



**UNIVERSIDAD NACIONAL
"PEDRO RUIZ GALLO"**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE PESQUERÍA Y ZOOLOGÍA**

TESIS

**PRODUCCION DE *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) y *Chaetoceros calcitrans*
(Takano, 1968) EN AMBIENTES SEMICONTROLADO Y NO CONTROLADO**

Presentada por:

FERNANDEZ CRUZ ELDER MANUEL

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA – PESQUERÍA**

LAMBAYEQUE – PERÚ

2016



**UNIVERSIDAD NACIONAL
"PEDRO RUIZ GALLO"**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE PESQUERÍA Y ZOOLOGÍA**

TESIS

**PRODUCCION DE *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) y *Chaetoceros calcitrans*
(Takano, 1968) EN AMBIENTES SEMICONTROLADO Y NO CONTROLADO**

Presentada por:

Br. ELDER MANUEL FERNANDEZ CRUZ

Dr. Segundo Juan López Cubas
Presidente.

Dr. Jorge Aurelio Oliva Núñez
Secretario.

Dr. Wilmer Carbajal Villalta
Vocal.

M.Sc. María Victoria Lora Vargas
Patrocinadora.

LAMBAYEQUE – PERÚ

2016

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	3
1.0 Lugar de ejecución	3
2.0 Obtención de las cepas	3
3.0 Tratamiento del agua de mar	4
4.0 Salas y ambientes	5
5.0 Limpieza y desinfección del material	10
6.0 Proceso de cultivo	12
7.0 Diseño de contrastación de hipótesis	21
8.0 Parámetros	22
8.1 Crecimiento celular	22
8.2 Numero de generaciones (n)	22
8.3 Tasa específica de crecimiento (k)	22
8.4 Tiempo de duplicación (TD)	23
8.5 Características físico – químicas	23
9.0 Análisis estadístico	23
III.RESULTADOS	25
1.0 Crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i>	25
2.0 Crecimiento de <i>Chaetoceros calcitrans</i>	34
3.0 Parámetros físico – químicos	43
3.1 Temperatura ambiental	43
3.2 Iluminación	44
3.3 pH	44
3.4 Salinidad	45
IV. DISCUSIÓN	46
V. CONCLUSIÓN	51
VI. RECOMENDACIONES	51
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de evaluar la producción de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en términos celulares en dos ambientes: semicontrolado y no controlado. Se desarrolló el diseño experimental de dos Grupos Después con dos tratamientos y dos repeticiones. El conteo celular se realizó diariamente usando una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos se aplicó el análisis de varianza y prueba de Tukey. También se hicieron los registros de los parámetros físico – químicos.

El ambiente de cultivo afectó el crecimiento y producción de las microalgas, siendo mejor en el ambiente semicontrolado para *I. galbana* y en el ambiente no controlado para *C. calcitrans*. La tasa específica de crecimiento, número de generaciones y tiempo de duplicación fue de 0,65 div/día, 1,94 generaciones y 1,55 días para *I. galbana* y 0,50 div/día, 1,51 generaciones y 1,98 días para *C. calcitrans*. El factor limitante para el crecimiento de *I. galbana* es la temperatura, mientras que para *C. calcitrans* es la cantidad de luz.

Palabras clave: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, ambiente semicontrolado y no controlado, producción.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the cellular production of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* using semicontrolled and outdoor environment. The experimental design developed was of two Groups After with two treatments and two replications. Daily, the cell counting was realized with a Neubauer chamber depth of 0,1 mm. To detect significant differences between treatments was applied the Analysis of Variance and Test of Tukey. It was registered the physical –chemical parameters.

The culturing environment affected the growth and production of microalgae. The semicontrolled environment was better for *I. galbana* while outdoor environment was better for *C. calcitrans*. The specific rate of growth, number of generations and doubling time was 0,65 div/day, 1,94 generations and 1,55 days for *I. galbana* and 0,50 div/day, 1,51 generations and 1,98 days for *C. calcitrans*, respectively. The limiting factor for the growth of *I. galbana* was is the temperature, while for *C. calcitrans* was quantity of light intensity.

Keywords: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, semicontrolled environment, outdoor, production.

I. INTRODUCCION

El creciente desarrollo de la Acuicultura ha generado interés en la producción de microalgas ya que constituyen el primer eslabón de la cadena trófica y, por lo tanto forman parte de la dieta de una variedad de organismos acuáticos (Pereira *et al.*, 2008 y Ukeles, 1980 citado en Esman, 2011). Dentro de esta actividad, durante el proceso de producción de larvas de peces, moluscos y crustáceos, es necesario brindarles una adecuada alimentación para favorecer un buen desarrollo con altos índices de supervivencia. Reto que conlleva a la necesidad de mantener siempre disponible alimento de calidad y en cantidad necesaria para el organismo que se está cultivando; el cual, a pesar de las muchas investigaciones dirigidas a sustituirlo con microencapsulados, consiste principalmente en microalimento vivo, principalmente microalgas (Voltolina *et al.*, 2000), dentro de ellas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* consideradas como exitosas por el tamaño de la célula, valor nutricional y la biomasa producida en cultivo (Persoone y Claus, 1980 y Yúfera & Lubián, 1990).

Es así que, para satisfacer la alta demanda de alimento, la producción de microalgas se realiza en grandes volúmenes que en condiciones de laboratorio representa una fracción considerable del costo total de operación, debido a la mano de obra calificada, de infraestructura adicional y adecuada y de los varios productos químicos que requiere dicho proceso; motivo por el cual, comúnmente se usa fertilizantes de uso agrícola para favorecer su desarrollo y se realiza al aire libre o en ambientes semicontrolados (Borowitzka, 2005); no existiendo experiencias simultáneas que permitan comparar las bondades que brindan estos sistemas de cultivo.

Teniendo este panorama se ha ejecutado el presente trabajo de investigación titulado: Producción de *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) y *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae) en ambientes semicontrolado y no controlado, cuyo objetivo fue: Evaluar la producción de *I. galbana* y *C. calcitrans* en ambiente semicontrolado y no controlado en términos de densidad celular, planteándose el problema: ¿Cómo afecta el ambiente de cultivo a la producción de *I. galbana* y *C. calcitrans*?, al cual se formuló la hipótesis: Si en el ambiente semicontrolado se realiza un mayor control de los parámetros físico-químicos, entonces la producción en densidad celular, de *I. galbana* y *C. calcitrans* será mayor en el ambiente semicontrolado que en el no controlado; la misma que fue contrastada mediante el Diseño Experimental de dos grupos después.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Producción de Microalgas del Centro de Acuicultura “La Arena”, ubicado en la bahía de Tortugas, playa de “La Arena”, ubicado en el distrito de Casma, en la región Ancash, cuyas coordenadas son 9°21'25.1"S, 78°25'25.8" W (Fig. 1)



Figura 1. Ubicación geográfica del Centro de Acuicultura “La Arena” en la Bahía de Tortugas.

2. Obtención de las Cepas.

Las cepas de *I. galbana* y *C. calcitrans* (Fig. 2, A y B), fueron obtenidas del mismo lugar donde se desarrolló la investigación; las cuales fueron mantenidas en

placas petri usando el medio sólido Guillard F/2, y en tubos de ensayo en medio líquido, ambas a temperatura ambiental de 19°C e iluminación constante.

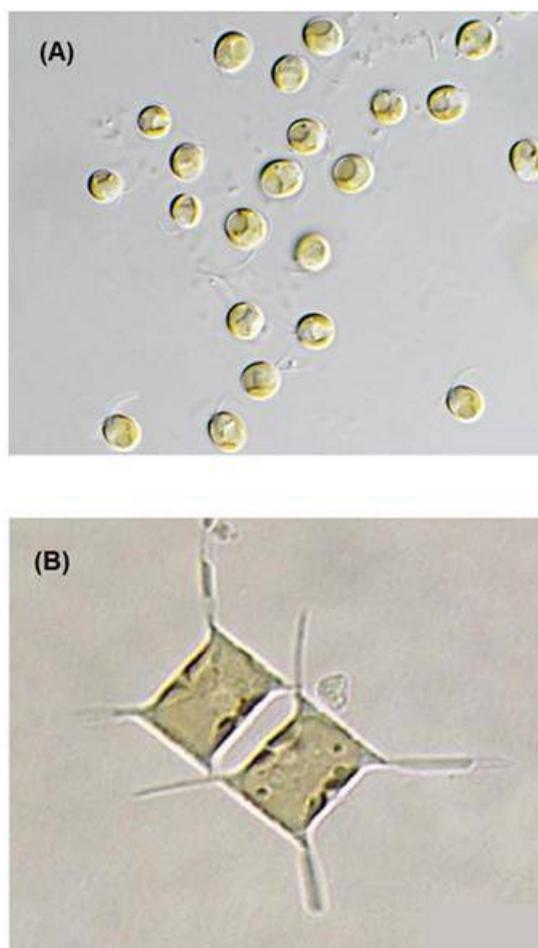


Figura 2. Células de *I. galbana* (A) y *C. calcitrans* (B).

3. Tratamiento del agua de mar

El agua de mar utilizada, fue tomada a 3 m de profundidad desde la Caseta de Bombeo (Fig. 3) en el desembarcadero “La Arena”, luego fue dirigida a un tanque subterráneo de 15 m³ y posteriormente bombeada a un reservorio de 360 m³ (Fig. 4). El agua de mar antes de ingresar al laboratorio y ser usada, fue filtrada a través de un sistema de 3 filtros marca CUNO (Fig. 5 A) en cuyo interior contenían filtros tipo bobinado de 5 μ (Fig. 5 B), para luego esterilizarla por un sistema de 6

lámparas con irradiación ultravioleta (Fig. 6) y finalmente filtrada con una manga de 1 μm (Fig. 7).

Luego, el agua según el caso, fue filtrada a 0,45 μ y luego autoclavada para ser sólo usada en los cultivos realizados en placas, tubos, matraces de 125 ml y 1L; desinfectada con lejía comercial a una dosis de 0,125 ml/L y neutralizada con Tiosulfato de sodio al 24,84% y dosis de 0,16 ml/L para los niveles de 12L y 18L; y finalmente filtrada a 1 μ para los cultivos en tanques.

4. Salas y ambientes

- **Sala de Microscopia:** Lugar donde se realizaron las observaciones cualitativas y cuantitativas para verificar la calidad del inóculo y de los cultivos (Fig. 8) antes de su escalamiento, asimismo se preparación del medio de cultivo y la esterilización del material con ayuda de la estufa y autoclave.
- **Sala de siembra:** Lugar húmeda donde se recibió el agua de mar ya irradiada con UV, para ser filtrada a 1 μm , y luego realizar las siembras en todos los niveles, excepto los cultivos en tanques.
- **Sala Cepario:** Ambiente controlado donde se encuentran las cepas así como los cultivos en crecimiento en todos sus niveles, excepto los cultivos en tanques (Fig. 9). Cuenta con aire acondicionado y la iluminación está basada en lámparas fluorescentes de 40 watts.
- **Sala de Cultivo Masivo:** Ambiente semicontrolado donde se realizó el primer tratamiento. Es una sala que está aislada de la intemperie, su techo está protegido con un material traslúcido que permite el paso de luz solar y evita los cambios bruscos de temperatura.

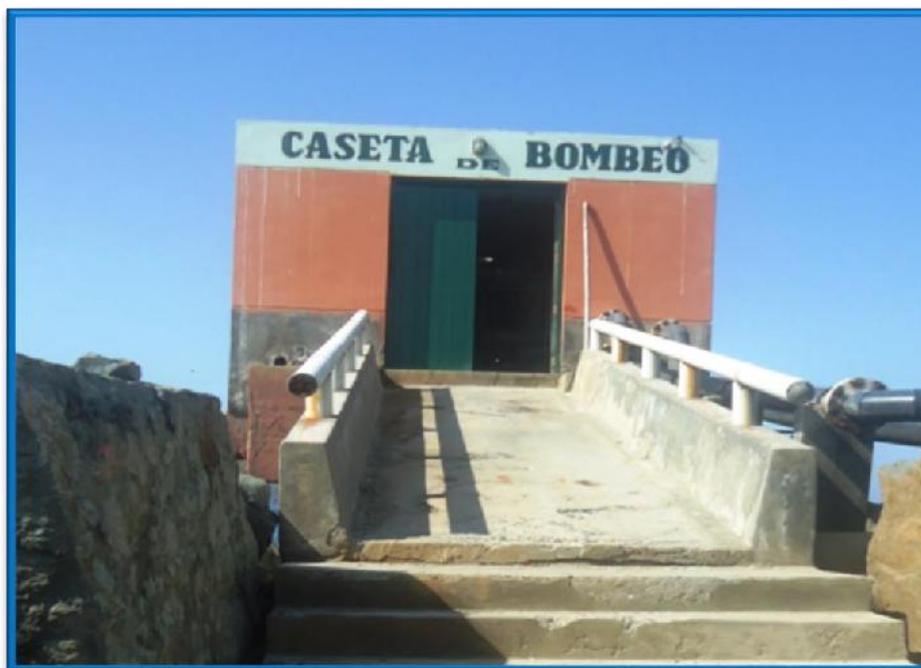


Figura 3. Caseta de bombeo del Centro de Acuicultura "La Arena".



Figura 4. Reservorio de agua marina de 360 m³

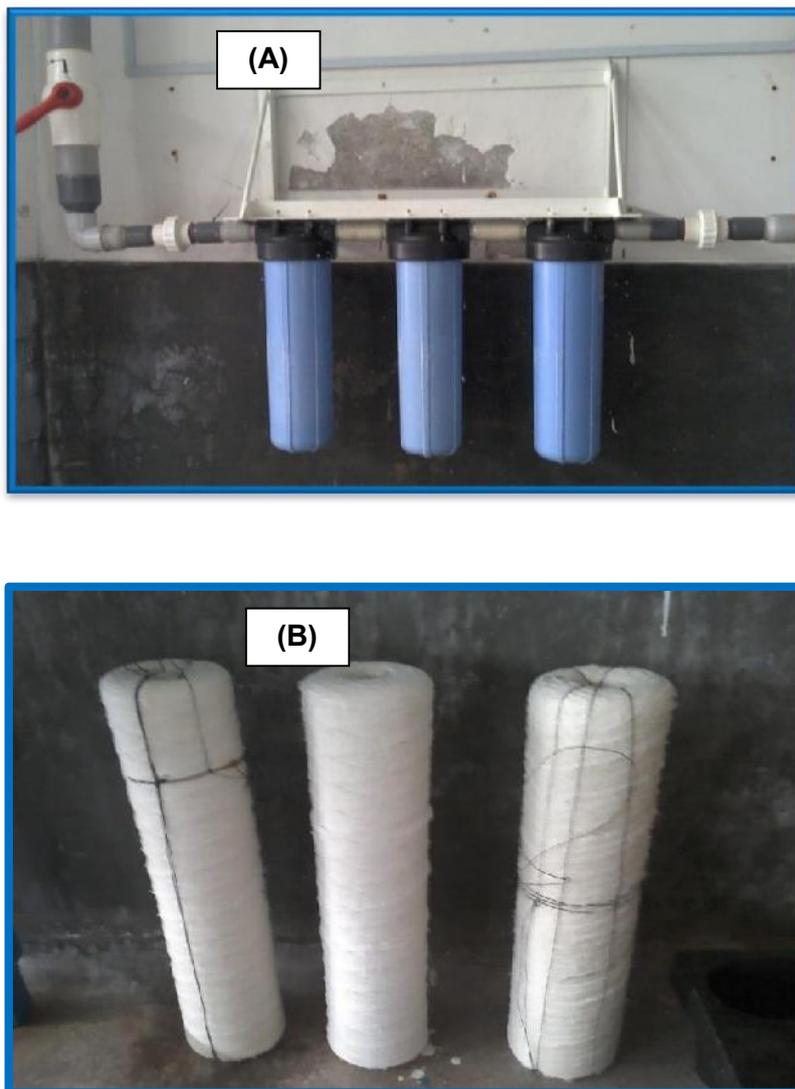


Figura 5. Sistema de filtros marca CUNO (A) y sus filtros interiores tipo bobinado de 5μ (B).



Figura 6. Sistema de esterilización de lámparas ultravioleta.



Figura 7. Filtro tipo manga de 1μ



Figura 8. Sala de Microscopia.



Figura 9. Sala de cepario.

- **Ambiente exterior:** Ambiente no controlado donde se llevó a cabo el segundo tratamiento. Está totalmente expuesto a las variaciones del clima, propios de la zona.
- **Sala de Lavado y secado del material:** Sala donde se recibió el material sucio para su lavado, desinfectado, enjuagado y secado para su uso.
- **Almacén de botellas:** Sala cerrada donde se ubican las botellas de plástico de 20 litros para su secado después de su desinfección (Fig. 10).

5. Limpieza, desinfección y esterilización del material.

Antes de iniciar el ensayo, se desinfectó todo el sistema de producción, salas y ambientes.

- **Limpieza de la línea de aireación:** Se ingresaron 4 litros de alcohol de 96° por el inicio del sistema de aire. Se encendió el blower marca Pentair de ½ HP para que lo desplace por toda la tubería y luego se apagó. Se dejó actuar por un día y luego se encendió el blower para eliminar todo residuo de alcohol.
- **Limpieza de salas:** Se preparó una solución de hipoclorito de calcio a una concentración de 200 ppm para limpiar pisos. Para el caso de los pediluvios, se utilizó una solución de hipoclorito de calcio a 500 ppm y esta se reemplazaba diariamente.
- **Limpieza del material de vidrio:** En solución de ácido fosfórico con concentración de 100 ppm, se sumergió todo el material de vidrio, previo lavado con agua dulce y detergente. Se dejó actuar por un día y luego se enjuagó con abundante agua dulce aproximadamente 2 minutos y se colocó en el área de secado. Se esterilizó al horno a 125°C por 2,5 horas.



Figura 10. Sala de almacén de botellas de 20 L.

- **Limpieza del material de plástico:** Las botellas de siembra se lavaron con ayuda de una escobilla, luego con una solución de ácido muriático en una proporción de 1:1. Se dejó actuar por un día y se enjuagaron con agua de mar filtrada e irradiada con luz UV por 3 minutos cada botella. Inmediatamente se realizó un segundo enjuague con agua dulce y se dejaron secar. Para el caso de los tapones, mangueras siliconadas y varillas para aire, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al (5%: 1/20 L), se dejó actuar por un día y se enjuagaron con abundante agua dulce. El material resistente al calor fue envuelto con papel kraft y se

esterilizó con estufa a 100 °C por 2,5 horas. El material no resistente, fue esterilizado con rayos UV por 20 minutos.

6. PROCESO DE CULTIVO

6.1 El proceso de cultivo se dividió en 3 etapas o niveles (Fig. 11):

- **Nivel inicial:** Placas Petri, tubos de ensayo (10 ml) y matraces de 125 ml.
- **Nivel intermedio:** Matraz de 1L y botellas de 12 litros.
- **Nivel final:** Botellas de 18 litros hasta tanques de 450 litros (masivo).

El medio de cultivo utilizado desde el nivel inicial hasta las botellas de 20 litros fue el medio F/2 de Guillard & Ryther (1962) (Tabla 1). Para el nivel masivo se empleó un fertilizante foliar líquido marca “BAYFOLAN FORTE” cuya composición se detalla en la Tabla 2, a una dosis de 0,1 ml/L. Para el caso de las diatomeas (*C. calcitrans*) se adicionó 1 ml/L de silicatos, importante para la formación de la pared celular (frústulo).

6.2 Siembra

6.2.1 Siembra de placa a tubo

En la campana de siembra se repartió el agua en volúmenes de 10 ml en cada tubo de ensayo. Posteriormente, de las placas petri que contenían las cepas de microalgas, se escogieron las colonias para replicarlas en los tubos de ensayo (Fig. 12). Después de la siembra, fueron llevados al cepario donde la agitación del cultivo fue manual; al cabo de 10 días fueron replicadas al siguiente nivel (Fig. 13).

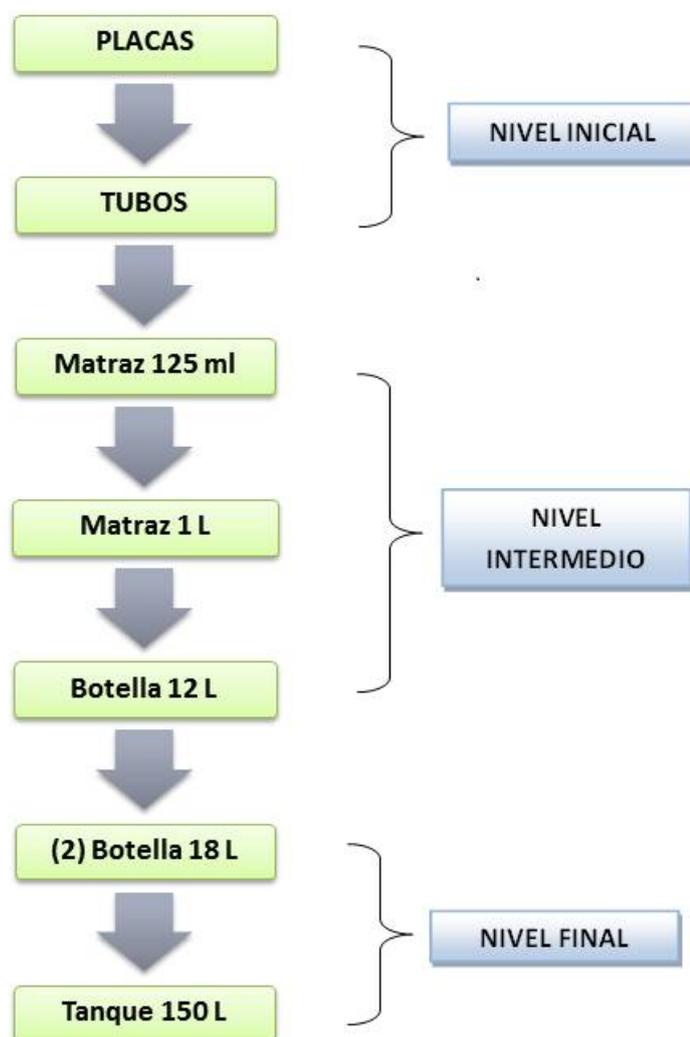


Figura 11. Flujo de cultivo de *I. galbana* y *C. calcitrans*

Tabla 1. Composición del medio F/2 de Guillard & Ryther (1962).

TIPO DE SOLUCIÓN	COMPUESTO	PREPARACIÓN DE NUTRIENTES	CANTIDAD A USAR	
MACRONUTRIENTES: Disolver los reactivos en 1 litro de agua destilada Solución de trabajo. Usar 1 ml por cada litro de agua marina para cultivo.	NaNO ₃	75,0 g/L	1,0 ml	
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5,0 g/L	1,0 ml	
SILICATOS: Disolver el reactivo en 1 litro de agua destilada en un recipiente por separado. Usar 1 ml por cada litro de agua marina para cultivo. A los Silicatos se les considera parte de los macronutrientes pero solo se utilizan para las diatomeas.	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30,0 g/L	1,0 ml	
	SOLUCIÓN STOCK (g/L)			
SOLUCIÓN DE METALES TRAZA: Para preparar la solución de trabajo de micronutrientes primero disolver en su totalidad el EDTA disódica, agregar el cloruro férrico hasta que se disuelva, finalmente agregar 1 ml de cada una de las soluciones stock de metales traza aforando a 1000 ml de agua destilada. Usar 1 ml de esta solución por cada litro de agua marina para cultivo.	EDTA	-	4,36 g/L	
	FeCl ₃ .6H ₂ O	-	3,15 g/L	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8	1 ml de cada uno	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3		
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22		
	CoCl ₂ .6H ₂ O	10		
	MnCl ₂ .4H ₂ O	180		
Solución de metales trazas	-	1,0 ml		
SOLUCIÓN DE VITAMINAS: Para preparar la solución de trabajo de vitaminas se disuelve la tiamina y se adiciona 1 ml de la solución stock de B6 y 1ml de B12. Aforar a 1 litro de agua destilada. Usar 0,5 ml por litro de agua marina para cultivo.	Cianocobalamina (B12)	0,1 g/L	1,0 ml	
	Biotina	0,1 g/L		
	Thiamina HCl	-		0,2 g/L
	Solución de vitaminas	-		

Tabla 2. Composición química del fertilizante foliar “BAYFOLAN FORTE”

BAYFOLAN FORTE	
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Nitrógeno	9,1%
Fosforo	6,6%
Potasio	5,0%
Azufre	1 250 ppm
Boro	332 ppm
Cobalto	17 ppm
Zinc	664 ppm
Cobre	332 ppm
Molibdeno	42 ppm
Calcio	207 ppm
Manganeso	332 ppm
Fierro	415 ppm
Magnesio	207 ppm
Clohidrato de Tiamina	33 ppm
Ácido Indol-acético	25 ppm

6.2.2 Siembra a matraces de 250 ml

En la campana de siembra se repartió el agua en volúmenes de 115 ml en matraces de 250 ml de capacidad. Acto seguido, se vertieron los inóculos de los tubos de ensayo, se le colocó tapón y fueron llevados al cepario. La agitación del cultivo fue manual. Al cabo de 5 días fueron replicadas al siguiente nivel (Fig. 14).

6.2.3 Siembra a matraces de 1 L

En la campana de siembra se colocaron 875 ml de agua en matraces de 1 L de capacidad. Luego se vertió el inóculo de matraz de 250 ml conteniendo el cultivo, se le colocó tapón, la línea de aire y fue llevado al cepario donde se aplicó aireación. Después de 7 días fueron replicadas al siguiente nivel (Fig. 15).

6.2.4 Siembra a botellas 12 L

Se recibió 11 L de agua de mar en una botella de 20 L, previamente filtrados con la manga de 1 μ , se le añadió 1,5 ml de lejía comercial, se dejó actuar por 30 min, luego se neutralizó con 1,2 ml de tiosulfato de sodio a 24,81%, para finalmente agregar los nutrientes. Utilizando un microscopio, se revisó la calidad del inóculo de 1 L, luego se filtró a 45 μ y se procedió a sembrarlo en la botella, se colocó el tapón y la varilla para aire, previamente flameadas y finalmente se llevó al cepario donde se conectaron las líneas de aire (Fig. 16). Después de 7 días se realizó la siguiente siembra.



Figura 12. Siembra de microalgas de placas a tubos en la campana de siembra.



Figura 13. Cultivo de microalgas en tubos de ensayo



Figura 14. Cultivo de microalgas en matraces 250 ml.

6.2.5 Siembra en botellas 18 L.

Se recibió 12 L de agua de mar en un bidón y siguiendo el tratamiento antes indicado, se procedió a realizar la siembra con inóculos de 6 L obtenidos del inóculo madre de 12 L obtenido en la fase anterior. Luego se procedió como en el caso anterior (Fig. 17). Al cabo de 10 días se realizó la siguiente siembra.

6.2.6 Siembra en tanques de 450 L

Se filtraron volúmenes de 132 litros de agua de mar con una manga de 1 μm y depositados en 08 tanques de fibra de vidrio de 450 L de capacidad (04 por especie) e instalados en ambiente semicontrolado (Fig. 18) y no controlado (Fig. 19); luego, se adiciono el nutriente foliar BAYFOLAN FORTE a una dosis de 0,1 ml/L y solución de silicatos a la misma concentración para el caso de *C. calcitrans*. Un día antes de la siembra, los inóculos de 18 L se llevaron al nuevo ambiente de cultivo para su adaptación, después de lo cual se vertieron a los tanques que contenían 132 litros de agua de mar, colocándoles también su línea de aire. Los tanques sembrados en los exteriores fueron cubiertos con un plástico para evitar su contaminación.



Figura 15. Cultivo de microalgas en matraces 1 L



Figura 16. Cultivo de microalgas en botellas de 12 L.



Figura 17. Cultivo de microalgas en botellas de 18 L.

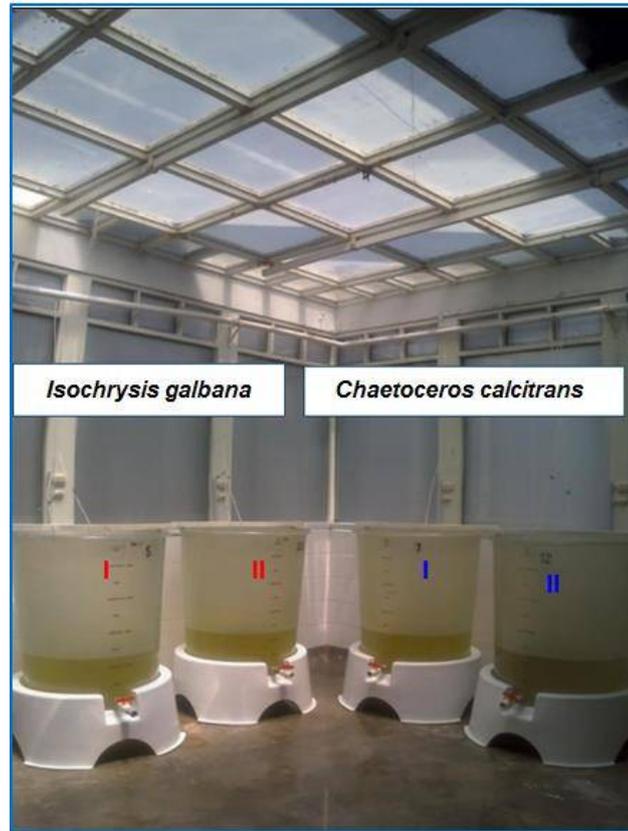


Figura 18. Cultivo de microalgas en tanques ubicados en ambiente semicontrolado.

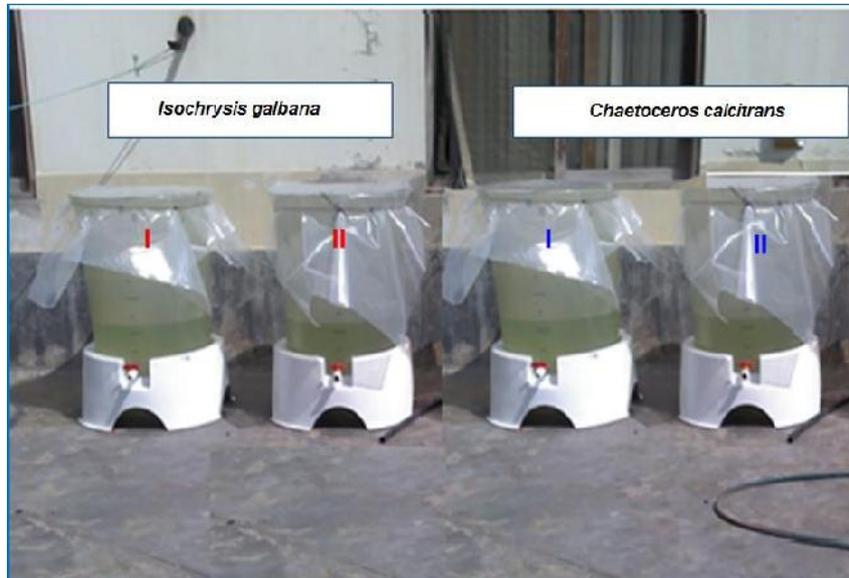


Figura 19. Cultivo de microalgas en tanques ubicado en ambiente no controlado.

6.3 DIÓXIDO DE CARBONO

La inyección del dióxido de carbono se hizo a razón del 7,81% de su volumen para los cultivos de 12 L y de 5,21% de su volumen para los cultivos de 18 L, diariamente, dosificado en dos partes: 08:00 y 17:00.

A los cultivos en tanque, no se les inyectó dióxido de carbono.

7. DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

La hipótesis fue contrastada mediante el Diseño Experimental de dos Grupos después con dos tratamientos y dos repeticiones: Ambiente Semicontrolado: Laboratorio (Tanques A y B) y No Controlado: Zona posterior del Laboratorio (Tanques A y B). Tabla 3.

Las densidades iniciales de los cultivos en los dos tratamientos se muestran en la Tabla 03.

Tabla 3. Diseño experimental, denominación de los tratamientos, ambiente y densidad celular de siembra, de *I. galbana* y *C. calcitrans* cultivadas en ambiente semicontrolado y no controlado.

Especie	Tratamiento	Ambiente	Repeticiones	Densidad celular (cel/ml/L)
<i>I. galbana</i>	I	Semicontrolado	a	840000
			b	845000
	II	No controlado	a	835000
			b	850000
<i>C. calcitrans</i>	I	Semicontrolado	a	955000
			b	975000
	II	No controlado	a	950000
			b	960000

8. PARÁMETROS

8.1 Crecimiento celular

El conteo celular se realizó diariamente, a la misma hora, usando una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad. (Fig. 20).

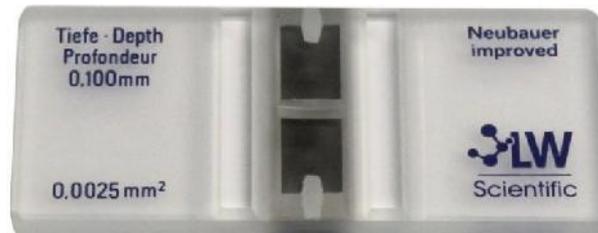


Figura 20. Cámara de Neubauer

8.2 Número de generaciones (n)

Según Madigan *et al.*, (2009) la expresión para calcular el número de generaciones durante la fase exponencial del cultivo es la siguiente:

$$N_t = N_0 2^n$$

Usando Logaritmos, despejamos n:

$$n = (\text{Log } N_t - \text{Log } N_0) / \text{Log} 2$$

8.3 Tasa específica de crecimiento (k)

Según Álvarez (1994) para la determinación de la tasa específica de crecimiento (k) expresada en divisiones por día, viene dada por la siguiente ecuación que describe la cinética de crecimiento:

$$k = (\log_2 N_f - \log_2 N_0) / (T_f - T_0)$$

Donde N_f y N_0 representan el número de células inicial y final registradas en los cultivos, y T_f y T_0 el tiempo transcurrido.

8.4 Tiempo de duplicación (TD)

Según Sherwood *et al.*, (2008) el tiempo de duplicación se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$TD = 1/k$$

Donde “TD” es el tiempo de duplicación en días y “k” la tasa específica de crecimiento.

9. Características Físico – Químicas

La temperatura ambiental se midió diariamente a las 08:00, 01:00 y 17:00 horas. Asimismo, la cantidad de lux (lx) se midió con un luxómetro marca SPER SCIENTIFIC 840020. El pH fue medido diariamente con cinta de papel pH marca DF UNIVERSAL TEST PAPER (0 – 14) y la salinidad al inicio y al final del ensayo, con ayuda de un refractómetro marca ATAGO.

10. Análisis estadístico

Finalizado el cultivo, para determinar el efecto de las repeticiones sobre la densidad celular de ambas especies, se aplicó el ANOVA simple (Sokal and Rohlf, 1995), siendo el modelo:

$$Y_{ij} = U + A_i + E_{ij}$$

Y_{ij} : Una medición cualquiera

U : Densidad verdadera

A_i : Efecto de las repeticiones sobre el crecimiento celular

E_{ij} : Error experimental

Luego se estimó el promedio de las densidades celulares de cada tratamiento y se aplicó el ANOVA para un modelo factorial simple (Ostle, 1994):

$$Y_{ijk} = U + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Y_{ijk} : Una medición cualquiera

U : Densidad verdadera

A_i : Efecto del ambiente sobre el crecimiento celular

B_j : Efecto del factor tiempo sobre el crecimiento celular

$(AB)_{ij}$: Efecto de la interacción de dos factores sobre el crecimiento celular (ambiente y tiempo).

E_{ij} : Error experimental.

Se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : El factor repeticiones, para el primer modelo y el factor ambiente, tiempo e interacción, para el segundo modelo no afectan al crecimiento celular.

H_a : El factor repeticiones, para el primer modelo y el factor ambiente, tiempo e interacción, para el segundo modelo afectan al crecimiento celular.

Las decisiones se tomaron de acuerdo a lo siguiente:

Aceptar H_0 si P es menor o igual a 0,05

Aceptar H_a si P es mayor a 0,05.

Se aplicó el test de Tukey para establecer a favor de que tratamiento se presentaron diferencias significativas. Los análisis estadísticos se procesaron en Excel 2010 y a través del programa Minitab 16,1 con un nivel de significación de $P = 0,05$.

III. RESULTADOS

1.0 Crecimiento de *Isochrysis galbana*

Terminado el proceso de cultivo, se observó que ambos tratamientos alcanzan la máxima densidad celular en el sexto día de cultivo, con ligeras diferencias entre sus repeticiones; asimismo, se aprecia que la densidad celular en el ambiente semicontrolado es superior a la del ambiente no controlado (Tabla 4 y Fig. 21 A y B).

El análisis de variancia para comparar las repeticiones, estableció que no existen diferencias significativas entre los valores observados ($p=0,805$, $p > 0,05$).

Al promediarse las repeticiones de cada tratamiento (Tabla 5), se encontró que el mayor crecimiento celular de *I. galbana* en el ambiente semicontrolado, se presentó desde el primer al cuarto día de cultivo, alcanzando la máxima densidad celular de 5 277500 cel/ml; en cambio, en el ambiente no controlado el crecimiento celular avanzó desde el segundo al sexto día donde alcanzó su máximo de 2 500000 cel/ml. Además, en el ambiente no controlado, hubo una fase de adaptación que duró los dos primeros días de cultivo, hecho que fue muy visible ya que las células muertas formaron un halo en la superficie del cultivo (Fig. 22).

El registro gráfico del crecimiento celular (Fig. 23), evidenció que la mejor performance con respecto al incremento de la densidad celular, fue a favor del ambiente semicontrolado desde el primer día de cultivo.

Tabla 4. Densidad celular en cada tratamiento con sus repeticiones de *I. galbana* en ambiente semicontrolado y no controlado.

Días de cultivo	Semicontrolado		No Controlado	
	I	II	I	II
Inicio	835000	845000	835000	850000
1	975000	955000	625000	650000
2	1400000	1550000	150000	350000
3	2500000	2790000	500000	500000
4	3500000	3900000	700000	800000
5	4100000	4500000	1250000	1500000
6	5350000	5200000	2250000	2750000
7	5000000	4950000	2130000	2350000
8	4250000	4120000	1930000	2100000

Tabla 5. Crecimiento (cel/ml) de *I. galbana* en ambiente semicontrolado y no controlado.

Tiempo	Ambiente	
	Semicontrolado	No Controlado
Inicio	840000	842500
1	965000	637500
2	1475000	250000
3	2642500	500000
4	3700000	750000
5	4300000	1375000
6	5275000	2500000
7	4975000	2240000
8	4182500	2015000

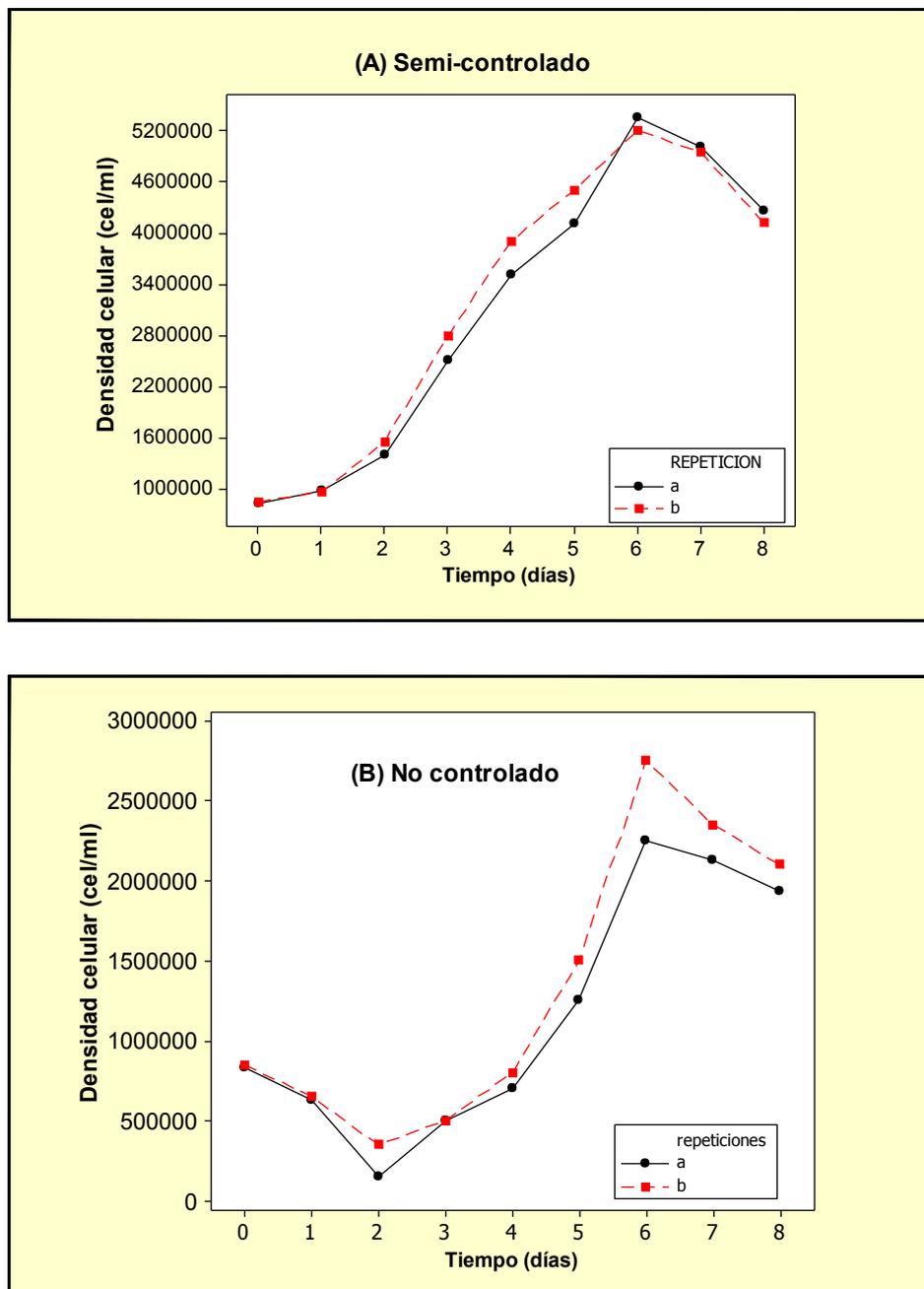


Figura 21. Curva de crecimiento de *I. galbana* en las repeticiones del ambiente Semicontrolado (A) y No controlado (B).

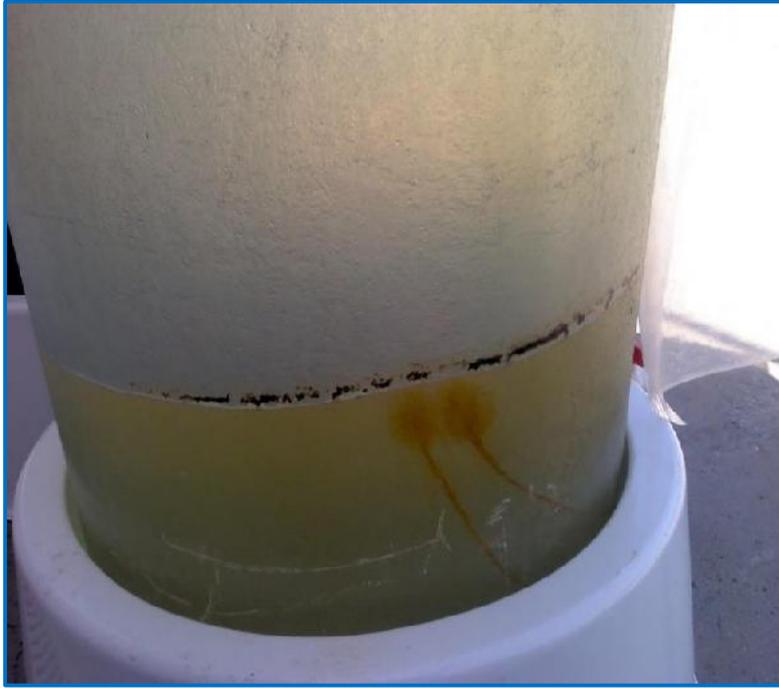


Figura 22. Formación de un halo de células muertas en el tanque de cultivo de *I. galbana* en el ambiente no controlado.

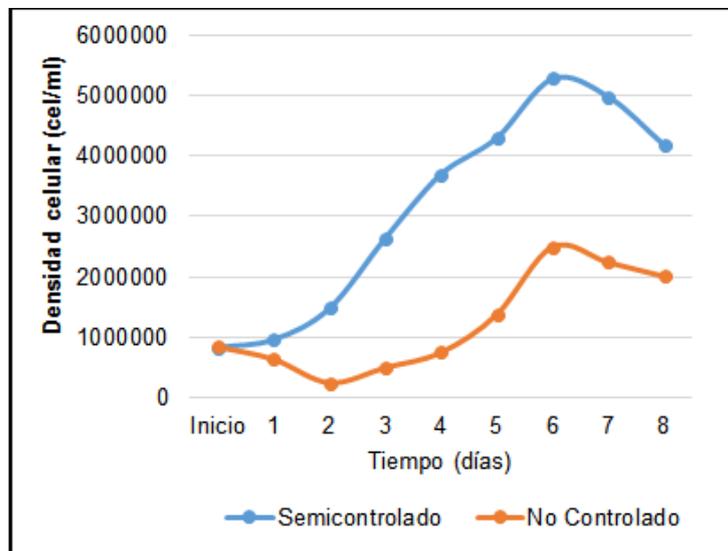


Figura 23. Variaciones del crecimiento de *I. galbana* en ambiente semicontrolado y no controlado.

El análisis de varianza para establecer diferencias significativas (Tabla 6), evidenció que efectivamente fue así, indicando que el crecimiento de la densidad celular fue afectado por el factor ambiente de cultivo, además del tiempo y la interacción de ambos factores.

La prueba de Tukey demostró que la densidad celular en el ambiente semicontrolado superó a aquella del ambiente no controlado a partir del segundo día de cultivo (Tabla 7). En relación al tiempo, la prueba de Tukey para el ambiente semicontrolado, evidenció crecimiento significativo el tercer, cuarto y sexto día de cultivo; en el ambiente no controlado solo se encontró crecimiento significativo en el sexto día (Tabla 8).

En cuanto a los parámetros poblacionales: incremento poblacional diario, tasa específica de crecimiento poblacional y tiempo de duplicación (Tabla 9 y Fig. 24 A y B), se aprecia que sus mejores valores se presentaron desde el primer al cuarto día en el ambiente semicontrolado y desde el segundo al sexto día en el ambiente no controlado.

En base al análisis de los parámetros poblacionales, la fase exponencial del crecimiento celular para el ambiente semicontrolado ocurrió desde el primer al cuarto día de cultivo, obedeciendo a la ecuación de regresión $y = 609288e^{0,4615x}$, con un coeficiente de correlación (R) de 0,9952; en cambio, en el ambiente no controlado esta fase se presentó desde el segundo al sexto día, siendo su ecuación de regresión $y = 147857e^{0,5617x}$, con un coeficiente de correlación de 0,9953.

Tabla 06. Análisis de varianza para determinar el efecto del ambiente, tiempo e interacción sobre el crecimiento celular de *I. galbana*.

FUENTE DE VARIACION	F	P
Tratamientos (Ambiente)	1 305,87	0,000
Tiempo	199,98	0,000
Interacción (Ambiente - Tiempo)	30,85	0,000

F: prueba de F, P= 0,05.

Tabla 7. Prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre la densidad celular del cultivo de *I. galbana*.

TIEMPO (días)	SEMI CONTROLADO	NO CONTROLADO	DIFERENCIA	DMS
1	965000	637500	327500	506382
2	1480000	250000	1230000*	506382
3	2640000	500000	2140000*	506382
4	3700000	750000	2950000*	506382
5	4300000	1380000	2920000*	506382
6	5280000	2500000	2780000*	506382
7	4980000	2240000	2740000*	506382
8	4180000	2010000	2170000*	506382

DMS : Diferencia mínima significativa de Tukey

* : Valor significativo al 0,05.

Tabla 8. Prueba de Tukey a través del tiempo para determinar diferencias significativas de *I. galbana* en el ambiente Semicontrolado (A) y Controlado (B).

(A) Semicontrolado

Tiempo	Menor	Mayor	diferencia	DMS
1-2	965000	1480000	515000	827090
2-3	1480000	2640000	1160000*	827090
3-4	2640000	3700000	1060000*	827090
4-5	3700000	4300000	600000	827090
5-6	4300000	5280000	980000*	827090
6-7	5280000	4980000	300000	827090
7-8	4980000	4180000	800000	827090

(B) No controlado

Tiempo	Menor	Mayor	diferencia	DMS
1-2	637500	250000	387500	827090
2-3	250000	500000	250000	827090
3-4	500000	750000	250000	827090
4-5	750000	1380000	630000	827090
5-6	1380000	2500000	1120000*	827090
6-7	2500000	2240000	260000	827090
7-8	2240000	2010000	230000	827090

DMS: Diferencia mínima significativa de Tukey

* : Valor significativo al 0,05.

Tabla 9. Tasa específica de crecimiento, Incremento, Tasa de crecimiento acumulada tiempo de duplicación y de *I. galbana* para el ambiente semicontrolado (A) y no controlado (B).

(A) Semicontrolado

Tiempo (Días)	Crecimiento (cel/ml)	Incremento (cel/ml)	Tasa de crecimiento (div/día)	Tasa de crecimiento acumulada (div/día)	Tiempo de duplicación (días)
Siembra	840000				
1	965000	125000	0,20	0,20	5,00
2	1475000	510000	0,61	0,81	1,63
3	2642500	1167500	0,84	1,65	1,19
4	3700000	1057500	0,49	2,14	2,06
5	4300000	600000	0,22	2,36	4,61
6	5275000	975000	0,29	2,65	3,39
7	4975000	-300000	-0,08	2,57	-11,84
8	4182500	-792500	-0,25	2,32	-3,99

(B) No controlado

Siembra	842500				
1	637500	-205000			
2	250000	-387500			
3	500000	250000	1,00	1,00	1,00
4	750000	250000	0,58	1,58	1,71
5	1375000	625000	0,87	2,45	1,14
6	2500000	1125000	0,86	3,32	1,16
7	2240000	-260000	0,16	3,48	6,25
8	2015000	-225000	-0,15	3,32	-6,54

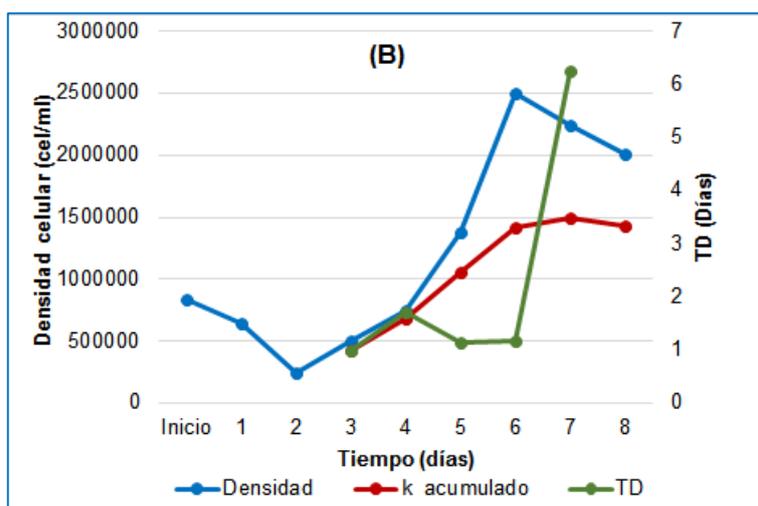
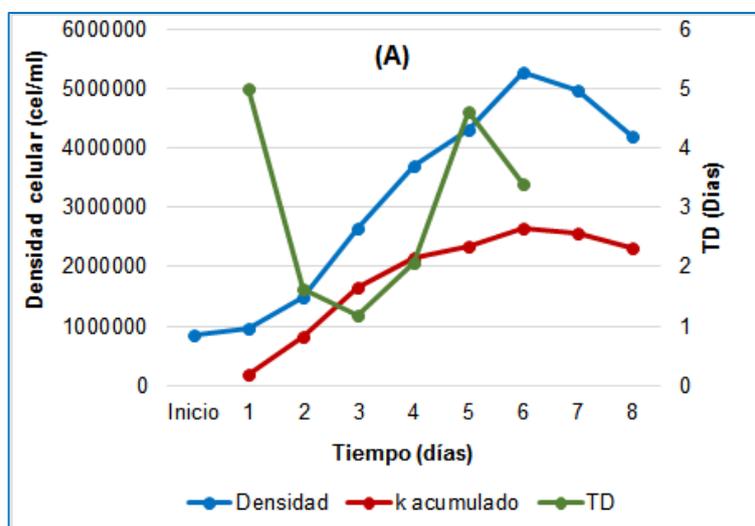


Figura 24. Variación de densidad celular, tiempo de duplicación y tasa de crecimiento acumulada de *I. galbana* para el ambiente semicontrolado (A) y no controlado (B).

En el ambiente semicontrolado, los parámetros poblacionales en la fase exponencial fueron de: 0,65 div/día para la tasa específica de crecimiento, 1,55 días para el tiempo de duplicación y 1,94 generaciones/día, para el número de generaciones; en el ambiente no controlado fueron: 0,83 div/día, 1,20 días y 3,32, respectivamente.

2.0 Crecimiento de *Chaetoceros calcitrans*

Culminado el proceso de cultivo que duró 08 días, se encontró que la máxima densidad celular se alcanzó el sexto día de cultivo tanto en el ambiente semicontrolado como en el ambiente no controlado, observándose también que existen ligeras diferencias entre las repeticiones de cada ambiente. Por otro lado, las algas cultivadas en el ambiente no controlado superaron la densidad celular del ambiente semicontrolado (Tabla 10 y Fig. 25 A y B).

Las diferencias observadas entre repeticiones fueron evaluadas mediante el análisis de variancia, que determinó que estas no son estadísticamente significativas ($P = 0,783$, $P > 0,05$).

Una vez promediadas las repeticiones de cada tratamiento, se aprecia que en el ambiente semicontrolado, el mayor crecimiento celular se presentó desde el segundo al cuarto día de cultivo, donde alcanzó la máxima densidad de $1,8425 \times 10^6$ cel/ml, apreciándose también una fase de adaptación durante los dos primeros días; sin embargo, en el ambiente no controlado, el mejor crecimiento ocurrió desde el la siembra al tercer día, alcanzando la máxima densidad de $4,175 \times 10^6$ cel/ml (Tabla 11). El análisis gráfico en función al tiempo (Fig. 26), demostró

Tabla 10. Densidad celular (cel/ml) de *C. calcitrans* en las repeticiones de los cultivos en ambiente semicontrolado y no controlado.

Días de cultivo	Semicontrolado		No controlado	
	I	II	I	II
Inicio	955000	975000	950000	960000
1	975000	945000	1625000	1500000
2	850000	925000	1850000	2050000
3	1200000	1300000	2500000	2950000
4	1550000	1485000	3000000	3200000
5	1700000	1725000	3150000	3250000
6	1850000	1835000	3950000	4400000
7	1750000	1800000	4100000	4000000
8	1250000	1450000	3750000	3985000

Tabla 11. Densidad celular promedio (cel/ml) de *C. calcitrans* cultivada en ambiente semicontrolado y no controlado.

Tiempo (Días de cultivo)	Semicontrolado	No Controlado
Inicio	965000	955000
1	960000	1562500
2	887500	1950000
3	1250000	2725000
4	1517500	3100000
5	1712500	3200000
6	1842500	4175000
7	1775000	4050000
8	1350000	3867500

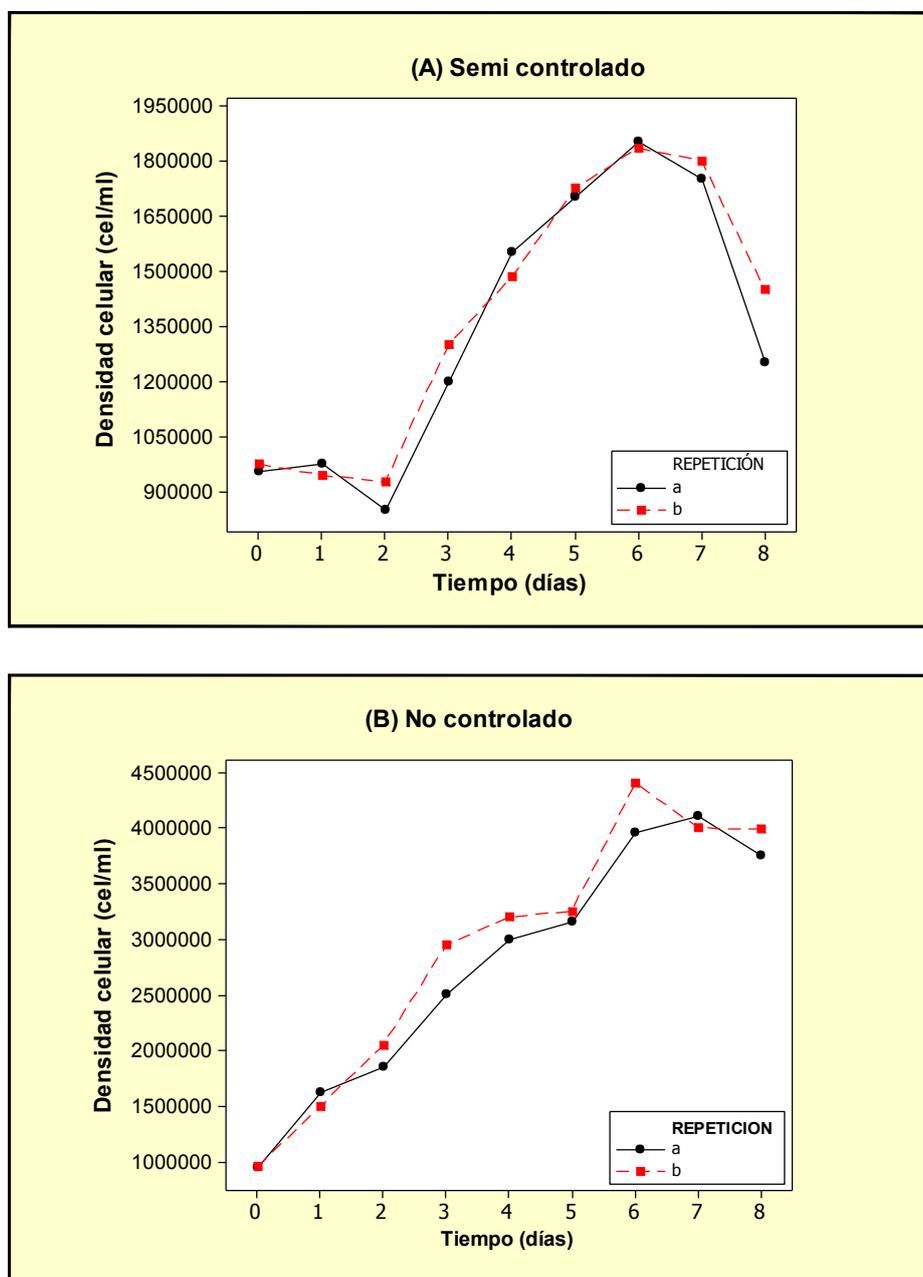


Figura 25. Curva de crecimiento de *C. calcitrans* en las repeticiones en el ambiente semicontrolado (A) y No controlado (B).

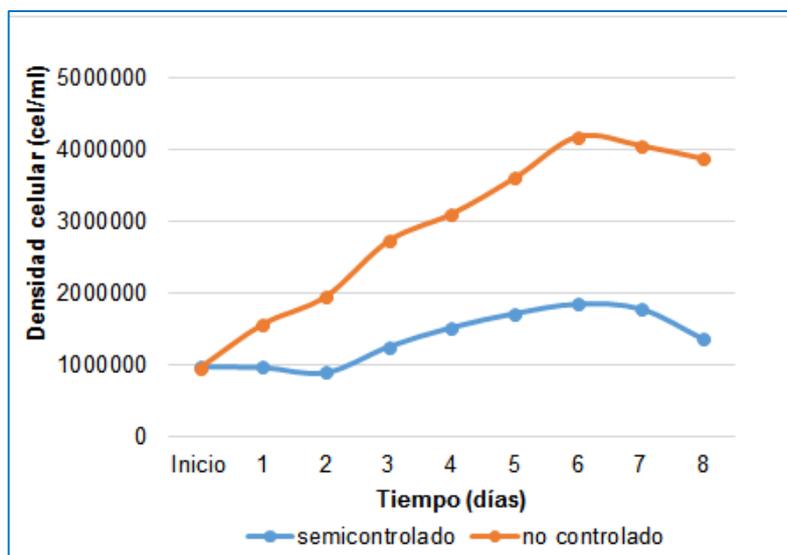


Figura 26. Curva de crecimiento promedio de *C. calcitrans* en ambos tratamientos.

Tabla 12. Análisis de varianza para determinar el efecto del ambiente, tiempo e interacción sobre el crecimiento celular de *C. calcitrans*.

FUENTE DE VARIACION	F	P
Tratamientos (Ambiente)	1 111,48	0,000
Tiempo	83,62	0,000
Interacción (Ambiente - tiempo)	22,22	0,000

F: valor de la prueba F, P: 0,05.

que el ambiente no controlado superó en densidad celular al ambiente semicontrolado, desde el primer día de cultivo.

El análisis de varianza estableció que las diferencias observadas en las densidades celulares entre ambos ambientes, son estadísticamente significativas (Tabla 12). La prueba de Tukey (Tabla 13), demostró que las diferencias significativas a favor del ambiente no controlado se presentaron desde el primer al octavo día del cultivo. En función al tiempo, la prueba de Tukey (Tabla 14 A y B), señaló que en el ambiente semicontrolado el crecimiento no fue significativo durante todo el proceso de cultivo; en cambio, en el ambiente no controlado, se presentó crecimiento significativo el tercer día de cultivo.

Respecto a los parámetros poblacionales, los mejores valores del incremento poblacional diario, tasa específica de crecimiento poblacional y tiempo de duplicación (Tabla 15 y Fig. 27, A y B), se presentaron desde el segundo al cuarto día para el ambiente semicontrolado y de la siembra hasta el tercer día en el no controlado.

La fase de crecimiento exponencial, teniendo en cuenta los parámetros poblacionales, abarcó desde el segundo al cuarto día de cultivo para el semicontrolado, respondiendo a la ecuaciones de regresión: $y = 695732e^{0,2682x}$, (Coeficiente de correlación R: 0,9875), y desde inicio al tercer día con la ecuación de regresión $y = 723153e^{0,3367x}$ (Coeficiente de correlación R²: 0,9766), para el ambiente no controlado.

Tabla 13. Prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre la densidad celular de ambos tratamientos del cultivos de *C. calcitrans*.

TIEMPO	Semicontrolado	No controlado	Diferencia	DMS
1	960000	1562500	602500*	424247
2	887500	1950000	1062500*	424247
3	1250000	2725000	1475000*	424247
4	1517500	3100000	1582500*	424247
5	1712500	3600000	1887500*	424247
6	1842500	4175000	2332500*	424247
7	1775000	4050000	2275000*	424247
8	1350000	3867500	2517500*	424247

DMS: diferencia mínima significativa. *: nivel de significancia al 0,05.

Tabla 14. Prueba de Tukey a través del tiempo para determinar diferencias significativas de *C. calcitrans* entre el ambiente Semicontrolado (A) y Controlado (B).

(A) Semicontrolado

Tiempo	Menor	Mayor	diferencia	DMS
1-2	960000	887500	72500	692937
2-3	887500	1250000	362500	692937
3-4	1250000	1517500	267500	692937
4-5	1517500	1712500	195000	692937
5-6	1712500	1842500	130000	692937
6-7	1842500	1775000	67500	692937
7-8	1775000	1350000	425000	692937

(B) No controlado

1-2	1562500	1950000	387500	692937
2-3	1950000	2725000	775000*	692937
3-4	2725000	3100000	375000	692937
4-5	3100000	3600000	500000	692937
5-6	3600000	4175000	575000	692937
6-7	4175000	4050000	125000	692937
7-8	4050000	3867500	182500	692937

DMS : Diferencia mínima significativa de Tukey

* : nivel de significancia 0,05.

Tabla 15. Tasa específica de crecimiento, Incremento, Tasa de crecimiento acumulada y tiempo de duplicación de *C. calcitrans*, para el ambiente semicontrolado (A) y no controlado (B).

(A) SEMICONTROLADO

Tiempo (Días)	Crecimiento (cel/ml)	Incremento (cel/ml)	Tasa de crecimiento (div/día)	Tasa de crecimiento acumulada (div/día)	Tiempo de duplicación (días)
Inicio	965000				
1	960000	-5000	-0,01		
2	887500	-72500	-0,11		
3	1250000	362500	0,49	0,49	2,02
4	1517500	267500	0,28	0,77	3,57
5	1712500	195000	0,17	0,94	5,73
6	1842500	130000	0,11	1,05	9,47
7	1775000	-67500	-0,05	1,00	18,57
8	1350000	-425000	-0,39	0,60	2,53

(B) NO CONTROLADO

Inicio	955000				
1	1562500	607500	0,71	0,71	1,41
2	1950000	387500	0,32	1,03	3,13
3	2725000	775000	0,48	1,51	2,07
4	3100000	375000	0,19	1,70	5,38
5	3600000	500000	0,22	1,91	4,64
6	4175000	575000	0,21	2,13	4,68
7	4050000	-125000	-0,04	2,08	-22,80
8	3867500	-182500	-0,07	2,02	-15,03

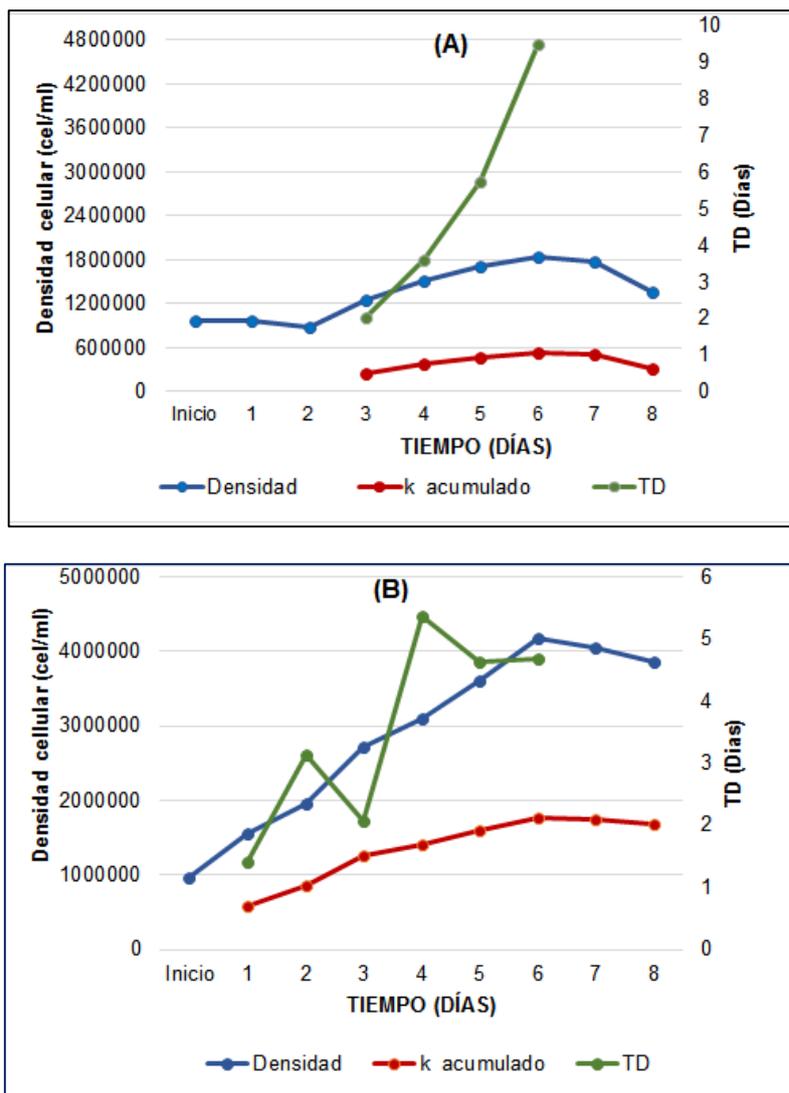


Figura 27. Variación de densidad celular, tiempo de duplicación y tasa de crecimiento acumulada de *C. calcitrans* para el ambiente semicontrolado (A) y no controlado (B).

La velocidad de crecimiento fue de 0,39 div/día, el tiempo de duplicación de 2,58 días y el número de generaciones de 0,77 generaciones/día, en el ambiente semicontrolado; en cambio, en el ambiente no controlado, su velocidad de crecimiento fue de 0,50 div/día, el tiempo de duplicación fue de 1,98 días y el número de generaciones de 1,51 generaciones/día.

3.0 PARAMETROS FISICO-QUIMICOS

3.1 Temperatura Ambiental

La temperatura promedio ambiental en el ambiente semicontrolado fue de 22,3 °C, 28,0 °C y 23,2 °C a las 8:00, 13:00 y 17:00 horas, respectivamente; en tanto, en el ambiente no controlado fueron de 22,9 °C, 29,1 °C y 22,3 °C, para los mismos horarios, observándose pequeñas diferencias entre ambos ambientes (Figura 28).

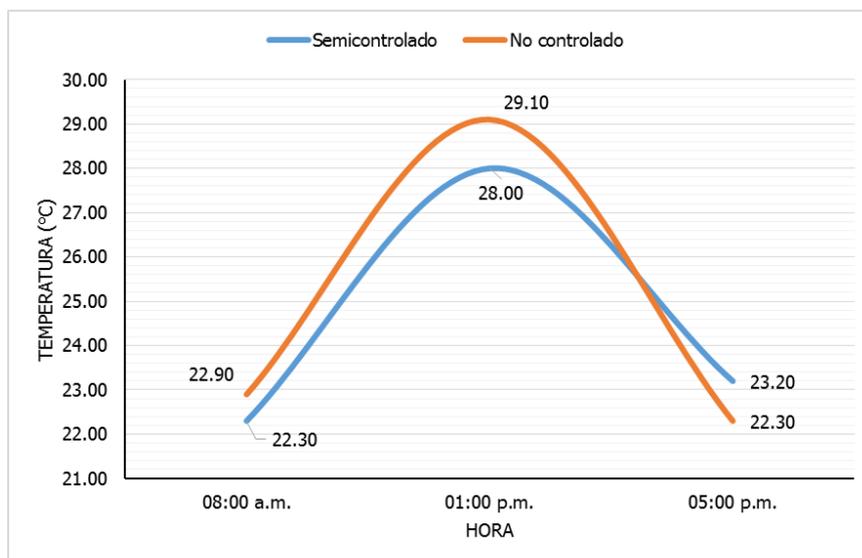


Figura 28. Curva de variación de la temperatura en los ambientes de cultivo a diferentes horas del día

3.2 Iluminación

En cuanto a las cantidades de luz promedio, se observa que estas fueron muy superiores en el ambiente no controlado con respecto al ambiente semicontrolado; así en el ambiente semicontrolado fueron de 5 199.4 lx, 15 052.5 lx y 1 301.8 lx a las 8:00, 13:00 y 17:00, respectivamente; mientras que en el ambiente no controlado estuvieron en 39 861.3 lx, 111 075 lx y 26 355 lx para los mismos horarios (Fig. 29).

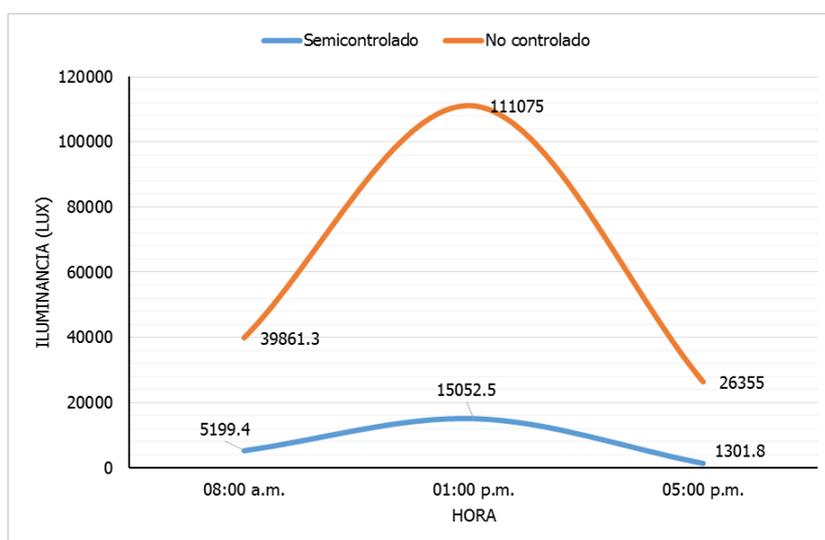


Figura 29. Curva de variación de la cantidad de luxs de los ambientes de cultivos a diferentes horas del día.

3.3 pH

El pH del medio de cultivo de *I. galbana* varió de 7 a 7,5 en el ambiente semicontrolado, al igual en el ambiente no controlado. En el caso de *C. calcitrans*, el pH osciló entre 7 a 7,5 en el ambiente semicontrolado, al igual que en el ambiente no controlado. En el cultivo de ambas especies y

ambientes, el pH observo la tendencia a incrementar su valor a medida que avanzó el proceso de cultivo (Tabla 16).

Tabla 16. Valores del pH durante el cultivo de *I. galbana* y *C. calcitrans*, en ambiente semicontrolado y no controlado.

Día	<i>I. galbana</i>		<i>C. calcitrans</i>	
	Semicontrolado	No Controlado	Semicontrolado	No Controlado
Inicio	7,0	7,0	7,0	7,0
1	7,0	7,0	7,0	7,0
2	7,0	7,0	7,0	7,0
3	7,0	7,0	7,0	7,5
4	7,5	7,0	7,5	7,5
5	7,5	7,5	7,5	7,5
6	7,5	7,5	7,5	7,5
7	7,5	7,5	7,5	7,5
8	7,5	7,5	7,5	7,5

3.4 Salinidad

La salinidad se mantuvo constante en los medios de cultivo de las dos especies y en ambos tratamientos, siendo de 35,3 ups.

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación, permitió evidenciar que la hipótesis planteada en el sentido de un mayor crecimiento celular en el ambiente semicontrolado, se cumplió parcialmente ya que así ocurrió en cultivo de *I. galbana*, no fue igual en el cultivo de *C. calcitrans*, donde el mayor crecimiento celular se presentó en el ambiente no controlado; lo cual se explicaría en que el alga *C. calcitrans*, probablemente tiene mayores exigencias de cantidad de luz, habiéndose observado que esta característica se aprecia en el ambiente no controlado, que fue muy superior al semicontrolado; sin embargo, es necesario precisar que la gran ventaja de los cultivos en ambientes no controlados o semicontrolados, es que se aprovecha la iluminación natural, pero que no existe control total sobre la temperatura ambiental, debido a las variaciones causadas por el día y la noche (Capa, 2010), por lo que los resultados son variables, es por eso que en ocasiones, se obtienen resultados mejores a los hechos en ambiente controlado, como es el caso de Lee & Kim (2002), Velasco *et al.*, (2009), Essman (2011), o menores como los de Durmaz *et al.*, (2008), Renaud *et al.*, (2002), Bougaran *et al.*, (2003), Sen *et al.*, (2005) y Gopinathan (1986).

En lo que se refiere al cultivo de *I. galbana*, se adaptó muy bien al ambiente semicontrolado ($25,15^{\circ}\text{C}\pm 2,85$), sin embargo no fue así en el ambiente no controlado ($25,7^{\circ}\text{C}\pm 3,4$). Las curvas de crecimiento generadas para ambos ambientes difieren entre sí, sobre todo la fase de adaptación, que en ambiente no controlado se aprecia más marcada donde se formó un halo de células muertas en los primeros días, mientras que en ambiente semicontrolado prácticamente está ausente. Varios autores señalan que la temperatura de 25°C incide de tal

manera que puede causar su muerte, debido a que afecta su metabolismo (Capa, 2010; Fogg & Kain, 1958; Kaplan *et al.*, 1986), pues la temperatura influye el llamado coeficiente de temperatura (Q10), donde la reacción enzimática se duplica aproximadamente con un aumento de la temperatura en 10°C (Goldman & Carpenter, 1974). Además, cuando la cantidad de luz solar es demasiado alta, las células son incapaces de la “foto-adaptarse” con suficiente rapidez y es por eso que se observó un halo de células muertas; pero una vez adaptada, no hubo necesidad de sombra y el crecimiento fue óptimo; mientras que en el ambiente semicontrolado, la sombra brindó protección del exceso de luz (Qiang & Richmond, 1994).

A través del análisis de variancia se determinó diferencias significativas en el crecimiento celular, habiéndose establecido, mediante la prueba de Tukey, que es a favor del ambiente semicontrolado donde se observó mayor crecimiento; sin embargo, se ha encontrado que la tasa de crecimiento de este ambiente es menor (0,65 div/día) a la del ambiente no controlado (0,83 div/día) e igualmente, el tiempo de duplicación es más alto en el ambiente semicontrolado (1,55 días) en comparación con el no controlado (1,20 días), hecho que aparentemente contradice los resultados; sin embargo, esto se explica debido a que la fase exponencial duró menos días y fue más rápido en el ambiente no controlado, y conociéndose que existe una relación inversa entre la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación, esta última es más baja.

En el ambiente semicontrolado, la presente producción fue mayor a la de Shain *et al.*, (2009), debido a que en nuestro ensayo, el cultivo recibió casi el triple de cantidad de lux y a la de Cisneros (1995), a pesar de que usó fotoperiodos de

24:0. Al parecer la luz es un factor que influye en el crecimiento, mucho más que la temperatura (López *et al.* 1992), así tenemos que entre 22 000 lx y 74 000 lx existe un buen rendimiento (Obata & Taguchi, 2012).

En cuanto al cultivo de *C. calcitrans*, los resultados muestran que puede rápidamente adaptarse a la nueva temperatura, sin pasar por una fase de adaptación (fase "Lag"), que represente una significativa muerte celular previa, ya que de un cultivo en ambiente controlado ($20,25^{\circ}\text{C}\pm 0,15$), pasaron a un cultivo en ambiente semicontrolado ($25,15^{\circ}\text{C}\pm 2,85$) y a otro no controlado ($25,7^{\circ}\text{C}\pm 3,4$); lo cual coincide con Lai *et al.*, (2013), que demostraron que se adapta bien a cambios de temperatura (24°C - 36°C) y que ésta no afecta su crecimiento; en esa misma línea, Renaud *et al.*, (2002), encontraron que *Chaetoceros sp.* crece muy bien a 30°C , evidenciando además, su tolerancia a altas temperaturas de 33°C y 35°C , con una moderada tasa de crecimiento de 0,53 div/día; finalmente, Banerjee *et al.*, (2011), observaron que dicha especie creció mejor al aire libre (24°C a 36°C), que en el laboratorio (23°C).

El análisis de variancia determinó la existencia de diferencias significativas en la producción celular entre tratamientos y a través de la prueba de Tukey, se estableció que es mayor en el cultivo en ambiente no controlado; hecho que está íntimamente ligado a la mayor velocidad del crecimiento y menor tiempo de duplicación que presentaron las células en este tratamiento.

Con respecto a su cultivo al aire libre, Banerjee *et al.*, (2011) y Lai *et al.*, (2013), al igual que este estudio, demostraron que los cultivos son viables en dichas condiciones y que se obtienen resultados iguales o mejores que en el laboratorio,

con una producción de $4,3 \times 10^6$ cel/ml y 0,28 g/L, respectivamente; siendo el primer resultado muy similar a este ensayo; y es que a diferencia de la luz artificial, la composición espectral de la luz solar puede producir cambios fisiológicos y bioquímicos (Voskresenskaya, 1972; Senger, 1987). Sin embargo, Raghavan *et al.*, (2008), en el caso de cultivos de *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus*, determinó que su crecimiento se ve afectada a los a 30°C ($1,8 \times 10^6$ cel/ml) y estableció una relación inversa entre temperatura y valor nutricional. Corroboró lo anterior, López *et al.*, (2008), que cultivó *C. muelleri*, y a pesar de que usaron medio Guillard f, sólo obtuvieron $2,88 \times 10^6$ cel/ml, densidad menor a la alcanzada en este ensayo, pero no es así cuando es cultivada bajo condiciones controladas (Pereira *et al.*, 2008; De Castro & Tavano, 2005). Por otro lado, en los ecosistemas naturales, el efecto de la temperatura no solo produce cambios en el crecimiento, sino que también afecta al metabolismo celular, la fotosíntesis, y absorción de nitrógeno y fósforo. Por ejemplo Anning *et al.*, (2001) propone que al aumentar la temperatura de cultivo, la microalga aumenta la concentración de pigmentos y sugiere que al bajar la temperatura su actividad fotosintética disminuye. Es más, de hecho existen otros factores que también modulan el efecto de temperatura sobre el crecimiento, tenemos por ejemplo la adición de CO_2 al cultivo de *Chlorella vulgaris*, que aún con temperaturas muy altas, ésta sigue creciendo (Chinnasamy *et al.*, 2009).

La temperatura de los cultivos varió entre 20°C y 29°C , correspondiendo a la estación de verano. El pH se incrementó a medida que aumentó la concentración celular, variando desde 7 a 7,5, valores que están dentro de los rangos normales. El pH comúnmente se incrementa por la absorción del ion nitrato, que es nivelado

por la adición de CO₂ mediante la aireación, ya que el aire contiene 0,03% de éste (Capa, 2010). Aunque mediante los procesos de respiración (noche) que acidifica y la fotosíntesis (día) que alcaliniza (Riley & Chester, 1971), se mantiene un equilibrio en el pH, aunque estos procesos no pueden controlar el pH completamente, cuando el cultivo es denso (Guillard, 1983).

V. CONCLUSIONES

1. El ambiente de cultivo afectó el crecimiento y producción de las microalgas, siendo mejor en el ambiente semicontrolado para *I. galbana* y en el ambiente no controlado para *C. calcitrans*.
2. El factor limitante para el crecimiento de *I. galbana* es la temperatura, mientras que para *C. calcitrans* es la cantidad de luz.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones con respecto a la adaptación de los inóculos de *I. galbana* y *C. calcitrans* antes de ser transferidos a los nuevos ambientes de cultivo.
2. Realizar investigaciones con otros medios de cultivo y fertilizantes foliares de uso comercial.
3. Realizar investigaciones en cuanto a la variación de intensidad lumínica y temperatura.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alvarez, H. (1994). Introducción al método ficológico. Capítulo III. pp 20 -27. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Impreso en Ecuador.
- Anning, T., Harris, G., Geider, R. (2001). Thermal acclimation in the marine diatom *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae). Eur. J. Phycol. 36:233-241. Francia.
- Banerjee, S., Hew, W., Khatoon, H., Shariff, M., Yusoff, F. (2011). Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. Afr. J. Biotechnol. Vol. 10(8), pp. 1375-1383, 21. Kenia.
- Borowitzka, M. (2005). Culturing microalgae in outdoor ponds. En Andersen. 2005. Editorial Elsevier Academic Press. pp 205 – 218. New York.
- Bougaran, G., Le Déan, L., Lukomska, E., Kaas, R. Y Baron, R. (2003). Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana* affinis Tahiti. Aquatic Living Resources, 16: 389-394.
- Capa, W. (2010). Biología y biotecnología de microalgas. 1era edición. ISBN: 978-9972-50-114-2. Biblioteca Nacional del Perú N° 2010-011461. Impreso por Graphic Chimbote SAC. pp 51-84.
- De Castro, S. Y Tavano, V. (2005). Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. Aquaculture 246. pp 405– 412.
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, A., Bhatnagar, A., Das, K. (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperatura. Int. J. Mol. Sci. 10:518-532.
- Cisneros, R. (1995). Cultivo masivo de la microalga marina *Isochrysis* sp. como fuente de alimento para post-larvas de moluscos bivalvos. Informe progresivo N° 36. IMARPE. Perú. pp 9
- Durmaz, Y., Donato, M., Monteiro, M., Gouveia, L., Nunes, M., Pereira, T., Gokpinar, S., Bandarra, N. (2008). Effect of Temperature on Growth and Biochemical Composition (Sterols, α -tocopherol, Carotenoids, Fatty Acid Profiles) of the Microalga, *Isochrysis galbana*. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh 0(3), 190-197.
- Essman, M. (2011). Determinación de parámetros biológicos de la microalga *Isochrysis aff. galbana*: comparación de un fotobioreactor continuo versus un cultivo batch.

- Tesis para optar por el título de Ingeniero en acuicultura. Universidad austral de Chile.
- Fogg, E., Kain, G. (1958). Studies on the growth of marine phytoplankton. II. *Isochrysis galbana* PARKE. F. mar. biol. Ass (1958) 37, 781 – 788. Reino Unido.
- Goldman, J., Carpenter, E. (1974). A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. Limnol. Oceanogr., 19, 756–66.
- Gopinathan, C. (1986). Differential growth rates of micro-algae in various culture media. Indian Journal of Fisheries. Vol 33. N° 4. pp 450 – 456.
- Guillard, R., Ryther, J. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol. 8: 229-239.
- Guillard, R. (1983). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Cultures of marine invertebrates. Selected readings. Hutchinson Ross Publ. Co. 385. En CISNEROS R. 1995. Cultivo masivo de la microalga marina *Isochrysis sp.* como fuente de alimento para post-larvas de moluscos bivalvos. Informe progresivo n° 36. IMARPE. Perú.
- Kaplan, D., Cohen, Z., Abeliovich, A. (1986). Optimal conditions for *Isochrysis galbana*. Biomass 9. pp 37 – 48. Gran Bretaña.
- Lai J., Yusoff, F. And Shariff, M. (2013). Large-scale culture of a tropical marine microalga *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) takano 1988 at different temperatures using annular photobioreactors. J Fish. Aquat. Sci. 2013. Canadá.
- Lee, J., Kim, B. (2002). Growth Characteristics of Five Microalgal Species Isolated from Jeju Island and Four Microalgal Stock Strains in Hatchery. ALGAE, vol. 17, no. 2, pp.117-125, June, 2002.
- López, I., Abalde, J., Herrero, C. (1992). Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. Nova Acta científica Compostelana (Biología). 3:59-65. España.
- López J., Enríquez F., Pablos M., Huerta N., Leal S., Miranda A., Nieves M., Vásquez S. (2008). Growth and biomass production of *Chaetoceros muelleri* in mass outdoor cultures: effect of the hour inoculation, size of the inoculum and culture medium. Rev. Invest. Mar. 29 (2):171-177.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. (2009). Brock Biología de los microorganismos, 12a edición. pp 161 - 163 UK, Pearson Education.

- Obata, M., Taguchi, S. (2012). The xanthophyll-cycling pigment dynamics of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) during light–dark transition. *Plankton Benthos Res* 7(3): 101–110, 2012.
- Ostle, B. (1994). *Estadística Aplicada*, Primera edición, Editorial Limusa, México, pp. 447-452
- Pereira, M., Sallet, O., Manceira, T., Cyrino, G. (2008). Cultivo da microalga marinha *Chaetoceros calcitrans* (bacillariophyceae) utilizando diferentes tipos de água marinha artificial. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 34(4): 563 - 569.
- Persoone, G., Claus, C. (1980). Mass culture of algae: a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. In: *Algae Biomass*, G. S. C. J. Shoeder, ed., Elsevier, Amsterdam: 265-285.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G., Olsen, Y., (1997). A review of the nutritional.
- Qiang, H., Richmond, A. (1994). Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*. August 1994, Volume 6, Issue 4, pp 391-396.
- Raghavan, G., Haridevi, C., Gopinathan, C. (2008). Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquaculture Research*, 39, 1053-1058.
- Renaud, S., Thinh, L., Lambrinidis, G., Parry, D. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211: 195-214. En Ohse S., Bianchini R., Avila R., Da Costa M., Cunha P., Pavan C., Estevaso M. (2008). Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. *Biotemas*, 21 (2): 7-18.
- Riley, J., Chester, R. (1971). *Introduction to marine chemistry*. Edit. Academic Press. 465pp. Londres.
- Sen, B., Alp M., Kocer, M. (2005). Studies of marine microalgae in batch cultures: II. *Isochrysis galbana* (Haptophyta). *Assian Journal of Plants Sciences* 4 (6):639-641.
- Shain, A., Torres, A., Serrano, S. (2009). Caracterización química del cultivo masivo de microalgas en condiciones semi-controladas. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 21 - 26 de junio. Acapulco. México.
- Sherwood, L., Willey, J., Woolverton, C. (2008). Prescott, Harley, and Klein's *Microbiology*. 7ma edición. pp 119 – 127. Editorial Higher Education. New York. EE.UU.
- Sokal, R., Rohlf, J. (1995). *Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research*. Editorial Reverte S.A. Barcelona 2da Edición. 880 pp

- Velasco, L., Barros, J., Ospina, G., Trujillo, A. (2009). Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana*. (Clon T- ISO). Rev. Intropica (4). pp 93 – 99. Colombia.
- Voltolina, D., Nieves, M., Piña, P. (2000). Calidad de microalgas para la acuicultura. pp 28-32. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Voskresenskaya, N. (1972). Blue light and carbon metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 23:219-234. USA.
- Yúfera, M., Lubián, L. (1990). Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. En: Introduction to applied phycology. Akatsuka, I. (ed), SPB Academic Publishinf bv. The Hague. 209-227 pp.