
CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO MIXTO

DE LAS MICROALGAS *Hyaloraphidium contortum* Y *Pseudokirchneriella subcapitata*

Diagnora Brito, Arturo Castro, Julio Colivet, Ely Gómez y Roberta Mora

RESUMEN

Las microalgas juegan un rol importante en la cría de animales acuáticos, además de tener numerosas aplicaciones en las industrias alimenticia, farmacológica, cosmetológica y ambiental. En el presente estudio se analizó el efecto de diferentes fuentes de nutrientes (Nitrofoska®, Poliverdol® y Guillard) en la cinética de crecimiento y producción de pigmentos de un cultivo mixto de las microalgas de agua dulce *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*. Se realizaron bioensayos por cuadruplicado en cultivos discontinuos, mantenidos en aireación e iluminación continua. El crecimiento se determinó por recuento celular y la producción de pigmento por espectrofotometría. La densidad celular se incrementó con la edad del cultivo, obteniéndose las máximas produccio-

nes a los 24 días de siembra con promedios de 65,88; 65,38 y 63,5×10⁶ células/ml en Guillard, Nitrofoska® y Poliverdol®, respectivamente. La fase de crecimiento exponencial culminó a los 10, 12 y 6 días de siembra con producciones de 20,1; 7,8 y 7,26×10⁶ células/ml, tasas de crecimiento de 1,29; 1,91 y 1,51 divisiones/día y tiempos generacionales de 0,77; 0,52 y 0,66 días en Guillard, Nitrofoska® y Poliverdol®, respectivamente. La mayor producción de clorofila a, b y carotenoides totales se encontró en con fertilizante Nitrofoska®, con promedios 10,87 ±1,53µg de clorofila a/ml; 3,59 ±0,76µg de clorofila b/ml y 3,91 ±0,64µg de carotenoides totales/ml a los 24 días de siembra. Los parámetros de calidad de agua no fueron limitantes para el crecimiento y producción de pigmentos.

Introducción

Las microalgas forman la base de la cadena alimenticia y son consideradas maquinarias fotosintéticas generadoras de pigmentos con una adaptación ecofisiológica y plasticidad bioquímica única; permitiéndoles la bioconversión directa de la energía solar en compuestos químicos, bajo una variedad de condiciones medioambientales y a una velocidad de crecimiento mayor en comparación con otra fuente vegetal (Paniagua-Michel, 1994). Los estudios acerca del cultivo de microalgas revisten gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y

comercial. En este sentido se han utilizado los cultivos discontinuos, por su fácil manejo, en la determinación de la cinética de crecimiento y parámetros influyentes en el desarrollo poblacional de las microalgas (Abalde *et al.*, 1995). Miao y Wu (2004) señalaron a las microalgas como los organismos más prometedores en la lucha contra el cambio climático, debido a la capacidad de absorber grandes cantidades de CO₂ y al potencial en la producción de energía, convirtiéndose fácilmente en diferentes tipos de biocombustibles. Además, pueden ser utilizadas como suplementos dietéticos y una alternativa

de alimento a bajo costo (Waslien, 1975; Goldman, 1980). A nivel mundial los cultivos microalgales son identificados como fuentes de proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas (Quintana *et al.*, 1999). La masificación de los cultivos microalgales requiere de medios nutritivos para su crecimiento y desarrollo, utilizándose generalmente reactivos de alta pureza con precios muy elevados y de compleja preparación (Granados y Bückle, 1983). Se evidencia la necesidad de evaluar medios nutritivos más económicos, entre los cuales están los fertilizantes agrícolas comerciales; además, el empleo de cultivo

mixto se requiere para compensar las deficiencias bioquímicas entre estos organismos y así constituir un alimento de alta calidad nutricional (Buitriago *et al.*, 1989; Coutteau, 1996, Brito *et al.*, 2006), disminuyendo los costos de producción y permitiendo un rápido crecimiento de las microalgas.

Materiales y Métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizó un cultivo mixto de las microalgas de agua dulce *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*, procedente del

PALABRAS CLAVE / Clorofila / Fertilizantes / Fitoplancton / *Hyaloraphidium contortum* / Microalgas / Pigmentos / *Pseudokirchneriella subcapitata* /

Recibido: 27/03/2013. Modificado: 29/07/2013. Aceptado: 12/09/2013.

Diagnora Brito. Doctora en Ciencias, Universidad de Oriente (UDO), Venezuela. Profesora, UDO, Venezuela. Dirección: Departamento de Biología y Sanidad Animal, Escuela de Zootecnia, UDO.

Apartado Oostal 6201, Maturrín, Venezuela. email: diagnorajb@yahoo.es
Arturo Castro. Ingeniero en Producción Animal y Tesista, UDO, Venezuela. e-mail: arturo3001@hotmail.com

Julio Colivet. M.Sc. en Ingeniería de Alimentos, UDO, Venezuela. Profesor, UDO, Venezuela. e-mail: elygoomez01@gmail.com
Ely Gómez. M.Sc. en Ingeniería de los Alimentos y Doctor en Ciencias, UDO, Venezuela.

Profesor, UDO, Venezuela. e-mail: juliocolivet@gmail.com
Roberta Mora. M.Sc. en Fisiología, Universidad del Zulia, Venezuela (LUZ), Venezuela. Profesora, LUZ, Venezuela. e-mail: robertamora@cantv.net

GROWTH KINETICS OF A MIXED CULTURE OF THE MICROALGAE *Hyaloraphidium contortum* AND *Pseudokirchneriella subcapitata*

Diagnora Brito, Arturo Castro, Julio Colivet, Ely Gómez and Roberta Mora

SUMMARY

Microalgae play an important role in the rearing of aquatic animals, besides having numerous applications in the food, drugs, cosmetic and environmental industries. In the present study, the effect of different sources of nutrients (Nitrofoska®, Poliverdol® and Guillard) on the kinetics of growth and pigment production of a mixed culture of freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Hyaloraphidium contortum* was examined. Quadruplicate bioassays were performed in batch cultures maintained under aeration and continuous illumination. Growth was determined by cell counting and pigment production by spectrophotometry. Cell density increased with culture age, obtaining maximal production at 24 days of

planting with averages of 65.88, 65.38 and 63.5×10^6 cells/ml in Guillard, Poliverdol® and Nitrofoska®, respectively. The exponential growth phase culminated at 10, 12 and 6 days of planting, with yields of 20.1, 7.8 and 7.26×10^6 cells/ml, growth rates of 1.29, 1.91 and 1.51 divisions/day and generation times of 0.77, 0.52 and 0.66 days in Guillard, Poliverdol® and Nitrofoska®, respectively. The largest production of chlorophyll a, b and total carotenoids was found with the Nitrofoska® fertilizer, averaging $10.87 \pm 1.53 \mu\text{g}$ of chlorophyll a/mL, $3.59 \pm 0.76 \mu\text{g}$ of chlorophyll b/mL and $3.91 \pm 0.64 \mu\text{g}$ of total carotenoids/mL at 24 days of planting. The water quality parameters were not limiting for growth and pigment production.

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE UM CULTIVO MISTO DAS MICROALGAS *Hyaloraphidium contortum* E *Pseudokirchneriella subcapitata*

Diagnora Brito, Arturo Castro, Julio Colivet, Ely Gómez e Roberta Mora

RESUMO

As microalgas desempenham um papel importante na criação de animais aquáticos, além de ter numerosas aplicações nas indústrias, alimentícia, farmacológica, cosmética e ambiental. No presente estudo se analisou o efeito de diferentes fontes de nutrientes (Nitrofoska®, Poliverdol® e Guillard) na cinética de crescimento e produção de pigmentos de um cultivo misto das microalgas de água doce *Hyaloraphidium contortum* e *Pseudokirchneriella subcapitata*. Realizaram-se bioensaios por quadruplicado em cultivos descontínuos, mantidos em aeração e iluminação contínua. O crescimento se determinou por recuento celular e a produção de pigmento por espectrofotometria. A densidade celular se incrementou com a idade do cultivo, obtendo-se as máximas produções aos 24 dias de

plantado com médias de 65,88; 65,38 e $63,5 \times 10^6$ células/ml em Guillard, Nitrofoska® e Poliverdol®, respectivamente. A fase de crescimento exponencial culminou aos 10, 12 e 6 dias de plantado com produções de 20,1; 7,8 e $7,26 \times 10^6$ células/ml, taxas de crescimento de 1,29; 1,91 e 1,51 divisões/dia e tempos geracionais de 0,77; 0,52 e 0,66 dias em Guillard, Nitrofoska® e Poliverdol®, respectivamente. A maior produção de clorofila a, b e carotenoides totais se encontrou em cultivo com fertilizante Nitrofoska®, com médias $10,87 \pm 1,53 \mu\text{g}$ de clorofila a/ml; $3,59 \pm 0,76 \mu\text{g}$ de clorofila b/ml e $3,91 \pm 0,64 \mu\text{g}$ de carotenoides totais/ml aos 24 dias de plantado. Os parâmetros de qualidade de água não foram limitantes para o crescimento e produção de pigmentos.

Laboratorio de Biología y Cultivo de Crustáceos, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela. Las algas fueron sembradas en tres medios nutritivos a fin de evaluar los efectos de estos compuestos químicos en la cinética de crecimiento. Dos de ellos fueron los fertilizantes inorgánicos comerciales Nitrofoska® (10-4-7) y Poliverdol® (16-16-12), a razón de 0,4ml por cada litro de agua destilada y el tercero fue el medio tradicional Guillard (Stein, 1975).

Los cultivos, por cuadruplicado, se iniciaron con una densidad de 50×10^6 células/ml de cada especie de las microalgas empleadas, en reci-

pientes de 1000ml de capacidad con un volumen de 750ml de medio nutritivo estéril (autoclavado a 20PSI por 15min). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiental promedio de 28-30°C, con fuente de iluminación constante mediante dos lámparas fluorescentes de luz blanca fría de 40W a una distancia promedio de 20cm, y con aireación continua por medio de bomba eléctrica de 110W.

Análisis de biomasa y compuestos bioquímicos

Cada 48h se evaluó el crecimiento de las microalgas por un periodo de 24 días,

mediante el recuento de células. Se tomaron alícuotas de ~5ml del cultivo, que fue fijado en una solución de lugol. El conteo se realizó empleando un microscopio binocular Motie® y una cámara de Neubauer de 0,1mm de profundidad. Se contaron las células algales en la totalidad de las casillas del cuadro central de la cámara en ambos campos, se promedió el número de células y el resultado se multiplicó por 10^4 para expresar los datos en células/ml (Manacorda *et al.*, 2007). Durante el estudio, en cada medio de cultivo se tomaron mediciones de pH, conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales, me-

dianete un medidor múltiple portátil Hanna® modelo HI1991301. Los pigmentos se analizaron cada 6 días con muestras frescas extraídas con una solución acetona:metanol (2:1 V/V) a 4°C durante toda la noche, determinados según las fórmulas propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975) para clorofila total y por Strickland y Parsons (1972) para carotenoides totales. La concentración de pigmentos se expresó por volumen de cultivo ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Los datos fueron analizados mediante el programa para microcomputadoras (Statistix versión 7, Analytical Software; SAS, 1998). Una vez comprobados los supues-

tos de normalidad y homogeneidad de las varianzas, con las pruebas de normalidad aleatoria y de Shapiro, se aplicó un análisis de varianza para determinar los efectos de las variables independientes: medio de cultivo, tiempo de incubación y sus interacciones sobre la variable dependiente densidad celular y pigmentos clorofílicos, por medio del SAS (1998). A aquellas variables con efectos significativos se les aplicó una prueba de promedio Duncan ($p < 0,05$) para determinar diferencias estadísticas entre promedios.

Resultados y Discusión

Densidad celular

Efecto de la interacción fuente de nutrientes y edad del cultivo en la densidad celular. La cinética de crecimiento del cultivo mixto *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*, mostró una respuesta positiva ante la combinación de los factores edad del cultivo y fuentes de nutrientes (Tabla I). Las fases de crecimiento presentaron diferentes tiempos de duración de acuerdo con el medio de cultivo empleado. El período de adaptación fue de ~2 días en el medio Nitrofoska®, mientras Guillard y Poliverdol® carecieron de esa fase. El crecimiento exponencial tuvo duraciones de 6, 10 y 12 días en los medios Poliverdol®, Guillard y Nitrofoska®, con valores de 7,26; 20,1 y $7,8 \times 10^6$ células/ml, respectivamente. La fase de crecimiento de retardo continuó hasta el final del ensayo en Nitrofoska® y en Poliverdol® con promedios de 65,38 y $63,5 \times 10^6$ células/ml, respectivamente. En Guillard la fase de retardo culminó a los 22 días de edad con una densidad de $65,5 \times 10^6$ células/ml, seguida de la fase estacionaria con una producción de $65,88 \times 10^6$ células/ml, sin alcanzar la fase de muerte típica de los cultivos cerrados. En Nitrofoska® las microal-

TABLA I
EDAD DEL CULTIVO, FUENTE DE NUTRIENTE Y DENSIDAD CELULAR EN EL CULTIVO MIXTO *Hyaloraphidium contortum* Y *Pseudokirchneriella subcapitata*

Tiempo (días)	Nitrofoska®	Poliverdol®	Guillard
	Densidad promedio (células/ml)		
0	100 ±0,00	100 ±0,00	100 ±0,00
2	130 ±20,00	1.175 ±184,84	538 ±29,87
4	483 ±38,62	2.545 ±414,85	1.463 ±165,20
6	890 ±53,38	7.263 ±1143,37	4.263 ±1161,45
8	1.630 ±256,48	11.013 ±2176,15	8.200 ±2189,75
10	2.079 ±266,03	19.263 ±5228,35	20.100 ±4087,17
12	7.800 ±2778,48	34.650 ±9385,63	23.750 ±9187,85
14	13.800 ±2504,33	42.500 ±8356,63	35.500 ±15253,41
16	18.113 ±2593,06	43.375 ±13978,41	43.375 ±14412,81
18	49.388 ±12250,20	46.250 ±14733,75	51.875 ±9077,21
20	54.388 ±19552,51	47.000 ±17373,35	53.625 ±18678,75
22	59.250 ±13762,87	50.750 ±12579,75	65.500 ±12955,05
24	65.375 ±13387,64	63.500 ±19437,93	65.875 ±7641,71

gas requirieron más tiempo para la duplicación celular, posiblemente como mecanismo de adaptación a las condiciones ambientales expuestas para lograr al final del ensayo una densidad celular similar a los otros medios de crecimiento. El análisis de varianza aplicado encontró un efecto altamente significativo ($p < 0,0001$) de la interacción edad del cultivo y fuente de nutriente sobre la densidad celular. Los fertilizantes inorgánicos resultaron fuentes nutritivas adecuadas para la producción masiva de estas especies y son más económicos en referencia a los medios tradicionales. Sin embargo, cabe señalar la influencia del medio de cultivo y de la fase de crecimiento en la composición bioquímica y calidad nutricional de las células microalgales, factores a considerar para lograr su adecuada utilización (Newmark *et al.*, 1989; Herrero *et al.*, 1991). Por ello es necesario evaluar en estudios posteriores la composición bioquímica de las microalgas cultivadas en los medios nutritivos ensayados. Chacón *et al.* (2004), en cultivos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. emplearon agua destilada esterilizada y con medio de cultivo Algal a una concentración de 6,0mM NaNO₃ y 0,3mM NaPO₄, y obtuvieron producciones de $18,04 \pm 4,93 \times 10^6$ y $4,69 \pm 1,72 \times 10^6$

células/ml, respectivamente, valores inferiores a los obtenidos en el presente ensayo. Igualmente, Rosales-Loaiza *et al.* (2008), con la microalga marina flagelada *Dunaliella viridis* cultivada con medio Algal a una concentración de 6,0mM NaNO₃, obtuvieron la mayor densidad celular a una tasa de renovación del 5% con $15,58 \pm 0,64$ y $14,96 \pm 0,66 \times 10^6$ células/ml para alta y baja iluminación. Bermúdez *et al.* (2004) encontraron incrementos insignificantes en la productividad celular de *Chroomonas* sp. en cultivos semicontinuos con 10,37; 11,43 y $11,75 \times 10^6$ células/ml en concentraciones de nutrientes de 4; 8 y 12mM NaNO₃, respectivamente; resultados contrastantes a los obtenidos en este estudio.

Vera *et al.* (2004), Rosales *et al.* (2005) y Jonte *et al.* (2007) utilizaron las especies *Chlorella* sp., *Synechococcus* y *Synechocystis minuscula*, y señalaron incrementos en la densidad celular con la edad del cultivo, presentando producciones a los 10, 24 y 12 días de $4,5 \times 10^7$; 607,64 $\pm 14,35 \times 10^6$ y 149,37 $\pm 9,7 \times 10^6$ células/ml. Brito *et al.* (2006), en monocultivos de *H. contortum*, *Chlorella vulgaris* y un cultivo mixto de *Selenastrum capricornutum* y *C. vulgaris*, encontraron a los 18, 15 y 16 días, valores de 21,83; 7,36 y $6,3 \times 10^6$ células/ml para cada tipo de cultivo.

Moronta *et al.* (2006), reportaron densidades poblacionales en *C. sorokiniana* de 15,29 $\pm 0,03$ y $16,87 \pm 0,04 \times 10^6$ células/ml en condiciones autotróficas a los 15 días en pH 8,2 y 9,6. Es necesario mencionar las diferencias con los demás autores obtenidas en la biomasa algal se deben a condiciones experimentales diferentes y a las distintas especies de microalgas utilizadas.

Parámetros poblacionales básicos del cultivo mixto *H. contortum* y *P.*

subcapitata. La fase de crecimiento exponencial se logró a los 10, 6 y 12 días de siembra con densidades poblacionales de 20,1; 7,26 y $7,8 \times 10^6$ células/ml, tasas de crecimiento de 1,29; 1,51 y 1,91 divisiones/día y tiempos generacionales de 0,77; 0,66 y 0,52 días en los medios Guillard, Poliverdol® y Nitrofoska®, respectivamente. Son de resaltar las diferencias existentes entre los parámetros poblacionales básicos. Guillard fue el medio con mayor densidad poblacional, menor tasa de crecimiento y mayor tiempo generacional en comparación con Nitrofoska®, que tuvo menor densidad poblacional, mayor tasa de crecimiento y menor tiempo generacional. Dado los resultados obtenidos, el fertilizante inorgánico Poliverdol®, presentó las mejores características físicoquímicas y aportó los elementos nutricionales en cantidades adecuadas, permitiendo el crecimiento exponencial en menor tiempo con respecto a los otros medios. También se puede considerar a Nitrofoska® como una fuente alternativa de nutriente, pero requiere de mayor tiempo para expresar su capacidad de duplicación. Brito *et al.* (2006), en un cultivo mixto de *C. vulgaris* y *S. capricornutum*, reportaron fase de crecimiento exponencial a los cuatro días de siembra con una den-

sidad poblacional promedio de 3.579.861 y 780.000 células/ml, tasa de crecimiento 0,95 y 1,37 divisiones/día y tiempo generacional de 1,05 y 0,72 días en las fuentes de nutrientes Nitrofoska® y Guillard, respectivamente. Así mismo González *et al.* (1999), evaluando cuatro fuentes de nutrientes en el cultivo de *Isochrysis aff. galbana* var. tahitiana, encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las constantes de crecimiento, reportando valores de 0,55 \pm 0,06 divisiones/día para Walne; 0,47 \pm 0,02 divisiones/día para f/2; 0,32 \pm 0,06 divisiones/día para el fertilizante agrícola (medio F.A.) y 0,28 \pm 0,05 divisiones/día para el medio Algal.

Pigmentos fotosintéticos

Efecto de la interacción edad del cultivo y fuente de nutriente en la producción de pigmentos fotosintéticos. La producción de pigmentos fotosintéticos se incrementó en relación a la edad y la fuente de nutriente utilizada, obteniéndose las mayores concentraciones de clorofila a, b y carotenoides totales a los 24 días de siembra con valores promedios de 10,87 y 5,60 μ g de clorofila a/ml, 3,58 y 1,31 μ g de clorofila b/ml y 3,91 y 2,68 μ g de carotenoides totales/ml, en las fuentes de nutrientes Nitrofoska® y Poliverdol®, respectivamente. En cuanto al medio Guillard, las máximas producciones de pigmentos se presentaron a los 12 días de siembra con promedios de 5,37 μ g de clorofila a/ml, 1,94 μ g de clorofila b/ml y 1,66 μ g de carotenoides totales/ml (Tabla II). El análisis de varianza aplicado detectó un efecto altamente significativo ($p < 0,0001$) entre la interacción edad del cultivo y fuente de nutriente en los pigmentos clorofílicos. Estos resultados comprobaron la influencia de la edad y la fuente de nutriente en la concentración de los pigmentos fotosintéticos, proporcionando los medios de crecimiento los

TABLA II
CONTENIDO DE CLOROFILA A, B, Y CAROTENOIDES TOTALES (μ g·ml⁻¹) EN EL CULTIVO DE *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata* EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y MEDIO DE CULTIVO *

Tratamiento	Días	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
Nitrofoska®	6	0,41 \pm 0,05	0,13 \pm 0,04	0,18 \pm 0,01
	12	0,77 \pm 0,21	0,25 \pm 0,11	0,27 \pm 0,13
	18	5,07 \pm 1,02	1,98 \pm 0,48	1,84 \pm 0,37
	24	10,87 \pm 1,53	3,59 \pm 0,76	3,91 \pm 0,64
Poliverdol®	6	2,01 \pm 0,38	0,63 \pm 0,19	0,55 \pm 0,10
	12	3,30 \pm 0,80	1,01 \pm 0,32	1,10 \pm 0,26
	18	3,23 \pm 1,34	1,01 \pm 0,45	1,51 \pm 0,48
	24	5,37 \pm 1,38	1,32 \pm 0,38	2,68 \pm 0,46
Guillard	6	2,05 \pm 0,36	0,77 \pm 0,13	0,58 \pm 0,09
	12	5,37 \pm 2,32	1,94 \pm 1,63	1,66 \pm 0,63
	18	4,13 \pm 1,34	1,21 \pm 0,45	1,76 \pm 0,34
	24	2,05 \pm 1,07	0,59 \pm 0,24	1,30 \pm 0,38

* N= 4.

nutrientes requeridos a las microalgas en el tiempo para mantener la velocidad de crecimiento y por ende la acumulación de pigmentos. En Guillard la mayor concentración de los pigmentos fotosintéticos se obtuvo a los 12 días de siembra y luego disminuyó; posiblemente la escasez de nutrientes y reducción de luz ocasionaron la disminución de la velocidad de crecimiento, ya que la reducción del contenido de pigmentos es considerado un proceso de autoregulación del aparato fotosintético para alcanzar un balance entre la luz que puede ser absorbida y la demanda de energía necesaria para el crecimiento microalgal (Falkowski y La Roche 1991). Además, la productividad y composición celular de las microalgas cambia con la edad del cultivo, la concentración de nutrientes o la iluminación (Bermúdez *et al.*, 2004; Lemus *et al.*, 2006). Loreto *et al.* (2003) reportaron en cultivos de cianobacterias *Anabaena* PCC7120, controlando el nitrógeno en el medio, un incremento en el contenido de clorofila a y carotenoides totales con la edad del cultivo, y determinaron valores de 12,6 \pm 3,2 a 15,7 \pm 1,2 μ g/ml de clorofila a; y en carotenoides totales 1,2 \pm 0,3 a 4,5 \pm 0,3 μ g/ml. Guevara *et al.* (2005) señalaron una producción en carotenoides de 38,40 \pm 1,92; 32,88 \pm 1,97; y 21,00

\pm 0,84 μ g/ml en cultivos de *Dunaliella* sp. en medios algales comerciales. Contrariamente, Chacón *et al.* (2004) empleando *Chlorella* sp. obtuvieron 4,95 \pm 0,54 μ g/ml de carotenoides totales en fase estacionaria del cultivo, valores superiores a los encontrados en el presente trabajo. Andrade *et al.* (2009), en cultivo de *Scenedesmus* en fase estacionaria (15 días) y utilizando Nitrofoska® como medio de cultivo, obtuvieron 1,11 \pm 0,03 μ g/ml de carotenoides totales, valores similares a lo reportado en este trabajo.

Parámetros químicos

El monitoreo de la conductividad eléctrica (μ S·cm⁻¹), pH y sólidos disueltos totales (PPT) en el tiempo y en los diferentes medios de crecimiento, se muestran en la Figura 1. Se observó en los medios Guillard y Poliverdol® valores superiores en comparación al medio Nitrofoska®, con tendencia a disminuir con la edad del cultivo. En Nitrofoska® los valores de conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales fueron relativamente constantes en el tiempo, no así el pH, el cual se incrementó hasta llegar a \sim 7, posiblemente por el aumento en la producción de biomasa, ingiriendo las microalgas mayor cantidad de CO₂ con una disminución de éste en el medio,

trayendo como consecuencia un aumento del pH, al alterar el sistema CO₂>HCO₃>CO₃ (Darly, 1987). La respuesta de las microalgas al pH varía ampliamente, por ser un factor determinante en la solubilidad del CO₂ y de los minerales en los cultivos, e influye directa o indirectamente en su metabolismo (Skoda 1997; Morris *et al.*, 1999). Esto permite señalar al pH como uno de los parámetros más limitantes en el crecimiento microalgal y producción de pigmentos fotosintéticos con el fertilizante inorgánico Nitrofoska®, a diferencia de las fuentes de nutrientes Poliverdol® y Guillard; los cuales presentaron valores >7 y, por lo tanto, en estos fertilizantes el pH fue irrelevante en el crecimiento algal por no considerarse limitante (Figura 1).

Conclusiones

Los fertilizantes agrícolas Nitrofoska® y Poliverdol® son las fuentes de nutrientes más indicadas para la producción masiva del cultivo mixto *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*, por las altas concentraciones celulares y producción de pigmentos, además del bajo costo, fácil adquisición y manejo. Sin embargo, deben efectuarse estudios adicionales sobre la composición bioquímica de las microalgas cultivadas en los medios nutritivos empleados y diferentes fases de crecimiento, a fin de utilizar adecuadamente el cultivo en concordancia con los objetivos planteados. En cuanto a los parámetros físicoquímicos registrados, se considera que el parámetro más importante fue el pH debido a su influencia en la cinética de crecimiento de las microalgas y producción de pigmentos fotosintéticos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Vene-

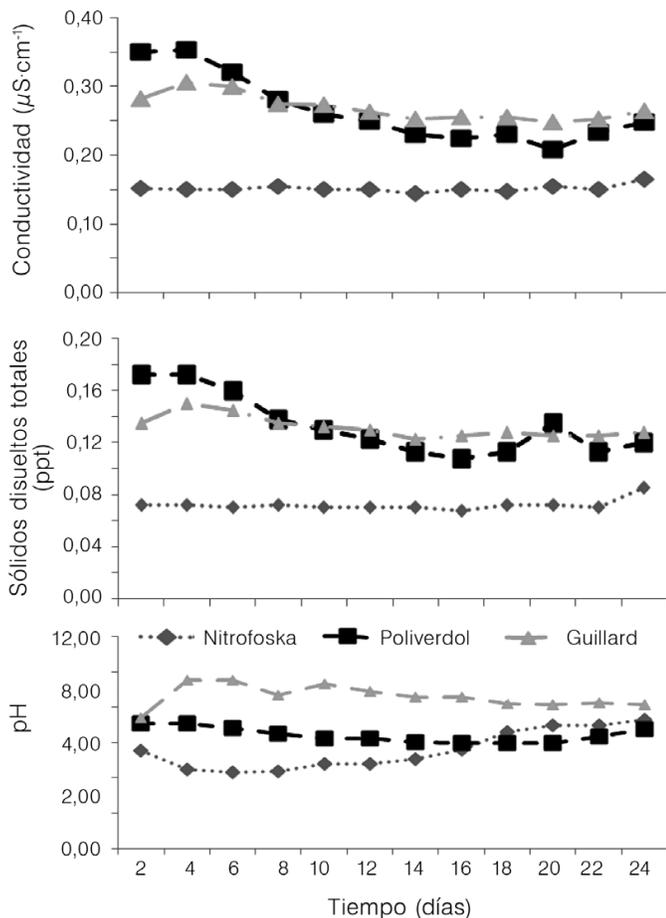


Figura 1. Comportamiento de la conductividad eléctrica, sólidos disueltos totales y pH en el cultivo mixto de *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*.

zuela, por el financiamiento del Proyecto Grupal 'Crecimiento y Producción de Pigmentos de Dos Cultivos Mixtos de Microalgas de Agua Dulce en Condiciones Controladas' (CI-4-031101-1669/10).

REFERENCIAS

- Abalde J, Cid A, Fidalgo P, Torres E, Herrero C (1995) *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de la Coruña. España. 210 pp.
- Andrade C, Vera A, Cárdenas C, Morales E (2009) Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pesquería. *Rev. Técn. Fac. Ing. LUZ* 32: 126-134.
- Bermúdez J, Rosales N, Loreto C, Briceño B, Morales E (2004) Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 179-183.
- Brito D, Milani N, Pereira G, González M, Moran R (2006) Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska®. *Ciencia* 14: 394-410.
- Buitrago E, Norcini C, Arrage M (1989) Evaluación de tres medios nutritivos empleados en el cultivo masivo de *Isochrysisaff galbana green*. *Bol. Inst. Oceanogr.UDO* 28: 197-201.
- Chacón C, Andrade C, Cárdenas C, Araujo I, Morales E (2004) Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Bol. Centro Inv. Biol.* 38: 94-106.
- Coutteau P (1996) Micro-algae. En (Lavens P, Sorgeloos P (Eds.) *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. U.N. Food and Agriculture Organization. Roma, Italia. pp. 9-60.
- Darly WM (1987) *Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico*. Limusa. México. 236 pp.
- Falkowski PG, La Roche J (1991) Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27: 8-14.
- Goldman J (1980). Physiological aspects in algal mass culture. In Shelef G, Soeder CJ (Eds.) *Algae Biomass: Production and Use*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp.343-360.
- González B, Buitrago E, Frontado K (1999) Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. *Mem. Fund. La Salle Cs. Nat. Tomo LIX* (151): 75-84.
- Granados C, Bückle F (1983) Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. *An. Inst. Cs. Mar Limnol.* 11: 241-256.
- Guevara M, Lodeiros C, González O, Lemus N, Núñez P, Romero L, Vásquez A, Rosales N (2005) Carotenoides de cinco cepas de *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53: 331-337.
- Herrero C, Cid A, Fábregas J, Abalde J (1991) Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* 10: 99-110.
- Jeffrey S, Humphrey G (1975) New spectrophotometric equations for determinations Chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural populations. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191-194.
- Jonte L, Rosales N, Yopez, M, Briceño B, Morales E (2007) Respuesta de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* a sustratos orgánicos en condiciones mixotróficas. *Bol. Centro Inv. Biol.* 41: 1-14.
- Lemus N, Urbano T, Arredondo-Vega B, Guevara M, Vásquez, A, Carreón-Palau L, Vallejo N (2006) Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuos y semicontinuos. *Cs. Mar.* 32: 597-603.
- Loreto C, Rosales N, Bermúdez J, Morales E (2003) Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacterias *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Rev. Gay. Bot.* 60: 83- 90.
- Manacorda AM, Cuadros DP, Álvarez AS (2007) *Manual Práctico de Microbiología. Tomo I: Microbiología Ambiental I*. 8 pp.
- Miao X, Wu Q (2004) High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J. Biotechnol.* 110: 85-93.
- Morris H, Quintana M, Almarales A, Hernández L (1999) Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Rev. Cub. Alim. Nutr.* 13: 123-128.
- Moronta R, Mora R, Morales E (2006) Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Rev. Fac. Agron.* 23: 28-43.
- Newmark F, Criales MM, Blanco J (1989) Estandarización del cultivo de seiscepas de microalgas con cuatro medios de crecimiento. *Mem. III Reunión Red Nacional de Acuicultura*. Cali, Colombia. pp. 149-161.
- Paniagua-Michel J (1994) *Biología Microalgal y Obtención de Productos Químicos y Alimenticios*. Serie científica. U.A.B.C.S. México. 2(1). pp. 109 -117.
- Quintana M, Hernández L, Morris H, Fernández M (1999) Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella* sp. *Rev. Cub. Alim. Nutr.* 13: 9-13.
- Rosales-Loaiza N, Avendaño D, Otero A, Morales E (2008) Crecimiento, producción de pigmentos y proteínas de la microalga *Dunaliella viridis* (Chlorophyta) en cultivos semicontinuos. *Bol. Centro Inv. Biol.* 42: 323-334.
- SAS (1998) *Statistical Analysis System*. User's guide statistics (versión 6.01). SAS Institute. Cary, NC, EE.UU.
- Skoda B (1997) Contributions to the biochemical taxonomy of the genus *Chlorella* Beijerincks. I. pigment composition. *Algol. Stud.* 87: 109-136.
- Stein J (1975) *Handbook of Phyco-logical Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press. Cambridge, RU. 448 pp.
- Strickland J, Parson T (1972) A practical handbook of seawater analysis fisheries research board of Canada. *J. Fish. Res. Board Can. Bull.* 167: 311.
- Vera A, Martínez M, Morillo K, Montes S (2004) Cultivo discontinuo de *Chlorella* sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*. *Bol. Centro Inv. Biol.* 38: 1-10.
- Waslien J (1975) Unusual source of proteins for man, CRC. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 6: 77-92.