de los géneros Nitrosomonas y Nitrobacter, responsables del proceso de nitrificación, son muy comunes en el suelo y en ecosistemas acuáticos (Srinath

et al., 1976). Generalmente, en un filtro biológico existen bacterias autotróficas, entre éstas las nitrificantes, y bacterias heterotróficas. Las bacterias heterotróficas tienen un tiempo de generación más corto que las autotróficas y utilizan sustratos orgánicos. En el ciclo biogeoquímico del nitrógeno algunas bacterias heterotróficas (denitrificantes) tienen la función inversa a las nitrificantes, y necesitan por lo tanto una fuente de nitrógeno inorgánico.

Debido a que la nitrificación es un proceso aeróbico, para la base del filtro se utilizó grava del tamaño y forma que permitiera una buena circulación y oxigenación del medio líquido y favoreciera el desarrollo de las bacterias nitrificantes, las cuales alcanzan rápidamente una alta densidad a partir del inóculo inicial de tierra de jardín (Saeki, 1958).

Otros factores importantes para que se lleve a cabo el proceso de nitrificación son la temperatura, el pH, la salinidad, el área superficial, la ausencia de compuestos tóxicos y la cantidad de materia orgánica disuelta (Spotte, 1979; Tenney et al., 1972).

Wild et al. (1971) mencionan que el pH óptimo para la nitrificación es alrededor de 8.4, y Bishop y Farmer (1978)

señalan como óptimo un rango de 7.0 a 8.0. Niveles bajos de pH pueden causar la inhibición de las bacterias (Prakasam y Loehr, 1972; Bishop y Farmer, op.cit.). Aunque el proceso de nitrificación puede causar un descenso en el pH, la producción de iones hidrógeno en los biodigestores diseñados fue compensada por el complejo carbonáceo de los restos de concha del piso de grava, que actuó como un sistema amortiguador; éste resultó en un valor promedio de pH de  $7.8 \pm 0.2$ .

A bajas concentraciones de oxígeno disuelto (menores a 1.0 mg/l) las bacterias nitrificantes cesan su actividad y se inicia un proceso de denitrificación, que es la reducción subsecuente de nitratos a nitrógeno gaseoso; ésto no pudo suceder en este sistema de biodigestión, ya que durante toda la fase experimental los niveles de oxígeno estuvieron cercanos a la saturación.

La temperatura, el oxígeno y el pH (Fig. 5, Tabla VII) del líquido efluente se mantuvieron en valores que permiten un buen proceso de nitrificación (Bower y Tuner, 1983) y no tuvieron cambios significativos ( $\alpha \leq 0.05$ ) durante el experimento. Por lo tanto, la población de bacterias oxidó rápidamente el amoníaco hasta nitratos, con una formación poco importante de nitritos (Fig. 3).

Cuando se introducen altas cargas orgánicas, que tienen una alta DBO, a sistemas de tratamiento de aguas residuales, se produce un déficit de oxígeno que puede llegar a traducirse en una situación anóxica (baja DQO). En esta situación proliferan las bacterias heterotróficas que desplazan a las nitrificantes (Irgens y Halvorson, 1965; Prakasam y Loehr, op.cit.; Hockenbury et al., 1977; Green et al., 1981). Por este motivo la DBO y la DQO se consideran parámetros indicadores de la facilidad de degradación de los productos orgánicos (Green et al., op.cit). Por lo anterior, la razón DBO/DQO es un índice de la degradabilidad de la materia orgánica y también puede ser considerada como un factor de carga en sistemas de tratamiento de desechos (Reece et al., 1979; Hopwood y Barnes, 1982). En los sistemas de biodigestión aeróbica discontinuos, los contornos de mejor nitrificación tienden a desplazarse hacia valores relativamente altos de la razón DBO/DQO (Paniagua- Michel, 1984).

En este caso se encontraron valores altos de DQO en la etapa inicial y de transición que disminuyeron considerablemente en la siguiente etapa (Fig. 4). El comportamiento de la DBO fue inverso mientras que la razón DBO/DQO fue similar a la DBO durante las dos primeras etapas y se incrementó en la última (Fig. 7).



El lento crecimiento de las bacterias, y su posible lento acondicionamiento a las altas concentraciones iniciales de amonía (90.77 mg/l) pudo haber causado la larga duración (25 días) de la etapa inicial.

Al iniciar la incorporación de nuevo material, el sistema se demoró 20 días para reacondicionarse. La larga duración de valores altos de amonía en el líquido efluente parece indicar que la población de bacterias no era suficiente para una completa nitrificación.

Durante la etapa periódica, se generó un equilibrio en la velocidad de oxidación dentro del sistema y la cantidad de materia orgánica adicionada periódicamente. En esta etapa la razón DBO/DQO, fue la más alta. De acuerdo con Paniagua-Michel (op.cit.), ésto indica una mayor nitrificación.

Con la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla VIII), efectuada con cada una de las variables, se pudo comprobar que existe un cambio significativo ( $\alpha \leq 0.05$ ) en la calidad del producto antes y después de pasar por el sistema de biodigestión. Estos cambios son causados por los procesos biológicos y químicos que ocurren en el interior del sistema, y resultan en un abatimiento de aproximadamente el 80 por ciento del contenido amoniacal.

### Digestor que funcionó con excretas de vaca

Las excretas de vaca contienen altas cantidades de celulosa, debido al tipo de alimentación de estos organismos. Su concentración de nitrógeno orgánico no es tan alta como en la gallinaza (Tabla II).

Para este producto se encontró que el método de preservación por congelamiento generó cambios en la DBO, la DQO y los fosfatos (Tabla IX). Estos cambios podrían atribuirse, como para el primer biodigestor, a procesos microbiológicos o químicos. Este sistema siguió la secuencia básica de nitrificación con las tres etapas descritas y discutidas en el caso anterior (Fig. 6). La etapa inicial tuvo una duración menor a lo encontrado en el primer biodigestor, lo cual puede atribuirse al bajo contenido de amonía en el estiércol de vaca. Las posibles consecuencias de altas concentraciones de este compuesto sobre la duración de las etapas inicial y de transición ya se discutieron para el primer sistema.

La gran cantidad de fibras vegetales contenida en este producto causaron una baja en la velocidad del flujo (de 3.5

a 0.5 l/min), que pudo ser la causa de la larga duración (25 días) de la etapa de transición.

La progresiva disminución de la concentración de los nitratos es un indicador del reacondicionamiento. Una vez logrado el equilibrio, el proceso resultó en una producción limitada de nitratos (6.0 mg/l) debido a la baja concentración inicial de nitrógeno amoniacal, que aparentemente es utilizado en gran parte para la formación y el mantenimiento de la población de bacterias nitrificantes. Esto lo confirmaron el rápido aumento de la DBO durante los primeros diez días de la etapa de transición y la estabilización de este parámetro en la fase sucesiva.

La estabilidad de las variables de nitrificación y de razón de carga después del día 35 de experimentación, indicó que el sistema había logrado el equilibrio entre los procesos de oxidación y la adición periódica de materia orgánica (etapa periódica).

El cambio significativo en la calidad de los líquidos influente y efluente (Tabla VIII) indicó que el sistema funcionó eficientemente como filtro biológico, dadas las bajas concentraciones de nitrógeno amoniacal (5.5 mg/l, Tabla V) en el efluente. A la vez, las bajas cantidades de nitratos producidos indicaron que la mayor parte del

nitrógeno inorgánico se incorporó a la fracción sólida.

#### Biodigestor que funcionó con macroalgas

La composición bioquímica de M. pyrifera está influenciada por la cantidad de nutrientes disponibles en el medio y por factores ambientales como la temperatura, la luz y la salinidad (North, 1986). Por este motivo, los resultados que se obtuvieron durante este trabajo podrían variar según la época de colecta de la materia prima.

La preservación de la macroalga por congelamiento fue excelente, dada la ausencia de cambios significativos en la calidad del líquido influente durante el período de experimentación (Tabla XIII).

Para este sistema de biodigestión ocurrió básicamente lo mismo que en el sistema que funcionó con excretas de vaca. Sin embargo, la secuencia de nitrificación presentó algunas irregularidades iniciales, como las altas concentraciones de amonía y de nitratos durante los primeros 25 días (Figs. 9, 10 y 11). Estas fueron reflejadas en valores altos de la DBO durante parte de este período, que parecen indicar una alta actividad heterotrófica de tipo aeróbico. La falta de

variación de los otros parámetros no permite una interpretación definitiva de este comportamiento. La secuencia de nitrificación ocurrió normalmente después de este intervalo de tiempo y durante toda la etapa periódica.

Los extractos de M. pyrifera pueden actuar como antibióticos para las bacterias marinas (Provasoli, 1982), ya que tienen altas cantidades de fenoles que pueden tener un efecto bactericida (Glombitza, 1977). Lo anterior podría ser la causa de la larga duración de la etapa de transición. Además el alto contenido de carbohidratos de esta macroalga (Frey, 1971) y la consecuentemente alta DBO (Fig. 10) pudieron contribuir a la disminución de la tasa de nitrificación durante la etapa de transición (Fig. 9) (30 días para alcanzar la fase de equilibrio, comparado con 20 y 25 días para los otros sistemas).

#### Sistema de remoción de sólidos (S.R.S.)

La falta de una diferencia significativa en los valores de sólidos recuperados en los sistemas de remoción (Tabla XVII) durante la etapa periódica, indica que se logró el equilibrio entre la carga adicionada y la capacidad de oxidación de la materia orgánica.

Recientemente Paniagua-Michel y Granados-Machuca (1987), plantearon la posibilidad de utilizar estos sólidos residuales de la biodigestión aeróbica y compararon el contenido de proteínas, aminoácidos, grasas, fibra y carbohidratos con los valores reportados en las harinas utilizadas para la fabricación de dietas convencionales para peces y crustáceos de importancia en la Acuicultura. Sus resultados sugieren que estos residuos podrían substituir por lo menos parcialmente las harinas convencionales.

Sin embargo, Cordero-Esquivel (1988) utilizó harina de sardina junto con residuos sólidos de la biodigestión de estiercoles de vaca y gallina para la fabricación de dietas para Procambarus clarkii y encontró que independientemente de su valor nutritivo, esta dieta no fue aceptada posiblemente debido a su baja palatabilidad.

La cantidad de sólidos recuperados en estos sistemas de biodigestión es considerable (Tabla XVII). Por este motivo, se tendría que intentar mejorar la aceptación de los alimentos preparados con estos residuos, por ejemplo incluyendo en la dieta algún atrayente químico.

#### Balance de nitrógeno

---

Los valores promedio de nitrógeno inorgánico obtenidos en la secuencia de nitrificación en el influente y el efluente de los tres sistemas (Tabla XIX), proporcionan otro argumento más de que éstos funcionaron básicamente como un sistema de filtración biológica (o de tratamiento de aguas residuales), ya que existe una pérdida neta de átomos de nitrógeno inorgánico por el efecto del proceso de biodigestión, que van a formar la biomasa de bacterias necesaria para este proceso.

La prueba de diferencia de medias efectuada con los valores promedio de nitrógeno inorgánico en el influente y el efluente de los sistemas (Tabla XIX), indican que la disminución es significativa.

#### Bioensayos de crecimiento

Para los bioensayos de crecimiento se seleccionó la microalga Pavlova lutheri por ser una especie que tiene requerimientos complejos, que ha sido ampliamente utilizada en trabajos de fisiología y que, por sus características morfológicas, de crecimiento y de composición proximal, es una especie muy utilizada en Acuicultura (Parsons et al., 1961; Droop, 1975 a y b; Sakshaug y Holm-Hansen, 1977;

Moal et al., 1978). Además, se eligió trabajar con esta especie para poder comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados por Paniagua-Michel (1984). Para este fin, se decidió elaborar el medio de cultivo según la formulación propuesta por Paniagua-Michel (op.cit.) que resultó ser, según el mismo autor, la más efectiva en promover el crecimiento de esta microalga, al compararlo con los medios preparados con los mismos biodigeridos utilizados individualmente (Paniagua-Michel y Granados-Machuca, 1981).

Al comparar las curvas y los valores promedio de la tasa de crecimiento (Tabla XXV) en los cultivos realizados a nivel de Erlenmeyer, Fernbach y Carboy (Fig. 12), en el medio químico y en el medio orgánico producido periódicamente, no se encontró una diferencia significativa (Tabla XXVIII). Sin embargo, la biomasa final producida en el medio químico fue mayor que la del medio orgánico (entre 30 y 100 por ciento más alta en el primero) en los recipientes de volumen inferior, resultando más baja en el medio control sólo en el caso de los cultivos en Tanque.

Cuando las tasas de crecimiento específico y las pendientes de las curvas de crecimiento en la fase exponencial son iguales, existe la misma razón de crecimiento, que indica que en el medio orgánico no existen inicialmente nutrientes limitantes. Tal limitación sólo se



hizo evidente al alcanzar la fase de lento crecimiento y resultó en una producción final inferior. Este fenómeno no se presentó en el experimento en Tanques, probablemente debido a su corta duración.

En el caso del agua de mar sin enriquecer a nivel de Erlenmeyer, se encontró el mismo comportamiento descrito para los dos medios de cultivo. Sin embargo, la biomasa final fue casi la mitad de la producida en el medio químico. Para los cultivos efectuados en Fernbach, se encontró que el agua de mar sin enriquecer no fue capaz de mantener el crecimiento de las microalgas.

La explicación más probable para el igual crecimiento en el primer caso, aunque con densidades finales inferiores, es la capacidad de esta especie de acumular reservas intracelulares de nutrientes (Droop, 1975b) suficientes sólo para un número limitado de generaciones. Esto explicaría la menor concentración celular en el primer experimento, y la casi total falta de crecimiento en el siguiente.

#### Contenido de nitrógeno inorgánico

Al comparar los valores de nitrógeno inorgánico en un

Carboy con medio químico y con medio orgánico, se encontró que la cantidad de nitrógeno inorgánico en el primero era aproximadamente 27 veces más alto que en el segundo. A pesar de ésto el crecimiento en los dos tipos de medio fue similar, por lo menos durante la fase exponencial, y el contenido de nitrógeno protéico celular no fue muy diferente (Tabla XXXI). En el caso del medio orgánico esta cantidad resultó ser, al final de tal fase, más de tres veces superior al total del nitrógeno inorgánico de ese medio. Este resultado indica la existencia de una fuente adicional de nitrógeno, necesariamente en una forma orgánica utilizable por las microalgas. En el caso del medio inorgánico la cantidad de proteínas producidas es equivalente al 17 por ciento del nitrógeno inorgánico presente.

La mayoría de las microalgas pueden utilizar los nitratos, nitritos o amonía como fuente de nitrógeno. Sin embargo, en las aguas naturales, el nitrito no es un compuesto tan abundante como son las otras formas de nitrógeno. La capacidad de utilizar varias formas de nitrógeno orgánico, particularmente urea, es bastante común en el fitoplancton. En general, se ha encontrado que las algas prefieren el amonía a los nitratos, al grado que concentraciones de amonía superiores a 0.5 - 1.0 micromoles por litro inhiben la incorporación de los nitratos. La explicación comunmente aceptada es que las microalgas pueden

---

conservar energía al utilizar el amoníaco, debido a que el nitrato debe ser reducido por la célula antes de poder ser incorporado en los aminoácidos (Darley, 1987; Conover, 1975; Antia et al., 1975; Ojeda y Alfonso, 1986). La misma explicación resulta del modelo de Kmet (1987).

McIsaac y Dugdale (1969) encontraron que cuando el alga toma el amoníaco del medio, se inhibe la asimilación del nitrato por inactivación del sistema de la nitrato reductasa, la enzima que reduce el nitrato a nitrito.

Rhee (1978) indicó que existe un estado de transición entre el crecimiento limitado por el nitrógeno y el limitado por el fósforo en Scenedesmus sp. en un sistema de quemostato donde, al aumentar la concentración de nitrógeno, encontró que el crecimiento celular está limitado por nitrógeno cuando la razón N:P es menor o igual a 30; para valores más altos la limitación está generada por el fósforo.

En condiciones de crecimiento exponencial en un medio no limitante la razón atómica N:P celular de las microalgas es aproximadamente igual a 15:1, razón descrita como representativa de la composición promedio de la materia viva en 1958 por Redfield. Dado que la tasa de crecimiento en el medio orgánico fue igual a la calculada para el medio "f" que se postuló como no limitante, se puede concluir que la razón

atómica N:P celular en las microalgas crecidas en los dos medios es aproximadamente igual al valor 15:1 descrito en la literatura (Parsons et al., 1961; Ryther y Dunstan, 1971). Por lo tanto, si durante la fase de crecimiento exponencial el máximo valor de nitrógeno celular estimado fue 3.1360 mg at/Carboy (43.904 mg/Carboy), el contenido de fósforo en las células sería alrededor de 0.2091 mg at/Carboy (6.4821 mg/Carboy).

Al comparar los valores del fósforo celular estimado y del fósforo en el medio de cultivo experimental (0.0075 mg at/Carboy o 0.2270 mg/Carboy), ocurre algo similar a lo encontrado para el nitrógeno: el fósforo estimado en el interior de las células es unas 30 veces mayor que lo que aporta la porción inorgánica del medio. Esto demuestra que existe otra fuente de fósforo accesible a las microalgas, que no resulta de la razón N:P calculada para el medio orgánico (120:1) que incluye solamente las porciones inorgánicas.

### Evaluación de sistemas

Los resultados obtenidos son difícilmente comparables a los de otros autores o sistemas, debido a una serie de factores, sólo algunos de ellos ponderables. Variaciones en

la calidad del producto primario podrían de hecho causar cambios en el equilibrio de un mismo sistema y derivar en productos finales muy diferentes de los obtenidos durante este trabajo, para el cual se utilizaron materias primas de calidad constante. Tales cambios podrían causar, en su expresión más extrema, la disrupción completa del equilibrio y la terminación del proceso de nitrificación. Por lo tanto, en el caso de usar materia prima de calidad variable, debe controlarse su calidad antes de introducirla al sistema, y variar en consecuencia el porcentaje de carga.

Entre todas las cargas orgánicas ensayadas, las seleccionadas fueron las más adecuadas y resultaron en un proceso de nitrificación cuyas tendencias corresponden, durante la etapa inicial, a las descritas por Paniagua-Michel (1984), lo cual era de esperarse dado que se utilizaron las mismas cargas orgánicas y se mantuvieron las condiciones experimentales especificadas por este autor.

Desde el punto de vista cuantitativo una comparación absoluta resulta difícil, dadas las diferencias entre la calidad de las materias primas, los tipos de sistema, y entre los criterios de determinación del momento de cosecha, mismos que determinaron la duración del proceso de tratamiento. Paniagua-Michel (1984), dió por terminado el proceso en el momento de la obtención de la máxima concentración de

---

nutrientes, mientras que en este trabajo se consideró más importante la estabilidad del sistema, sin considerar las cantidades producidas. Debido a estos problemas, se decidió comparar las concentraciones de nutrientes del medio orgánico de Paniagua-Michel (1984) y del preparado para este trabajo.

Los resultados de esta comparación fueron que los dos medios contienen la misma cantidad de nitrógeno inorgánico (0.896 mg/l y 0.899 mg/l en el preparado con biodigeridos del sistema estático y periódico, respectivamente). Para el fósforo, el sistema periódico resultó en un medio con 0.016 mg/l; con la cosecha del sistema de alimentación estática se obtuvo un medio tres veces más rico en este elemento (0.052 mg/l).

Para lograr estos resultados, la biodigestión de las excretas de gallina, de vaca y de macroalga en los sistemas estáticos requirieron un total de 55, 50 y 65 días desde el inicio de su acondicionamiento (Paniagua-Michel, 1984). Suponiendo que un modelo de las mismas dimensiones del experimentado en este trabajo hubiera permitido la cosecha del total del líquido introducido (100 l), tal cosecha se hubiera podido repetir con las frecuencias mencionadas. Con el sistema periódico, cuyos volúmenes de cosecha fueron 5, 10 y 10 l cada 5 días para estiércol de gallina, estiércol de vaca y licuado de macroalga, con los mismos períodos, la

cosecha total de extractos biodigeridos desde el inicio de la etapa periódica, hubiera resultado respectivamente en 55, 100 y 130 l.

Sin embargo, cabe mencionar que los biodigestores de producción periódica resultaron más eficientes debido a la posibilidad de una producción semicontinua de cantidades comparables de extractos, sin la necesidad de un reacondicionamiento total del sistema después de cada cosecha.

A pesar de las diferentes épocas y condiciones experimentales de los bioensayos con microalgas (tipo y calidad de inóculo, tipo de recipientes, iluminación, etc.), las biomásas producidas por unidad de volumen resultaron del mismo orden de magnitud. Lo que es más importante, no resultaron significativamente diferentes del medio control utilizado en ambos casos.

Tal crecimiento demuestra que los líquidos efluentes de estos sistemas de biodigestión pueden ser utilizados como fertilizantes para el crecimiento de microalgas, a pesar de su aparente baja concentración de nutrientes.

Los resultados de crecimiento obtenidos con la microalga P. lutheri son indicadores de la efectividad del medio

orgánico ensayado, y no de la posibilidad de utilizar el efluente de cualquier proceso de biodigestión para esta microalga. Es decir que, justamente por los complejos requerimientos nutricionales de la microalga utilizada, un producto de calidad ligeramente diversa pudiera haber dado diferentes resultados.

Lo anterior no significa que productos de la biodigestión de sustancias orgánicas no se puedan utilizar para el cultivo de microalgas; sólo sirve para puntualizar el hecho que la selección de esta particular especie se hizo únicamente a fines de comparación con los resultados obtenidos con un diseño diferente de biodigestión de productos análogos, y para averiguar si la mezcla de los tres extractos facilita los micronutrientes esenciales para P. lutheri. Otras especies, otras formulaciones y materias primas diferentes podrían resultar en un mejor o peor crecimiento, dependiendo de una serie de factores cuyo estudio no era parte de las finalidades de este trabajo.

Queda por demostrar que la adopción de sistemas de este tipo, que resultan en un balance negativo de nitrógeno y en la producción preferencial de formas oxidadas de este elemento, es la mejor manera de aprovechar las materias primas utilizadas, sobre todo tomando en cuenta la preferencia de las microalgas por formas reducidas de



nitrógeno.

Varios autores demostraron la factibilidad de utilizar directamente desechos orgánicos para esta finalidad (Dunstan y Menzel, 1971; Goldman y Ryther, 1975; De la Cruz y Alfonso, 1975; Tarifeño-Silva et al., 1982 a y b). Es sin embargo, indudable que en muchas regiones la producción de tales desechos supera la posibilidad de su utilización directa, por lo cual es necesario emplear sistemas de tratamiento. Los efluentes de estos sistemas, cuya concentración de nutrientes es todavía muy elevada y capaz de mantener una alta productividad orgánica, podrían emplearse provechosamente en sistemas de tratamiento terciario, que disminuiría los nutrientes, con el consiguiente mejoramiento de la calidad del agua, y con la ventaja de producir cosechas adicionales y utilizar los productos sintetizados por las microalgas.

## V. CONCLUSIONES

1.- Las cargas del 5 por ciento (excretas de gallina) y 10 por ciento (excretas de vaca y macroalga) fueron las que permitieron el funcionamiento mecánico de los biodigestores y un proceso de nitrificación equilibrado. La discontinuidad de alimentación de los biodigestores resultó en la definición de tres etapas típicas de este tipo de sistema, que son la inicial, o de acondicionamiento a la cantidad de carga y a la velocidad de flujo, la de transición, o de acondicionamiento a la periodicidad de alimentación, y la periódica, durante la cual se estableció el equilibrio entre la alimentación y el proceso de nitrificación. Este equilibrio se refleja también en la falta de variación de los residuos sólidos recuperados durante la tercera etapa.

2.- El balance de nitrógeno resultó ser negativo, con una pérdida neta, durante el proceso de biodigestión, del 70.0 por ciento, del 82.0 por ciento y del 11.9 por ciento de nitrógeno inorgánico total en los biodigestores que funcionaron con excretas de gallina, de vaca, y con la macroalga respectivamente.

3.- El medio orgánico para cultivar microalgas, formulado a partir de los productos de la biodigestión, es capaz de mantener el crecimiento de Pavlova lutheri. Después

---

que las microalgas utilizaron las reservas intracelulares originales del medio "f" de Guillard, no se encontró una diferencia significativa entre el crecimiento celular obtenido con el medio químico y con el medio orgánico, que a su vez fueron diferentes del blanco (agua de mar sin enriquecer).

4.- El contenido inicial de nitrógeno y fósforo inorgánicos del medio experimental orgánico fueron inferiores a las concentraciones de nitrógeno y de fósforo celulares calculados con la biomasa producida en el mismo medio. De esto se infiere que en el biodigerido existen otras fuentes utilizables de productos nitrogenados y fosfatados accesibles a las microalgas.

5.- Los resultados obtenidos se refieren a un tipo de producto inicial de calidad estable, que podrían no ser reproducibles utilizando productos del mismo origen pero de calidad desconocida, que podrían causar desequilibrios en el proceso de nitrificación.

6.- El medio formulado con los extractos de biodigeridos obtenidos por alimentación periódica en las proporciones sugeridas por Paniagua-Michel (1984) dió resultados comparables con los obtenidos por el mismo autor, quien usó biodigestores no periódicos. Como en el caso anterior, esto

demuestra que la biodigestión de los productos utilizados facilita los nutrientes esenciales para el crecimiento de P. lutheri, aunque queda por demostrar que productos de diferente calidad inicial puedan proporcionar los mismos resultados, y que otras microalgas puedan igualmente obtener de este medio los nutrientes necesarios para su crecimiento.

## VI. RECOMENDACIONES

1.- Analizar las fracciones de nitrógeno y fósforo orgánico e inorgánico del medio de cultivo formulado con líquido de los biodigestores, y compararlas con las fracciones del líquido influente de los sistemas de biodigestión para calcular el déficit real de estos elementos.

2.- Comparar la efectividad de medios orgánicos formulados con los mismos productos con y sin digerir, para hacer crecer las microalgas.

3.- Ensayar medios orgánicos biodigeridos y sin digerir con otras especies de microalgas y comparar su calidad y valor alimenticio para averiguar la efectividad del proceso de biodigestión en facilitar nutrientes esenciales, y la posible utilización de este método para la formulación de otros medios.

## LITERATURA CITADA

- Adams, C.E., W. Eckenfelder, y R.T. Stein. 1974. Modifications to aerobic digestors design. Wat. Res. 8:213-218.
- Antia, N.J., B.R. Berland, D.J. Bonin y S.Y. Maestrini. 1975. Comparative evaluation of certain organic and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 55:519-539.
- A.P.H.A. 1980. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, New York. 15th ed. 1134 pp.
- Baquedaño, M.M., M.A. Young y H.L. Morales. 1979. Los digestores: energía y fertilizantes para el desarrollo rural. Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos. México, 5-34 pp.
- Becker, E.W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. En: Richmond, A. (ed). Handbook of Microalgal Mass Cultures. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Bishop, P.L. y M. Farmer. 1978. Fate of nutrients during aerobic digestion. J. Environ. Eng. Div. EE5:967-979.
- Bower, C.E. y D.T. Tuner. 1983. Nitrification in closed seawater culture systems: effects of nutrient deprivation. Aquaculture 34:85-92.
- Brody, O. 1979. Effects of design on economy of aerobic digestion. J. Environ. Eng. Div. EE2:383-400.
- Conover, S.A.M. 1975. Partitioning of nitrogen and carbon in cultures of the marine diatom Thalassiosira fluviatilis supplied with nitrate, ammonium, or urea. Mar. Biol. 32:231-246.
- Cordero-Esquivel, B. 1988. Evaluación de tres dietas artificiales para Procambarus clarkii (Girard): (Decapoda-Cambaridae), en condiciones de laboratorio. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Tesis de Maestría. México. 83 pp.
- Darley, W.M. 1987. Biología de las Algas: enfoque

- fisiológico. Ed. Limusa, México. 236 pp.
- De la Cruz, A.S. y E. Alfonso. 1975. Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. Centro de Información Científica y Técnica. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba. Ciencias. Serie 8, Investigaciones Marinas No. 17, abril. 25 pp.
- De Pauw, N., E. Bruggerman y G. Persoone. 1978. Research on the tertiary treatment of swine waste by mass culturing of algae. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21:490-506.
- De Pauw, N. y L.D. Leenheer. 1979. Mass culturing of marine and freshwater algae on aerated swine manure. En: Styczynska-Jurewicz, E., T. Backiel, E. Jaspers y G. Persoone (ed). Cultivation of fish fry and its live food. Proc. Conf. Szybnork, Poland 23-28. September 1977. European Mariculture Society, Spec. Publ. No. 4:441-443.
- Droop, M.R. 1975 a. The chemostat in mariculture. 10th European Symposium on Mariculture Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23. Vol. 1:71-93.
- Droop, M.R. 1975 b. The nutrient status of algal cells in batch culture. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 55:541-555.
- Dunstan, W.M. y D.W. Menzel. 1971. Continuous culture of natural populations of phytoplankton in dilute, treated sewage effluent. Limnol. Oceanogr. 16:623-632.
- Dunstan, W.M. y R.R. Tenore. 1972. Intensive outdoor culture of marine phytoplankton enriched with treated sewage effluent. Aquaculture 1:181-192.
- Ehrlich, S. 1965. Two experiments in the biological clarification of stabilization-pond effluents. Hydrobiologia 27:70-80.
- Frey, H.W. 1971. California's living marine resources and their utilization. California Dept. of Fish and Game. 148 pp.
- Gabbot, P.A., D.A. Jones y D.H. Nichols. 1976. Studies on the design and acceptability of microencapsulated diets for marine particle feeders. II. Bivalve molluscs. In: Proc. 10th Europ. Symp. Mar. Biol. 1:127-141.
- Gallager, S.M. y R. Mann. 1982. The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankter Thalassiosira pseudonana (3H) on its food value to the bivalve Tapes

- japonica. Aquaculture 26:95-105.
- Glombitza, K.W. 1977. Highly hydroxylated phenols of the phaeophyceae. 191-210. En: Faulkner, D.J. y W.H. Fenical (ed). Marine Natural Products Chemistry. Plenum Press, New York. 433 pp.
- Goldman, J.C. 1976. Phytoplankton response to waste-water nutrient enrichment in continuous culture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 23:31-43.
- Goldman, J.C. y H.I. Stanley. 1974. Relative growth of different species of marine algae in wastewater - seawater mixtures. Mar. Biol. 28:17-25.
- Goldman, J.C., K.R. Tenore, J.H. Ryther y N. Corwin. 1974 a. Inorganic nitrogen removal in a combined tertiary treatment - marine aquaculture system - I. removal efficiencies. Wat. Res. 8:45-54.
- Goldman, J.C., K.R. Tenore y H.I. Stanley. 1974 b. Inorganic nitrogen removal in a combined tertiary treatment - marine aquaculture system - II. algal bioassays. Wat. Res. 8:55-59.
- Goldman, J.C. y J.H. Ryther. 1975. Nutrient transformations in mass cultures of marine algae. J. Environ. Eng. Div. EE3:351-364.
- Gonzalez-Rodríguez, E. y S.Y. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. Aquaculture 36:245-256.
- Gordon, M.S., D.J. Chapman, L.Y. Kawasaki, E. Tarifeño-Silva y D.P. Yu. 1982. Aquacultural approaches to recycling of dissolved nutrients in secondarily treated domestic wastewater IV: conclusions, design and operational considerations for artificial food chain. Wat. Res. 16:67-71.
- Granados-Machuca, C. y L.F. Bückle-Ramirez. 1984. Cultivo de las microalgas Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con nutrientes producidos por estiércoles biodigeridos. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 11:241-256.
- Gray, K.R. y A.J. Biddlestone. 1974. Decomposition of urban waste. En: Dickinson, C.H. y G.I. Pugh. (ed). Biology of plant litter decomposition. Vol. 2. Academic Press, London, 175 pp.



- Green, M., G. Shelef y R. Moraine. 1981. Chemical and biochemical oxygen demand as indicators of biodegradable substrate concentration. *Wat. Pollut. Control Fed.* 1981, 655-658.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Guillard, R.R. 1973. Division rates, pp. 289-311. En: Stein, J.R. (ed). *Handbook of Phycological Methods.* Cambridge University Press., New York. 448 pp.
- Hach Company. 1981. DR-El/4 Methods. En: *Hach Manual.* Hach Co. Loveland, Colorado. 66pp.
- Hockenbury, M.R., G.T. Daigger y L.C. Grady. 1977. Factors affecting nitrification. *J. Environ. Eng. Div.* EE1:9-19.
- Hopwood, A.P. y L.M. Barnes. 1982. First impressions of a novel aeration system for activated plants. *Wat. Pollut. Control Fed.* 1982,412-424.
- Irgens, R.L. y H.O. Halvorson. 1965. Removal of plant nutrient by means of aerobic stabilization of sludge. *Applied Microbiology* 13:373-386.
- Kawasaki, L.Y., E. Tarifeño-Silva, D.P. Yu., M.S. Gordon y D.J. Chapman. 1982. Aquacultural approaches to recycling of dissolved nutrients in secondary treated domestic waste water I: nutrient uptake and release by artificial food chains. *Wat. Res.* 16:37-49.
- Kinne, O. 1976. *Marine Ecology.* Vol. 3. Part. 1: cultivation. John Wiley and Sons, London. 367-465.
- Kmet, T. 1987. Why phytoplankton prefers ammonium to nitrate - explanation by mathematical model. *Biologia (Bratislava)* 42:687-693.
- Laak, R. 1970. Cattle, swine and chicken manure challenges waste disposal methods. *Water and Sewage Works.* 1970, 134-138.
- Laing, I. 1987. The use of artificial diets in rearing bivalve spat. *Aquaculture* 65:243-249.
- Laing, I. y P.F. Millican. 1986. Relative growth and growth efficiency of Ostrea edulis L. spat fed various algal

- diets. *Aquaculture* 54: 245-262.
- Laing, I., S.D. Utting y R.W.S. Kiloda. 1987. Interactive effect of diet and temperature on the growth of juvenile clams. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 13:23-38.
- Langdon, C.J. y M.J. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 61:431-448.
- Langdon, C.J. y C.A. Siegfried 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture* 39:135-153.
- Langdon, C.J., D.M. Levine y D.A. Jones. 1985. Microparticulate feeds for marine suspension feeders. *J. Microencap.* 2:1-11.
- Loehr, R. 1965. Aerobic digestion: factors affecting design. *Wat. and Sewage Works.* 1965, 169-180.
- MacIsaac, J.A. y R.C. Dugdale. 1969. The kinetics of nitrate and ammonia uptake by natural populations of marine phytoplankton. *Deep Sea Res.* 16:45-57.
- Martin, D. y R.H. Loehr. 1976. Demonstration of aeration systems for poultry wastes. EPA-600/2-76. 98 pp.
- Mathiessen, G.C. y R.C. Toner. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard. *Duke's Country, Massachusetts Mar. Res. Found.* 138 pp.
- Moal, J., J.F. Samain, y J.R. Le Coz. 1978. C/N et controle de la physiologie des cultures de phytoplancton. En: McClusky, D.S. y A.J. Berry (ed). *Physiology and Behavior of Marine Organisms.* Pergamon Press, London. 388 pp.
- Morrison, D.F. 1976. *Multivariate Statistical Methods.* McGraw-Hill Book Company, New York. 415 pp.
- Murray, I., J.W. Parsons y K. Robinson. 1975. Inter-relationships between nitrogen balance, pH and dissolved oxygen in an oxidation ditch treating farm animal waste. *Wat. Res.* 9:25-30.
- Myers, J. 1962. Laboratory cultures. 603-615. En: Lewin, R.A. (ed). *Physiology and Biochemistry of algae.* Academic Press, New York. 929 pp.

- North, W.J. 1986. Biology of the Macrocystis resource in North America. The Food and Agricultural Organization of the United Nations. Marine Resources Service, Rome, Italy. 65 pp.
- Ojeda, A. y A. Alfonso. 1986. Estudio comparativo del crecimiento y composición química de tres especies fitoplanctónicas utilizando cuatro fuentes de nitrógeno. Inf. Tec. Inst. Esp. Oceanogr. No. 45, 16 pp.
- Paniagua-Michel, J. de J. y C. Granados-Machuca. 1981. Obtención de dos medios económicos para el cultivo del fitoplancton bajo condiciones controladas. Universidad Autónoma de Baja California. Escuela Superior de Ciencias Marinas, Tesis Profesional, Ensenada, México. 81 pp.
- Paniagua-Michel, J. de J. y L.F. Bückle-Ramírez. 1984. Cultivo en condiciones controladas de Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con extractos de macrofitas marinas. An. Inst. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 12:59-70.
- Paniagua-Michel, J. de J. 1984. Diseño de un medio para el cultivo de fitoplancton a partir de productos naturales biodigeridos. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Tesis de Maestría, México. 96 pp.
- Paniagua-Michel, J. de J. y C. Granados-Machuca. 1987. La fracción sólida de la digestión de desechos orgánicos, alimento potencial para peces y crustáceos. Ciencias Marinas 13:69-80.
- Paniagua-Michel, J.J., B.C. Farfán y F. Bückle-Ramírez. 1987. Culture of marine microalgae with natural biodigested resources. Aquaculture 64:249-256.
- Parsons, T.R., K. Stephens y J.D.H. Strickland. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada 18:1001-1016.
- Penagos, G.M. 1967. Plantas biológicas, solución práctica e inmediata a graves problemas nacionales. CEMAT. Guatemala.
- Porrás, D. 1981. Sobre la utilización en acuicultura de fertilizantes orgánicos (desechos y excretas). Rev. Latinoamer. de Acuic. ISSN-0250-2135, septiembre (No.9):6-10.

- Prakasam, T.B.S. y R.C. Loehr. 1972. Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes. *Wat. Res.* 6:859-869.
- Provasoli, L., J.J.A. McLaughlin y M.R. Droop. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25:392-428.
- Provasoli, L. 1982. Organic regulation of phytoplankton fertility. 165-220. En: Hill, M.N. (ed). *The Sea*. Vol. 2. Robert E. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida. 554 pp.
- Redfield, A.C. 1958. The biological control of chemical factors in the environmen. *Am. Scient.* 46:205-221.
- Reece, S.C., R.E. Roper y C.P. Grady. 1979. Aerobic digestion of waste activated sludge. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* EE2:261-272.
- Reeves, T. 1972. Nitrogen removal: a literature review. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 44:1985.
- Rhee, Y. 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. *Limnol. Oceanogr.* 23:10-22.
- Rico-Mora, R. 1987. Efecto Interactivo de la Temperatura y de la Concentración de Microalgas en la Fisiología Alimenticia y la Energía Potencial para el Crecimiento de Modiolus capax (Conrad) (Bivalvia: Mytilidae). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Tesis de Maestría, México, 91 pp.
- Richmond, A. 1986. *Handbook of Microalgal Mass Cultures*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 528 pp.
- Ryther, J. y W.M. Dunstan. 1971. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. *Science* 171:1008-1013.
- Ryther, J.H., W.M. Dunstan., K.R. Tenore y J.E. Huguenin. 1972. Controlled eutrophication-increasing food production from the sea by reclycling human wastes. *Bioscience* 22:144-152.
- Saeki, A. 1958. Studies of fish culture in filtered closed-recirculation aquaria. I. Fundamental theory and system design standards. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 23:684-695.
-

- Sakshaug, E. y O. Holm-Hansen. 1977. Chemical composition of Skeletonema costatum (Grev.) Cleve and Pavlova (Monochrysis) lutheri (Droop) Green as a function of nitrate, phosphate and iron-limited growth. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 29:1-34.
- Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. 1962. Statistical Methods: applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa State University Press. Ames. 394-412.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1969. Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones. Barcelona. 832 pp.
- Spotte, S. 1979. Fish and Invertebrate Culture. John Wiley & Sons, New York, 179 pp.
- Srinath, G.E., R. Loehr, y T. Prakasam. 1976. Nitrifying organisms, concentration and activity. J. Environ. Eng. Div. EE2: 449-463.
- Stein, J. 1973. Handbook of Phycological Methods: culture methods and growth measurement. Cambridge University Press. New York. 448 pp.
- Tarifeño-Silva, E., L.Y. Kawasaki., D.P. Yu., M.S. Gordon y D.J. Chapman. 1982 a. Aquacultural approaches to recycling of dissolved nutrients in secondarily treated domestic wastewaters II: biological productivity of artificial food chains. Wat. Res. 16:51-57.
- Tarifeño-Silva, E., L.Y. Kawasaki., D.P. Yu., M.S. Gordon y D.J. Chapman. 1982 b. Aquacultural approaches to recycling of dissolved nutrients in secondarily treated domestic wastewater III: uptake of dissolved heavy metals by artificial food chains. Wa. Res. 16:59-65.
- Tenney, M.W., W.F. Echelberg, K.J. Guter y J.B. Carberry. 1972. Nutrient removal from wastewater by biological treatment methods. 391-419. En: Allen, H.E. y J.R. Kramer (ed). Nutrients in natural waters. John Wiley & Sons, New York. 454 pp.
- Ukeles, R. 1976. Cultivation of plants: unicellular plants. 367-466. En: Kinne, O. (ed). Marine Ecology. Vol. 3. Part. 1: Cultivation. John Wiley & Sons, London. 577 pp.
- Vavilin, V.A., V.B. Vasiliev y S.S. Kuzmin. 1980. Modelling the biochemical oxidation processes in artificial conditions of waste treatment plants. Ecological

Modelling 10:105-137.

- Wikfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture* 59:1-14
- Wild, H.E., C.N. Sawyer y T.C. McMahan. 1971. Factors affecting nitrification kinetics. *J. Wat. Pollut. Cont. Fed* 43:1845-1853.
- Wheaton, F.W. 1977. *Acuacultura: diseño y construcción de sistemas*. AGT editor. México. 704 pp.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60:231-241.
- Wong-Chong, G.M. y R.C. Loehr. 1978. Kinetics of microbial nitrification: nitrite-nitrogen oxidation. *Wa. Res.* 12:605-609.
- Young, M.A., P. Camacho., G. Mercado y J. Rangel. 1983. Desarrollo tecnológico de reactores anaeróbicos (biodigestores) para el tratamiento de residuos porcícolas. Adecuación y aplicación de la tecnología en México. Instituto Nacional Sobre Recursos Bióticos (INIREB), México, 1-7 pp.
- Zebal, R.T. 1984. *Operations Manual*. Instituto Acuicola del Estado de Sonora, Bahía Kino. México. 77 pp.