

## Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska

*Diagnora Brito*<sup>1</sup>, *Nadia Milani*<sup>2</sup>, *Guido Pereira*<sup>3</sup>, *Mario González*<sup>4</sup> y *Rodolfo Morán*<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Oriente Núcleo Monagas, Escuela de Zootecnia Departamento de Biología y Producción Animal. <sup>2,3</sup> Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela.

<sup>4</sup> Universidad de los Andes, Núcleo Rafael Urdaneta.

<sup>5</sup> Universidad Francisco de Miranda, Falcón

Recibido: 29-09-05 Aceptado: 15-11-06

### Resumen

Se cultivaron las microalgas *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* y un cultivo mixto de *Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris*, para determinar el efecto de dos medios de cultivo (Guillard modificado y un fertilizante foliar agrícola Nitrofoska a razón de 0,4 mL/L de agua destilada) sobre la densidad celular y tasa de crecimiento poblacional en un cultivo estático. Las microalgas se mantuvieron en condiciones de luz constantes y temperatura de laboratorio ( $25 \pm 2$  °C). El crecimiento se cuantificó por el recuento de células. Los resultados mostraron que las máximas densidades para las microalgas *H. contortum*, *C. vulgaris* y el cultivo mixto se alcanzaron a los 18, 15 y 16 días, con valores de 21,83; 7,36 y 6,30  $\times 10^6$  cél/mL respectivamente. En los cultivos de *H. contortum* y el policultivo se obtuvieron los mejores rendimientos celulares en el medio de cultivo Nitrofoska (8,19 y 4,45  $\times 10^6$  cél/mL respectivamente), en comparación con los conseguidos en Guillard (4,95 y 1,68  $\times 10^6$  cél/mL respectivamente). En el cultivo de *C. vulgaris*, no hubo diferencia significativa entre los medios utilizados 3,97  $\times 10^6$  cél/mL en Guillard y 3,71  $\times 10^6$  cél/mL en Nitrofoska. En medio de cultivo Nitrofoska, la fase exponencial de crecimiento en los cultivos culminó a los 5, 6 y 7 días de siembra para *H. contortum*, *C. vulgaris* y el policultivo, con densidades de 2,06; 2,07 y 3,45  $\times 10^6$  cel/mL respectivamente. La tasa de crecimiento específica para cada microalga fue de 1,35, 0,97 y 0,95 div/día lográndose un tiempo generacional de 0,74; 1,02 y 1,05 días respectivamente. En Guillard la duplicación celular finalizó a los 6 días para *H. contortum* y a los 4 días para *C. vulgaris* y el policultivo, siendo la densidad de fitoplancton 1,38; 1,49 y 0,78  $\times 10^6$  cél/mL respectivamente. Las tasas de crecimiento para *H. contortum*, *C. vulgaris* y el cultivo mixto fueron de 0,80; 0,64 y 1,37 div/día con tiempos generacionales de 1,25, 1,54 y 0,73 días.

**Palabras clave:** Densidad celular; microalgas de agua dulce; medio de cultivo.

\* Autor para la correspondencia. E-mail: diagnorajb@yahoo.es

# Growth of microalgae of fresh water, in two culture media Guillard and Nitrofoska a commercial fertilizer

## Abstract

The microalgae *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* and a mixed culture of *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris* were cultured to determine the effect of two growth media (Guillard's modified and the foliar fertilizer Nitrofoska, at 0.4 mL/L of distilled water), over cellular density and rate of population growth, in a static culture. The microalgae were maintained in constant conditions of light and laboratory temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Growth was quantified by count of cells. The results indicate highest densities of *H. contortum*, *C. vulgaris* and mixed culture at 18, 15 and 16 days ( $21.83$ ,  $7.36$  and  $6.30 \times 10^6$  cel/mL respectively). The highest values of cellular growth were obtained for *H. contortum* and mixed culture in Nitrofoska media ( $8.19$  and  $4.45 \times 10^6$  cél/mL respectively), in comparison with those obtained in Guillard ( $4.95$  and  $1.68 \times 10^6$  cél/mL respectively). The culture of *C. vulgaris*, didn't show significant differences between the culture media employed,  $3.97 \times 10^6$  cél/mL in Guillard and  $3.71 \times 10^6$  cél/mL in Nitrofoska. In media Nitrofoska, the exponential growth in the cultures culminated at 5, 6 and 7 days with  $2.06$ ,  $2.07$  and  $3.45 \times 10^6$  cel/mL respectively, the rate of specific growth for each  $1.35$ ,  $0.97$  and  $0.95$  div/day and generational time of  $0.74$ ,  $1.02$  and  $1.05$  days respectively. In media Guillard the exponential growth finalized at 6 days for *H. contortum* and at 4 days for *C. vulgaris* and mixed culture the cellular density of phytoplankton was  $1.38$ ,  $1.49$  and  $0.78 \times 10^6$  cel/mL respectively. The growth rate for *H. contortum*, *C. vulgaris* and the mixed culture was  $0.80$ ,  $0.64$  and  $1.37$  div/day with generational times of  $1.25$ ,  $1.54$  and  $0.73$  days respectively.

**Key words:** Algal growth; culture media; microalga of fresh water.

## Introducción

La importancia del cultivo de microalgas en acuicultura estriba en la posición basal que éstas ocupan en la pirámide alimenticia y en su tamaño reducido. La capacidad de convertir sales inorgánicas en compuestos orgánicos con la ayuda de la luz (función fotosintética), las hacen imprescindibles en la producción de alimento (1-3).

Las microalgas son fuente de materia, energía y factores de crecimiento de organismos fitoplanctónicos. Por lo tanto el crecimiento y desarrollo de estos organismos, están influenciados por la disponibilidad algal, la accesibilidad (tamaño, forma y densidad) y la adecuación en el comportamiento alimenticio de cada organismo, también como su composición química (los cuales determinan el contenido calórico y la presencia o ausencia de compuestos esenciales o no deseados) (4).

Hoy en día más de cuarenta especies diferentes de microalgas, son cultivadas en varias partes del mundo. La lista incluye, especies de diatomeas, flagelados, algas verdes crocicales, y algas verdi-azules filamentosas, con tamaños que oscilan entre unos pocos micrómetros a más de cien micras. Las algas comúnmente son usadas para alimentar diferentes grupos de organismos acuáticos de importancia comercial, tales como moluscos (durante todas las etapas de su vida), crustáceos y peces en las primeras etapas de su desarrollo. Las microalgas son empleadas también para producir cantidades masivas de zooplancton (rotíferos, copépodos, camarones, artemias y otros) los cuales a su vez sirven de alimento a larvas y etapas juveniles de peces y crustáceos (5).

Los medios de cultivo utilizados comúnmente para el cultivo de microalgas tienden a ser muy costosos y laboriosos, lo cual evidencia la

necesidad de evaluar medios nutritivos más económicos, entre los cuales están los fertilizantes agrícolas comerciales (6, 7), que disminuyen los costos de producción e igualmente permiten un rápido crecimiento de las microalgas, y como consecuencia la supervivencia de los organismos a cultivar.

Actualmente se están utilizando fertilizantes foliares para el cultivo de diferentes especies de microalgas debido a que los nutrientes que aportan dichos fertilizantes, son rápidamente asimilados a través del estroma. Según BASF (1978), (8) Nitrofoska Foliar presenta mayor solubilidad que los demás fertilizantes foliares, proporcionándole a los vegetales los nutrientes necesario para su desarrollo. Los nutrientes, en este fertilizante se encuentra en forma quelatizada, lo que permite una absorción rápida y directa por las microalgas.

En el presente trabajo se evalúa el crecimiento de las microalgas *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* y un cultivo mixto de *Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris*, las cuales son comúnmente utilizadas en cultivos comerciales y experimentales, con el objeto de determinar el efecto de los medios de cultivo Guillard modificado y el fertilizante foliar agrícola Nitrofoska, sobre la densidad celular y la tasa de crecimiento poblacional en un cultivo estático.

## Materiales y Métodos

Las microalgas *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum* fueron aisladas de la piscina del Instituto de Zoología Tropical de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, mediante la técnica de pipeta capilar (simplificada) que consiste en emplear un medio de crecimiento líquido y hacer diluciones en serie hasta seleccionar una célula algal e inocularla en medio Guillard. Una vez aisladas se cultivaron en laboratorio *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* y un cultivo mixto (*Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum*), en dos medios de cultivo para observar los efectos de estos compuestos químicos sobre la densidad y tasa de crecimiento celular.

Los medios empleados fueron el medio Guillard modificado a las condiciones del laboratorio (9) y Nitrofoska foliar un fertilizante comercial inorgánico (10(N)-4(P)-7(K)-0.2(MgO)), equivalente a 0,4g de N/l a una concentración de 0,4 mL por litro de agua destilada.

Se realizaron 3 a 4 repeticiones de cada uno de los tratamientos con el fin de construir la curva de crecimiento poblacional y determinar el medio más apropiado para cada especie. El tipo de cultivo empleado fue el sistema estático, esto se llevó a cabo en botellas de vidrio de 250 mL y 1.000 mL de capacidad con un volumen funcional de 200 y 750 mL del medio de cultivo estéril (autoclavado a 20 PSI por 15 min). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiental con fuente de iluminación constante mediante 2 lámparas fluorescentes de luz blanca fría de 40 vatios a una distancia promedio 20 cm, además se le suministró aireación continua mediante una bomba eléctrica de 110 vatios.

La inoculación fue a partir de cultivos stock a una concentración 100.000 células por mL en cada una de las microalgas empleadas, excepto en el cultivo mixto donde se emplearon 50.000 células de cada microalga para alcanzar una concentración inicial total de 100.000 células por mililitro.

Se evaluó el crecimiento de las microalgas durante 18 días, para esto se realizaron recuentos de células diariamente, por lo cual cada 24 horas se obtuvieron muestras de aproximadamente 5 mL del cultivo que fueron fijados con una solución de lugol. El conteo de las microalgas se realizó con ayuda de un microscopio binocular marca Leitz y de un hematocitómetro o 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 y luego se promedió el número de células, el resultado se multiplicó por  $10^4$  para expresar los datos en cél/mL. En cultivos cerrados de algas, el crecimiento presenta 5 fases o etapas de desarrollo: 1) Fase de ajuste, es la etapa de adaptación que sufren las algas a las nuevas condiciones del cultivo. 2) Fase exponencial, aquí las células crecen en la misma proporción que el número de células

presentes. 3) Fase de retardo o declinación, en esta etapa el tiempo requerido para duplicar la población celular aumenta, reduciendo la tasa de crecimiento. 4) Fase estacionaria, en esta fase no hay un crecimiento neto de la población; la tasa de crecimiento se compensa con la tasa de mortalidad celular. 5) Fase de muerte, aquí la tasa de mortalidad supera la tasa de multiplicación celular (10). La tasa constante de crecimiento se estimó utilizando el modelo matemático que describe la fase exponencial,  $N_t = N_0 \cdot e^{Kt}$ . La tasa de crecimiento  $K$  se estimó en intervalos de tiempo unitario usando logaritmos en base 2. (1):  $K = \log_2 (N_t/N_0) / T_1 - T_0$

Donde:

$N_t$  = número de células al tiempo  $T_t$

$N_0$  = número inicial de células  $T_0$

$T_0$  = tiempo inicial de muestreo

$T_t$  = tiempo final de muestreo

El tiempo de división generacional fue calculado utilizando la fórmula propuesta por Stein (1973), (9)  $T_d = 1/K$ .

Donde:

$K$  = Tasa de crecimiento relativo.

Para realizar los análisis estadísticos de los datos se empleó el programa para microcomputadoras (Statistix versión 7, Analytical Software 2002). Una vez comprobados los supuestos de normalidad y la homogeneidad de las varianzas, con las pruebas de normalidad aleatoria y Shapiro; se aplicó a los datos 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 (cél/mL) por medio del SAS (Sistemas de Análisis Estadísticos). Aquellas variables que mostraron efectos significativos se les aplicaron una prueba de promedio Duncan  $\alpha$  0,05; para determinar diferencias estadísticas entre promedios.

## Resultados y Discusión

### Densidad celular para cada cultivo

Los cultivos de las dos algas *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* y el policultivo constituido por *Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum*, en las dos fuentes de nutrientes utilizadas muestran un incremento continuo de la biomasa algal a medida que transcurre el tiempo de incubación (Figura 1).

En el cultivo de *H. contortum* (Figura 1A), se observa que con Nitrofoska se logró mayor biomasa que en Guillard. Mientras que en *C. vulgaris* (Figura 1B) el crecimiento en los dos medios de cultivo fue muy similar. En el cultivo mixto (Figura 1C) se observa menor densidad celular en el medio de cultivo Guillard que en el medio de crecimiento Nitrofoska.

### Efecto del tiempo en la densidad celular

#### *Hyaloraphidium contortum*

La máxima producción de células se observó a los 18 días con un valor promedio de 21.833.333 cél/mL (Tabla 1). En cuanto a las fases de crecimiento, el ajuste de la población algal fue relativamente corto de un día, indicando una buena adaptación de esta microalga a las condiciones de siembra.

En todo el período de experimentación el crecimiento de *H. contortum* se desarrolló normalmente hasta la fase de retardo, sin que pudiera alcanzar la fase de muerte típica de los cultivos cerrados. Los promedios celulares mostraron diferencias estadísticas en referencia al período de siembra, encontrándose la mayor biomasa a los 18 días. El análisis de varianza aplicado encontró un efecto significativo  $p < 0,0001$  del tiempo sobre la variable respuesta densidad celular.

#### *Chlorella vulgaris*

La densidad poblacional de *C. vulgaris* se incrementó en la medida que transcurría el tiempo de siembra (Tabla 1), pero en una proporción inferior al del *H. contortum*. La mayor producción de biomasa obtenida fue a los 15 días, sin embargo este valor fue estadísticamente similar a los obtenidos a partir de los días 12 hasta 18. Probablemente el

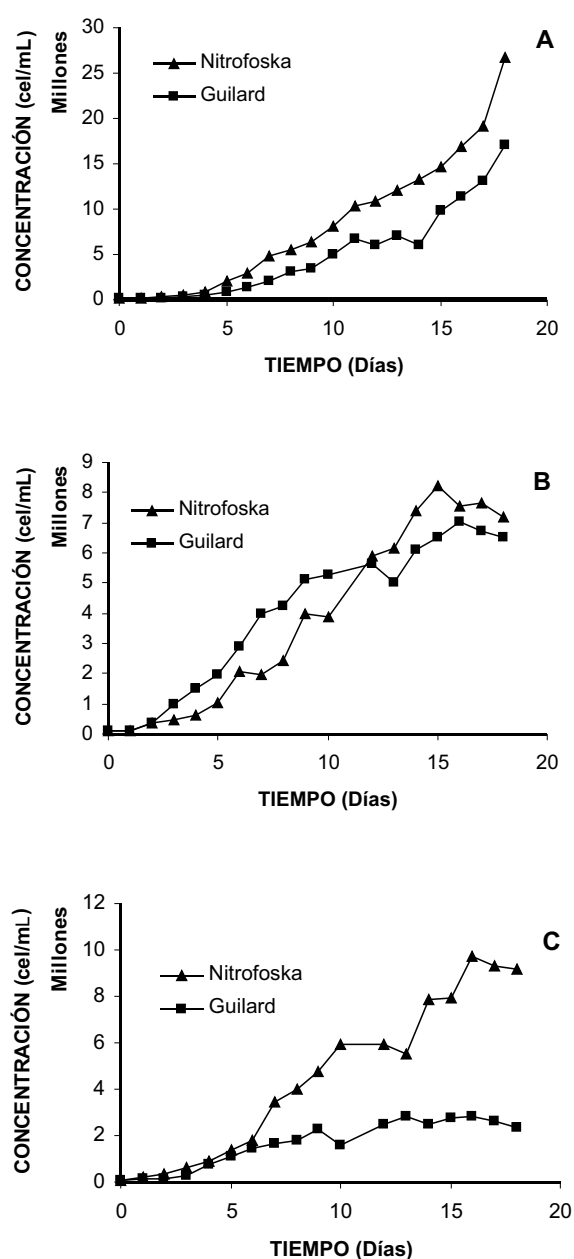


Figura 1. Densidad poblacional de *Hyaloraphidium contortum* (A), *Chlorella vulgaris* (B) y del cultivo mixto (*Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum*) (C), cultivadas con medios Guillard y Nitrofoska.

comportamiento de esta microalga se debe al agotamiento de los nutrientes en el medio o a su potencial genético de crecimiento que permitió alcanzar su fase de crecimiento estacional en ese período de tiempo. El análisis de varianza mostró un efecto significativo  $p < 0,001$  para el tiempo del cultivo sobre la densidad celular.

#### Cultivo mixto (*Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris*)

El cultivo mixto sembrado a razón de 50.000 cél/mL para cada una de las microalgas empleadas; obtuvo la mayor biomasa algal en los días 16 y 17 con valores de 6.301.215 y 5.952.257 cél/mL respectivamente, siendo estos valores estadísticamente diferentes a los promedios de los días 12, 13 y del 0 al 10 (Tabla 1). Al evaluar sus fases de crecimiento, este cultivo no presentó fase de ajuste, lo cual puede indicar que no hubo una fase de adaptación de las microalgas a las condiciones expuesta, además su fase estacionaria se alcanzó a partir de los 14 días probablemente por la competencia existente entre los dos tipos de microalgas por el sustrato, así como su capacidad genética de reproducción. El análisis de varianza detectó un efecto significativo  $p < 0,0001$  del tiempo sobre la densidad de algas.

Los resultados obtenidos en los diferentes análisis, han mostrado en el estudio particular para cada cultivo un incremento en la biomasa algal, en la medida que transcurre el tiempo de cultivo. Esta es una respuesta fisiológica, esperada debido a la acumulación de células en el tiempo y probablemente el período de experimentación y las condiciones ambientales (luz, temperatura y requerimientos nutricionales) no permitieron que las microalgas empleadas alcanzaran la fase senil, que va acompañada de una mortalidad masiva de células. Estos resultados son parecidos a los encontrados por Pedroza (11) en el cultivo de la cianobacteria *Spirulina maxima* usando efluentes de biodigestores y vinaza; Nives-Soto et al. (12) con *Monoraphidium* sp. en cinco tipos de medios de crecimiento (medio F y cuatro a base de fertilizantes agrícolas); Hernández (13) con una diatomea *Nitzschia* cf. *closterium*; Graeff (14) con *Chlorella minutissima* en medio Myer's; Tanji et al. (15) en cultivo de *Chlorella homophaera* en medio

Tabla 1  
Efecto del tiempo sobre la densidad celular (cél/ml) de *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* y el (*Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum*)

Tiempo (días)	<i>H. contortum</i>		<i>C. vulgaris</i>		Cultivo mixto	
	Densidad Promedio (cel/mL)		Densidad Promedio (cel/mL)		Densidad Promedio (cel/mL)	
0	100.000	J	100.000	I	100.000	I
1	157.000	J	108.056	I	177.118	I
2	247.685	J	365.347	I	248.993	I
3	474.537	J	701.389	HI	456.944	I
4	625.000	I J	1.055.556	HGI	846.458	I
5	1.425.926	H I J	1.510.417	FHGI	1.231.701	HI
6	2.143.519	H I J	2.489.583	FHGE	1.609.757	GHI
7	3.442.130	GHI J	2.987.847	FDGE	2.546.007	FGH
8	4.250.000	GHI	3.343.750	FDE	2.894.097	EFG
9	4.951.389	FGH	4.564.236	CDE	3.513.021	DEF
10	6.594.907	GFE	4.579.861	CDE	3.741.319	CDEF
11	8.384.425	FE	4.871.528	CDB	4.795.139	BCDA
12	8.495.370	FE	5.767.361	CAB	4.220.486	BCDE
13	9.532.407	ED	5.583.333	CAB	4.171.875	BCDE
14	9.648.148	ED	6.755.208	AB	5.174.479	CBA
15	12.240.741	CD	7.361.111	A	5.342.882	CBA
16	14.159.722	CB	7.276.042	A	6.301.215	A
17	16.085.648	B	7.180.556	A	5.952.257	A
18	21.833.333	A	6.852.431	AB	5.774.306	BA

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente entre si. Duncan  $\alpha$  0,05.

WC-N/5; Portella et al., (16) y otros investigadores en *Chlorella minutissima* y *Chlorella stigmatophora* (15, 17). Estos investigadores encontraron un incremento en la densidad celular en la medida que transcurrió el tiempo de inoculación, obteniendo diferencias en las concentraciones algales, debido a los diferentes medios de cultivo utilizado, así como a las técnicas aplicadas en el proceso de producción y a la capacidad genética de las especies de microalgas empeladas en la generación de biomasa.

### Efecto del medio del cultivo sobre la densidad celular

#### *Hyaloraphidium contortum*

La mayor producción obtenida corresponde al fertilizante foliar Nitrofoska con un promedio de 8.189.474 cél/mL, siendo este valor estadísticamente diferente a la producción en medio Guillard con 4.946.540 cél/mL. El análisis de varianza determinó un influencia significativa  $p < 0,0001$  del fertilizante sobre la densidad celular.

### *Chlorella vulgaris*

En este cultivo el rendimiento fue de 3.970.773 y 3.706.832 cél/mL para Nitrofoska y el medio Guillard respectivamente, lo que conduce a sugerir que las fuentes de nutrientes utilizadas son similares en respuesta al crecimiento del alga en cuestión. También es necesario apreciar la densidad celular de esta microalga con respecto al *H. contortum*, esta última produjo mayor densidad en medio Nitrofoska 8.189.479 cél/mL, suponiendo una disposición genética por parte de la microalga en multiplicación celular. En cuanto al análisis de varianza no mostró un efecto significativo  $p < 0,3942$  del fertilizante sobre el número de células por mililitro de *C. vulgaris*.

### **Cultivo mixto (*Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris*)**

En el cultivo mixto se observaron diferencias marcadas en las respuestas de crecimiento con respecto a la fuente de nutrientes, siendo la producción promedio de biomasa de 4.453.378 y 1.676.404 cél/mL para Nitrofoska y el medio Guillard respectivamente, encontrándose diferencias estadísticas según la prueba de promedio aplicada.

En comparación con *C. vulgaris*, cuyo crecimiento fue indiferente en los medios de crecimiento utilizados; este cultivo producto de una mezcla de clorofitas (*C. vulgaris* y *S. capricornutum*) crecen mejor en Nitrofoska que en Guillard, probablemente los nutrientes que aporta Nitrofoska, son rápidamente asimilados a través del estroma y presenta mayor solubilidad, proporcionándole al cultivo los nutrientes necesarios para su desarrollo. Es de notar que estadísticamente ( $p < 0,0001$ ), se comprueba la influencia del fertilizante en la productividad celular en el cultivo mixto.

Couttean (5) expone que la temperatura, pH, luminosidad y cantidad de nutrientes son los principales factores para el crecimiento de las microalgas. Una dependencia de estos organismos a estos factores es encontrada en el campo de la bioquímica, a nivel molecular en donde estos individuos pueden modificar sus modelos de respuestas, para la adaptación al medio del cultivo. En cuanto a la producción de células en

este experimento, fue influenciada por la fuente de nutriente en cada cultivo particular, siendo notable una mayor concentración celular en el fertilizante foliar inorgánico Nitrofoska que en el medio Guillard. González y Maestrini, (18) compararon el efecto del medio de cultivo Conway, enriquecido con diferentes fertilizantes comerciales, en el crecimiento de las diatomeas *Nitzschia acicularis*, *Phaeodactylum tricoratum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana* y *Chaetoceros* sp. y concluyeron que los fertilizantes comerciales presentaron los mejores medios de cultivo para esas diatomeas, excepto para *Chaetocero* sp.. Velásquez (19) experimentó con el aislamiento y cultivo de *Nitzschia bilobata* y *N. closterium*, en condiciones axénicas y no axénicas, empleando tres medio de cultivo diferentes: medio Schereiber, medio Foyn's (enriquecido con extracto de tierra) y medio Walne; concluyó que el medio Schereiber fue el más conveniente para el cultivo de dichas especies.

Nives - Soto et al. (12) determinaron que la mayor tasa de crecimiento de *Monoraphidium* sp., se logró con el foliar Nifokan. Sin embargo, la mayor densidad, al final de la fase exponencial, se consiguió con Fertifolien y la mayor densidad celular al final del experimento fue con Nifokan (6.862.167 cél/mL), seguido de Fertifolien (5.890.000 cél/mL), estos autores concluyen que los foliares Nifokan y Fertifolien son adecuados para el cultivo de *Monoraphidium* sp., además de, que son una opción de bajo costo en comparación con el medio F. Hagiwara et al. (20) determinaron en cultivos masivos externos, la productividad de *Tetraselmis tetrahele* en dos medios de cultivos diferentes ES-TT y un medio fertilizado, la tasa de producción de *T. tetrahele* cultivada en ES-TT fue significativamente más alta que la observada en el medio fertilizado. Así mismo en cultivos internos, cultivados con medio ES-TT y Guillard F no mostraron diferencias significativas entre ellos (20). Los autores sugieren que el medio ES-TT es equivalente al medio Guillard F.

### **Densidad celular en la fase de crecimiento exponencial**

En este trabajo la fase del crecimiento exponencial culminó en diferentes períodos de tiem-

pos para las distintas clases de clorofitas y tipo de cultivo. En la Figura 2 se presenta la respuesta de las clorofitas para el efecto del tiempo y medio de cultivo, se puede observar un aumento del material vegetal en la medida que transcurre el tiempo, después de la inoculación del cultivo en todas las microalgas empleadas; mientras que la producción de células con respecto a la fuente de nutriente, solo fue notoria en *Hyaloraphidium contortum*, con una mayor producción de biomasa en el quinto día para Nitrofoska. En Guillard, la fase exponencial finalizó en el sexto día, con una densidad celular menor que en Nitrofoska (Figura 2A).

En el cultivo de *Chlorella vulgaris*, la fase de crecimiento exponencial en medio Guillard fue alcanzada en el cuarto día, más rápido que en Nitrofoska que se alcanzó en el sexto día (Figura 2B). Probablemente el hecho que el fertilizante Guillard, este compuesto por sales inorgánicas puras y que además presenta una cantidad superior de macro y microelementos que en Nitrofoska, contribuyeron a que *C. vulgaris*, expresara en menor tiempo su potencial genético de crecimiento.

Las diferencias en cuanto a biomasa en cultivo mixto son poco notorias en los primeros 4 días de inoculación en ambos medios de cultivo (Figura 2C). En Guillard el crecimiento exponencial terminó a los 4 días de siembra y en Nitrofoska a los 7 días, con una densidad poblacional mayor que en Guillard.

En la Tabla 2 se puede observar los valores de la tasa de crecimiento específica ( $k$ ), esta es la constante de crecimiento para un cultivo cerrado, que se incrementa exponencialmente en un periodo de tiempo finito, expresada por el número de divisiones/día y el tiempo generacional ( $td$ ), es el periodo requerido para que una población celular se duplique y es expresado en horas y días (21). *Hyaloraphidium contortum* en Nitrofoska alcanzó su fase exponencial al quinto día con una densidad promedio de 2.060.185 cél/mL, su tasa de crecimiento en ese momento fue 1,35 div/día y el tiempo generacional 0,74 días. En medio Guillard su fase de crecimiento exponencial culminó en el sexto día con una producción promedio de 1.379.630 cél/mL, mos-

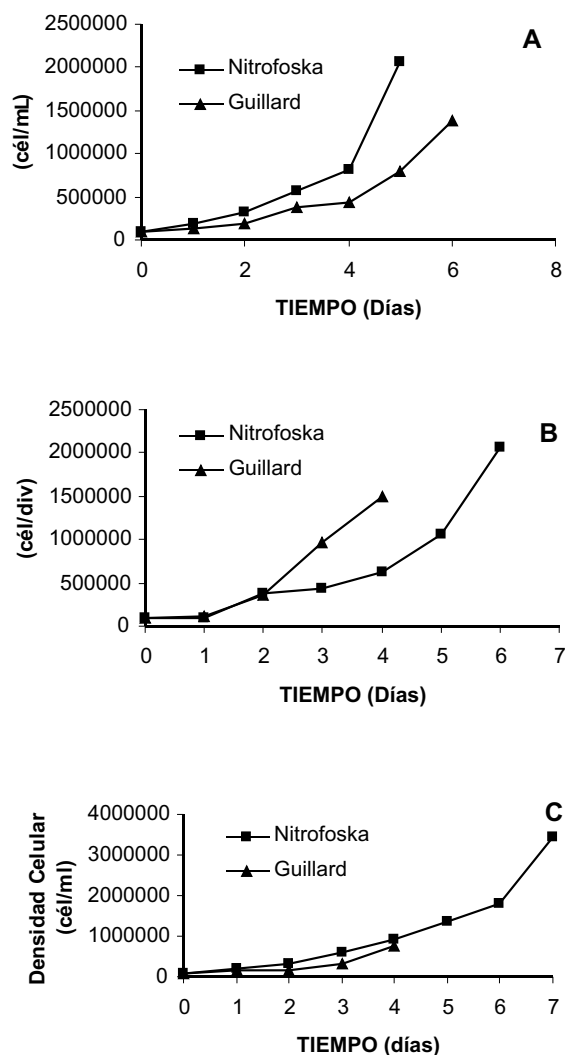


Figura 2. Fase de crecimiento exponencial de *Hyaloraphidium contortum* (A); *Chlorella vulgaris* (B), cultivo mixto (*Chlorella vulgaris* y *selenastrum capricornutum*) (C), cultivada con medios Guillard y Nitrofoska.

trando una tasa de crecimiento de 0,80 div/día y un tiempo generacional de 1,25 días. En este trabajo se demostró que *H. contortum* tuvo una mayor densidad poblacional en Nitrofoska que en Guillard, mientras que sus parámetros poblacionales como la tasa constante de crecimiento específica y el tiempo generacional mostraron poca



Tabla 2

Estimación promedio de los parámetros poblacionales básicos de *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* y del cultivo mixto (*Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum*) en un sistema de cultivo estático con dos medios de cultivo.

Medio	T Días	<i>H. contortum</i>			<i>C. vulgaris</i>			Cultivo mixto		
		Densidad Promedio cél/mL	K div/día	T.D días	Densidad Promedio cél/mL	K div/día	T.D días	Densidad Promedio cél/mL	K div/día	T.D días
Nitrofoska	0	100.000			100.000			100.000		
	1	180.556	0,85	1,17	95.833	-0,06	-16,29	207.639	1,05	0,95
	2	314.815	0,80	1,25	377.083	1,98	0,51	326.111	0,65	1,54
	3	564.815	0,84	1,19	444.444	0,24	4,22	612.778	0,91	1,10
	4	805.556	0,51	1,95	621.528	0,48	2,07	912.917	0,57	1,74
	5	2.060.185	1,35	0,74	1.055.556	0,76	1,31	1.367.917	0,58	1,71
	6				2.072.917	0,97	1,03	1.790.694	0,39	2,57
Guillard	0	100.000			1000.000			100.000		
	1	134.259	0,42	2,35	120.278	0,27	3,76	146.597	0,55	1,81
	2	180.556	0,43	2,34	353.611	1,56	0,64	171.875	0,23	4,36
	3	384.259	1,09	0,92	958.333	1,44	0,69	301.111	0,81	1,24
	4	444.444	0,21	4,76	1.489.583	0,64	1,57	780.000	1,37	0,73
	5	791.667	0,83	1,20						
	6	1.379.630	0,80	1,25						

diferencia en los medios de cultivo utilizados, señalando que ambos medios de crecimiento son fuentes de nutrientes adecuados para el desarrollo de *H. contortum*.

En el cultivo monoalgal de *Chlorella vulgaris* en medio Nitrofoska el crecimiento exponencial terminó en el sexto día (2.072.917 cél/mL) con una tasa de crecimiento de 0,97 div/día, tiempo generacional 1,03 días (Tabla 2). En cuanto a la reproducción de *Chlorella vulgaris* en medio Guillard mantuvo el crecimiento exponencial hasta el cuarto día (1.489.583 cél/mL), con una tasa de crecimiento de 1,44 div/día y un tiempo generacional 0,69 días. La biomasa algal promedio en la fase de duplicación celular de *C. vulgaris* en Nitrofoska fue similar a la de *H. contortum*, en ambas clorofíceas su tasa de crecimiento específica y tiempo generacional, indican un buen crecimiento y estado de las microalgas. En cuanto al medio Guillard la densidad poblacional disminuyó tanto en *C. vulgaris* como en *H.*

*contortum*, sin embargo el tiempo de culminación del crecimiento exponencial fue al cuarto día en *C. vulgaris* y séptimo día en *H. contortum*; esta respuesta quizás se debe a que el medio Guillard le proporciona todos los nutrientes necesarios para que *C. vulgaris* crezca más rápido que *H. contortum* encontrándose diferencias en cuanto a los requerimientos nutricionales y genéticos entre ambas clorofitas.

La fase de crecimiento exponencial en el cultivo mixto (*Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum*) finalizó en el séptimo y cuarto día en Nitrofoska y Guillard con promedios de 3.579.861 y 780.000 cél/mL respectivamente. La tasa de crecimiento y el tiempo generacional para las dos fuentes de nutrientes fue de 0,95 y 1,37 divisiones/día y 1,05 y 0,72 días respectivamente (Tabla 2) En este cultivo se observa claramente una mayor densidad poblacional en Nitrofoska que en Guillard, sin embargo los parámetros poblacionales señalan que en Guillard el crecimiento fue más rápido

y el tiempo requerido para duplicar la población fue menor, probablemente el hecho de que es un cultivo con dos clorofitas distintas en cuanto a comportamiento, requerimientos nutricionales y genéticos influyeron de manera significativas en la respuesta de estos parámetros.

### Efecto del tiempo sobre la densidad celular en la fase de crecimiento exponencial

#### *Hyaloraphidium contortum*:

Al igual que el análisis del período total de experimentación, el tiempo juega un papel importante en el incremento de la biomasa algal, razón por la cual *Hyaloraphidium contortum* obtuvo su máxima producción al final de su fase exponencial con valores de 1.425.926 y 1.379.630 cél/mL para los días 5 y 6 respectivamente; habiendo diferencias estadísticas entre estos promedios y los encontrados en los días restantes, señalados en la Tabla 3. Con el análisis de varianza, se encontró una influencia significativa  $p < 0,0001$  del tiempo sobre la densidad celular de *H. contortum*.

#### *Chlorella vulgaris*

En la Tabla 3, se observa que el mayor promedio de 2.072.917 cél/mL fue para el día 6; siendo este valor estadísticamente superior al resto de los días 4, 5, 3, 2, 1 y 0 respectivamente. El análisis de varianza, detectó un efecto significativo  $p < 0,0017$  del tiempo sobre la densidad celular.

#### Cultivo mixto (*Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris*)

La fase exponencial del cultivo mixto presentó una productividad superior en el día 7 con un promedio de 3.454.861 cél/mL; siendo este valor estadísticamente diferente a los demás días (Tabla 3). El análisis de varianza indicó un efecto significativo  $p < 0,0001$  del tiempo sobre la densidad celular.

Es de notar que a pesar de que *H. contortum* produjo mayor cantidad de biomasa al final del experimento, no fue así cuando se evaluó el efecto independiente del tiempo en la fase de crecimiento exponencial, demostrando una menor producción celular que los cultivos *Chlorella vulgaris* y mixto. Pero como la biomasa algal en *H.*

Tabla 3

Efecto del tiempo sobre la fase de crecimiento exponencial (cél/mL) de *Hyaloraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris* y el cultivo mixto (*Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum*)

Tiempo (días)	<i>H. contortum</i>		<i>C. vulgaris</i>		Cultivo mixto	
	Densidad Promedio (cel/mL)		Densidad Promedio (cel/mL)		Densidad Promedio (cel/mL)	
0	100.000	C	100.000	B	100.000	E
1	157.407	BC	108.056	B	177.118	DE
2	247.685	BC	365.347	B	248.993	DE
3	474.537	BC	701.389	B	456.944	DE
4	625.000	B	1.055.556	B	846.458	DC
5	1.425.926	A	1.055.556	B	1.367.917	BC
6	1.379.630	A	2.072.917	A	1.790.694	B
7					3.454.861	A

Medias con iguales letras no difieren estadísticamente entre si. Duncan  $\alpha$  0,05.

*contortum* depende del efecto combinado del tiempo de incubación y el medio de cultivo; bajo estas condiciones éste obtuvo un valor promedio en biomasa similar a la densidad poblacional de *C. vulgaris* en la fase de crecimiento exponencial. Además queda claro, que el tiempo de incubación es determinante en la producción de biomasa en todos los cultivos microalgales empleados en este experimento, incrementándose la densidad celular en la medida que el tiempo de incubación avanzaba.

Madigan et al. (21) señalaron que una de las características del crecimiento exponencial es que la velocidad de incremento en el número de células es lenta inicialmente, para después aumentar constantemente en una auténtica explosión del número de células. La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente, pero las velocidades de crecimiento exponencial pueden variar esencialmente. Tal velocidad es influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo), así como las características genéticas del microorganismo en cuestión.

Nieves-Soto et al. (12) encontraron que el tiempo de duplicación celular en distintos medios de crecimiento para *Monoraphidium* sp. finalizó a los 4 días de incubación. Por otra parte Vilchez (1983), (22) estudiando el efecto de la salinidad sobre el crecimiento en *Polytoma* sp. y *Chlamydomonas* sp. encontró un incremento celular en ambos géneros a través del tiempo.

### **Efecto del medio de cultivo en la fase de crecimiento exponencial**

#### *Hyaloraphidium contortum*

Para esta microalga se obtuvieron promedios de 607.988 y 487.831 cél/mL para los fertilizantes Nitrofoska y Guillard. El análisis de varianza no mostró efectos significativos  $p < 0,1109$  de la fuente de fertilizante en la densidad poblacional. Sin embargo desde el punto de vista biológico, práctico y económico el fertilizante Nitrofoska se presenta como un medio de cultivo ideal para el crecimiento de *H. contortum*.

#### *Chlorella vulgaris*

Al igual que el *H. contortum*, *C. vulgaris* no mostró diferencias estadísticas en cuanto a los promedios de células por mililitros en las distintas fuentes de fertilizantes con valores de 681.051,59 y 604.361,11 cél/mL en Nitrofoska y Guillard. Lo que indica que a *C. vulgaris* y *Hyaloraphidium contortum* en fase de crecimiento exponencial les es indiferente las fuentes de nutrientes empleadas en este estudio. Así mismo, el análisis de varianza no mostró influencia significativas  $p < 0,2670$  de esta variable independiente sobre la densidad celular.

#### **Cultivo mixto (*Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris*)**

En el policultivo los promedios de células para las distintas fuentes de fertilizantes fueron de 1.096.615 y 299.917 cél/mL para Nitrofoska y Guillard respectivamente, este resultado se diferencia de los cultivos monoalgales anteriormente mencionados donde la fuente de fertilizante no influyó en la fase de crecimiento exponencial. En cuanto a la respuesta del cultivo mixto en Nitrofoska probablemente se debe a que es un fertilizante foliar quelatizado, que le proporciona un medio de crecimiento adecuado en donde las especies citadas tienen características distintas en la utilización de los nutrientes específicos. Cada microalga se limita simultáneamente por un nutrimento diferente y por lo tanto la coexistencia de esas dos microalgas han generado mayor biomasa algal que los cultivos monoalgales. La densidad poblacional obtenida en los medios de cultivos Guillard y Nitrofoska mostró diferencias estadísticas. El análisis de varianza indicó una influencia significativa  $p < 0,0001$  del fertilizante sobre la producción del cultivo mixto.

El medio de cultivo en la fase de crecimiento exponencial de las microalgas, solo mostró un efecto significativo en el policultivo (*Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris*) con una biomasa algal promedio de 1.096.615 y 299.917 cél/mL en los medios de crecimiento Nitrofoska y Guillard. En este caso la respuesta puede deberse a la competencia existente entre las microalgas, así

como a las diferencias en cuanto a los factores genéticos y requerimientos nutricionales, que hicieron posible este comportamiento. Hutchinson (23) expone que en condiciones naturales pueden coexistir entre 10 a 50 especies de fitoplancton, probablemente debido a las características de utilización de nutrientes específicos de las especies, cada una de las cuales se limita simultáneamente por un nutriente distinto. Por tal motivo se evita la competencia directa y potencialmente pueden coexistir tantas especies como existan nutrimentos limitantes. En este experimento se puede concluir que el medio de cultivo Guillard posiblemente tenga mayores limitaciones de nutrimentos para el policultivo; siendo esto una de las razones de la baja densidad poblacional a diferencia del medio de crecimiento Nitrofoska.

Tilman (24) cultivando dos diatomeas planctónicas de agua dulce con tasas máximas de crecimiento similares en cultivo semicontinuo (diluido una vez por día) a diferentes proporciones de Si:P, demostró que *Asterionella formosa* tiene ventaja competitiva a bajas concentraciones P (altas proporciones de Si:P), mientras que a bajas concentraciones de Si (bajas proporciones de Si:P), debe ocurrir lo mismo con *Cyclotella* sp. a proporciones intermedias de Si:P, las dos especies deben coexistir en forma estable debido a que cada una es limitada por un nutrimento diferente, Si para *Asterionella* y P para *Cyclotella*.

#### **Efecto de la interacción del tiempo y del medio de cultivo sobre la densidad celular en la fase de crecimiento exponencial**

La densidad celular en la fase de crecimiento exponencial en los cultivos de *Chlorella vulgaris* y mixto, no fue influenciado por el efecto combinado del tiempo y el fertilizante  $p < 0,9837$  y  $p < 0,7153$ , según el análisis de varianza. En cambio *Hyaloraphidium contortum*, respondió significativamente  $p < 0,0354$  al efecto de la interacción tiempo y fertilizante en la fase de duplicación celular. La combinación de estas dos variables permitió que esta microalga alcanzará una biomasa algal promedio de 2.060.185 cél/mL, en un tiempo de inoculación de 5 días en Nitrofoska a dife-

rencia que en el medio Guillard con un promedio de 1.379.629 cél/mL en el 6<sup>to</sup> día de cultivo (Tabla 2). Como se puede evidenciar *H. contortum* crece mejor en Nitrofoska que en Guillard, probablemente este medio de crecimiento le proporciona los nutrientes esenciales para la duplicación celular, incrementándose la biomasa en la medida que el tiempo de inoculación avanzaba. Es de esperarse que al comparar esta alga con *C. vulgaris* se debe considerar el efecto de la interacción tiempo y medio de cultivo y no el efecto individualizado de las variables independiente tiempo y medio de cultivo.

#### **Conclusiones y Recomendaciones**

En conclusiones en el cultivo de microalgas tanto el tiempo de incubación como la fuente de nutrientes empleada, juegan un papel importante en su crecimiento. En las microalgas estudiadas la densidad celular incrementa en la medida que transcurre el tiempo de inoculación.

El medio de cultivo que presentó los mejores parámetros productivos (densidad celular, tasa de crecimiento específico y tiempo generacional) fue Nitrofoska, un fertilizante foliar de uso agrícola, económico, fácil de conseguir en cualquier establecimiento agropecuario y de preparación sencilla, por estas razones se propone su uso en producciones masivas.

La culminación de la fase exponencial de crecimiento de las microalgas estudiadas se ubicó entre los 5 a 7 días, dependiendo del medio de cultivo empleado y de la capacidad genética de duplicación de cada microalga. Se recomienda su uso como alimento vivo, en este período de tiempo por presentar una adecuada calidad nutricional y además permite la rápida recuperación del cultivo algal.

#### **Agradecimientos**

Los autores agradecen al Instituto de Zoología Tropical de la Universidad Central de Venezuela por proporcionarnos la infraestructura, equipos y materiales indispensable para la realización de esta investigación. A la profesora Roberta Mora de la Universidad del Zulia por su va-

liosa colaboración para la publicación de este artículo. Al profesor Carlos DoNascimento de la Universidad de Carabobo por la traducción al inglés del resumen.

### Referencias Bibliográficas

1. COLL J. Acuicultura Marina Animal. (Ed. Mundi Prensa) 2<sup>da</sup> Edición, Madrid, pp. 770, 1986.
2. RAMOS A., SALAZAR M. La acuicultura en México: De los conceptos a la producción. Uso potencial de los cultivos masivos de microalgas. Instituto de Biología. Univ. Nal. Autón. De México, pp. 274 -288,1990.
3. LEAL S. L. Avances en el cultivo de microalgas y cianobacterias, Maracaibo, Venezuela, pp. 26 - 29, 1998.
4. YÚFERA M., LUBIAN L.M. Introduction to applied phycology. SPD the academic publishing, the Hague. pp. 209-227, 1990.
5. COUTTEAU P. Micro-algae. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO. (Lavens, P and Sorgeloos, P, eds.),pp. 9 -60, 1996.
6. BUITRAGO E., NORCINI C., ARRAGE M. **Bol Inst Oceanog** 28(1-2): 197 - 201, 1989.
7. FULKS W., MAIN K. The Design and Operation of Commercial - Scale Live Feeds Production. En Fulks, W. Y Main, K. (Eds). Rotifer and Micro algae Culture Systems. **Proceedings of a U.S. - Asia Workshop**. Honolulu. Hawaii, pp. 3 - 4, 1991.
8. BASF. Abonado Foliar con Nitrofoska Foliar. Folleto de Fertilizantes. BASF Aktiengesellschaft. Ludwigshafen. República Federal de Alemania, pp.19, 1978.
9. STEIN J.R. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. J.R. Stein (eds.) Handbook of Phycological Methods Cambridge. London (New York), pp. 448, 1973.
10. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Algas: Introducción al método ficológico. (Folleto), Ecuador, 1994.
11. PEDRAZA X.G. **Cultivo de Spirulina maxima para suplementación proteica**. Livestock Research for Rural Development 1(1):1-10, 1989.
12. NIEVES-SOTO CORTÉS-ALTAMIRANO M.R., GUTIERRE-CORONA C PACHECO-MARGES M. del R. **Annales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología**. Volumen 1 - 2 (21): 1 - 153, 1994.
13. HERNÁNDEZ B.A. Efecto de dos salinidades y dos temperaturas en el crecimiento y composición química proximal de *Nitzschia cf. closterium* (Bacillariophyceae) cultivada con un fertilizante agrícola comercial (Tesis), Universidad de Oriente, Margarita (Venezuela), pp. 59, 2000.
14. GRAEFF A. Método para multiplicação da alga (*Chlorella minutissima*) para alimentação inicial de um sistema de produção de peixes fitoplantofagos. CIVIA 2003 (<http://www.civia2003.org>), pp. 127-131, 2003.
15. TANJI S., MISHIMA M., POZZI R. **B Inst Pesca São Paulo** 10:9-16, 1983.
16. Portella M. C., Cestarolli M. A., Verani J. R., Rojas N.E.T. **Bol Inst Pesca São Paulo**, 24(único):79-89, 1997.
17. MERAGELMAN E., LUBZENS E., MINKOFF G.I. **Journal of Zoology** 33: 186-194, 1997.
18. GONZÁLEZ E., MAESTRINI S. **Aquaculture** 36: 245-256, 1984.
19. VELÁSQUEZ A. Aislamiento y cultivo axénico de las diatomeas *Nitzschia bilobata*, *Nitzschia closterium* y *Mastoglia* sp (Bacillariophyceae) en condiciones experimentales (Tesis), Universidad de Oriente, Sucre (Venezuela), pp. 75, 1980.
20. HAGIWARA A., SNELL T.W., LUBZENS E., JAMARU C.S. **Hidrobiología** 358: 217 - 222, 1997.
21. MADIGAN M.T., MARTINKO J.M. PARKER J. Biología de los microorganismos. Editorial Prentice Hall. Madrid. pp. 1064, 1998.

22. VILCHEZ A.J. Aislamiento y cultivo de microalgas en aguas del estuario de Maracaibo por la técnica de agar en placas y el efecto de la salinidad sobre el crecimiento de dos fitoflagelados aislados (Tesis), Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), pp. 128,1983.
23. HUTCHINSON G.E. ***Am Natural*** 95: 45-137, 1961.
24. TILMAN D. ***Ecology*** 58: 48-338, 1977.