

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de la concentración del extracto acuoso de gallinaza en el crecimiento poblacional y contenido de proteína de Isochytis sp. cultivada al aire libre

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
ACUICULTOR**

Tesistas:

Bach. Aguilar Flores, Alfredo Alejandro

Bach. Macedo Duran, Amanda Isabel

Asesor:

Dr. Merino Moya, Juan Fernando

ORCID: 0000-0002-4848-3190

Nuevo Chimbote – Perú

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Efecto de la concentración del extracto acuoso de gallinaza en
el crecimiento poblacional y contenido de proteína de
Isochrysis sp. cultivada al aire libre**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. ALFREDO ALEJANDRO AGUILAR FLORES

BACH. AMANDA ISABEL MACEDO DURAN

Revisado y Aprobado por el Asesor.

Dr. JUAN FERNANDO MERINO MOYA

DNI: 17909299

ORCID: 0000-0002-4848-3190

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Efecto de la concentración del extracto acuoso de gallinaza en
el crecimiento poblacional y contenido de proteína de
Isochrysis sp. cultivada al aire libre**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. ALFREDO ALEJANDRO AGUILAR FLORES

BACH. AMANDA ISABEL MACEDO DURAN

**APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR
LOS SEÑORES MIEMBROS**

M. Sc. William Capa Robles
Presidente

Blgo. Acuic. Mirian Velásquez Guarniz
Integrante del Jurado

Dr. Fernando Merino Moya
Integrante del Jurado

DNI: 17909299

ORCID N°: 0000-0002-4848-3190

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el
Aula Multimedia 2° Piso Facultad Ciencias siendo las ...09... horas del
día 13/01/15 se reunió el Jurado Evaluador presidido por

M.Sc. William Capa Robles, teniendo como miembros a
Blga. Awi Miriam Velasquez Guarniz (secretario) (a) y
Dr. Fernando Menno Moya (integrante), para la sustentación de tesis a fin de

optar el título de Biólogo Avicultor, realizado por (el), (la),
(los) tesisistas Alfredo Alejandro Aguilar Flores
Amanda Isabel Macedo Duran

....., quien (es) expuso (ieron) el trabajo
intitulado: Efecto de la concentración del extracto acuoso de
gallinaza en el crecimiento poblacional y contenido de proteína
de *Isachrysis* sp. cultivada al aire libre

Terminada la sustentación, (el), (la), (los) tesisistas respondió (ieron) a las preguntas
formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y
sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como
Bueno asignándole un calificativo de 27 puntos,
según artículo 40° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del
Santa, vigente (Res.471-2002-CU-R-UNS)

Siendo las 10 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación
firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

.....
Nombre: William Capa Robles
Presidente

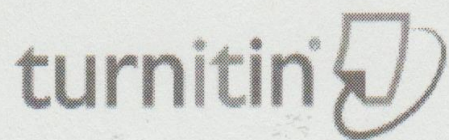
.....
Nombre: Miriam Velasquez Guarniz
Secretario

.....
Nombre: Fernando Menno Moya
Integrante

DNI: 17909299

ORCID: 0000-0002-4848-3190

Distribución: Integrantes J.E (03), tesisistas (02) y archivo (02).

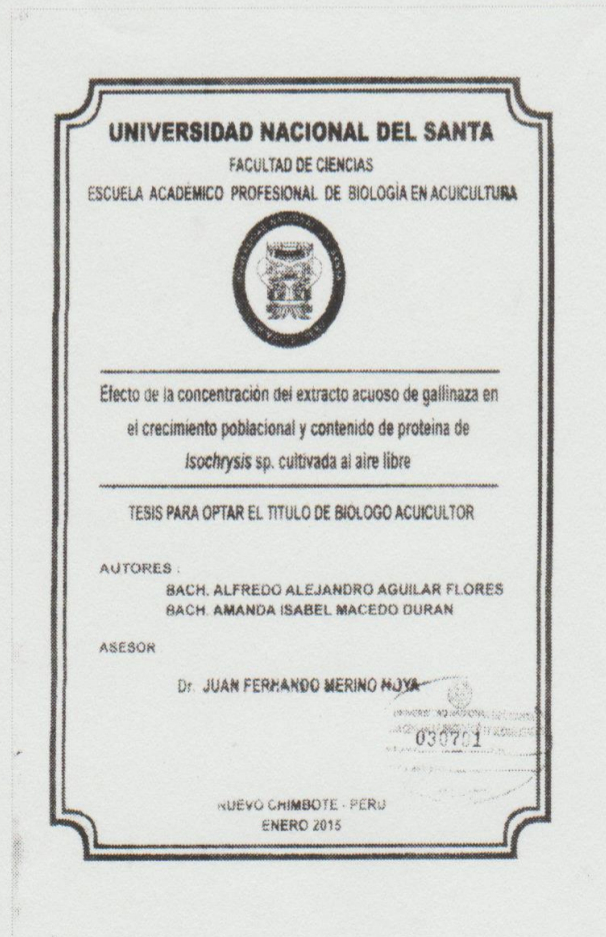


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: AMANDA ISABEL MACEDO DURAN
Título del ejercicio: TRABAJOS DE TESIS
Título de la entrega: Efecto de la concentración del extracto acuoso de gallinaza ...
Nombre del archivo: ecto_de_la_concentraci_n_del_extracto_acuoso_de_gallinaza_...
Tamaño del archivo: 38.52M
Total páginas: 49
Total de palabras: 12,018
Total de caracteres: 59,657
Fecha de entrega: 08-feb.-2024 09:10a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 2289553850



Fernando Merino M.
7909299

Efecto de la concentración del extracto acuoso de gallinaza en el crecimiento poblacional y contenido de proteína de *Isochrysis* sp. cultivada al aire libre

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%

INDICE DE SIMILITUD

23%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

11%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	fr.slideshare.net Fuente de Internet	6%
2	Submitted to Universidad Nacional del Santa Trabajo del estudiante	4%
3	1library.co Fuente de Internet	4%
4	core.ac.uk Fuente de Internet	3%
5	www.thefreelibrary.com Fuente de Internet	1%
6	ri2.bib.udo.edu.ve:8080 Fuente de Internet	1%
7	www.rim.uh.cu Fuente de Internet	<1%
8	docplayer.es Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres quienes me han apoyado para poder llegar a esta instancia de mis estudios, ya que ellos siempre han estado presentes en cada etapa de mi vida para apoyarme.

A Dios por seguir dándome salud en cada día que pasa, a mis padres, esposo, hijo y hermanos por estar siempre a mi lado y a mis Amigos, que siempre me apoyaron y aun lo siguen haciendo.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por su apoyo que nos brinda y fortaleza de seguir adelante y no rendirnos ante las adversidades.
- A nuestros padres quienes son la Razón de nuestras vidas y han Sabido formarnos con buenos Sentimientos, hábitos y valores los cuales nos han ayudado a salir adelante buscando siempre el mejor camino.
- A nuestro asesor Blgo. Pesq. Juan Fernando Merino Moya Dr., por su reiterada ayuda profesional en la elaboración del presente trabajo.
- A cada uno de los docentes de la Escuela Académica Profesional de Biología en Acuicultura de la Universidad Nacional de la Santa quienes contribución en nuestra formación profesional, por habernos inculcado y brindado conocimientos, valores morales y experiencias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	5
Objetivos general	5
Objetivos específicos	5
II. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. Localización del experimento	6
2.2. Material biológico	6
2.3. Tratamiento del agua de cultivo	6
2.4. Preparación de los inóculos de <i>Isochrysis</i> sp.....	6
2.5. Preparación de los medios de cultivo.....	7
2.5.1. Medio de cultivo Guillard f/2.....	7
2.6. Preparación del medio de cultivo con extracto acuoso de gallinaza (EGAL).....	8
2.7. Acondicionamiento de las unidades experimentales.....	8
2.8. Determinación del crecimiento poblacional de <i>Isochrysis</i> sp.	11
2.9. Determinación de la biomasa en los cultivos de <i>Isochrysis</i> sp.....	11
2.10. Determinación de las proteínas de <i>Isochrysis</i> sp.	12
2.11. Análisis estadístico de los datos	13
III. RESULTADOS.....	14
3.1. Parámetros ambientales del cultivo de <i>Isochrysis</i> sp.....	14
3.1.1. Temperatura	14
3.1.2. pH	15
3.2. Crecimiento poblacional en los cultivos de <i>Isochrysis</i> sp.....	16
3.2.1. Curvas de crecimiento poblacional	16
3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional	18

3.3. Contenido de proteínas en <i>Isochrysis</i> sp.	18
IV. DISCUSIÓN.....	22
V. CONCLUSIONES	28
VI. RECOMENDACIONES.....	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Guillard f/2 para 1 L.	7
Tabla 2. Tratamientos utilizados en los cultivos de la microalga <i>Isochrysis</i> sp. con extracto acuoso de gallinaza y grupo control (Guillard f/2) por triplicado.....	9
Tabla 3. Composición química del extracto acuoso de gallinaza.....	10
Tabla 4. Concentración calculada de los nutrientes dosificados de EGAL grupo control (Guillard f/2) en los cultivos de <i>Isochrysis</i> sp.....	10
Tabla 5. Densidad Poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de <i>Isochrysis</i> sp. en los cultivos con EGAL y grupo control (Guillard f/2).....	16
Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de <i>Isochrysis</i> sp., en los cultivos con EGAL y grupo control (Guillard f/2).....	18
Tabla 7. Contenido de proteínas en porcentaje (%) y biomasa (mg L ⁻¹) al sexto día de cultivo en <i>Isochrysis</i> sp. dosificados con EGAL y grupo control (Guillard f/2).....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Flujo de la preparación de EGAL utilizado en el cultivo de <i>Isochrysis</i> sp.....	8
Fig. 2. Flujograma del método colorimétrico de Lowry <i>et al.</i> (1951) empleado en la presente investigación.....	12
Fig. 3. Valores de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>Isochrysis</i> sp. con EGAL y grupo control (Guillard f/2).....	14
Fig. 4. Valores promedio del pH en los cultivos de <i>Isochrysis</i> sp. con EGAL y grupo control (Guillard f/2).....	15
Fig. 5. Densidad poblacional promedio de <i>Isochrysis</i> sp. en los cultivos con EGAL y grupo control (Guillard f/2).....	16
Fig. 6. Unidades experimentales de <i>Isochrysis</i> sp. cultivadas con medio EGAL y grupo control (Guillard f/2), en distribución completamente al azar.....	17
Fig. 7. Porcentaje de proteínas de <i>Isochrysis</i> sp. en los tratamientos dosificados con EGAL y grupo control (Guillard f/2).....	19
Fig. 8. Biomasa de proteínas de <i>Isochrysis</i> sp. en los tratamientos dosificados con EGAL y grupo control (Guillard f/2).....	20

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivos determinar la densidad poblacional, tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD), y el contenido de proteínas de la microalga *Isochrysis* sp. cultivada a concentraciones de 2,5; 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ del extracto acuoso de gallinaza (EGAL) cultivadas al aire libre. Las mayores densidades poblacionales de *Isochrysis* sp. al sexto día de cultivo se encontraron con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL con 9,29 y 8,96 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente; y fue menor con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL con 7,07 x10⁶ cél. mL⁻¹. Las mayores μ al sexto día de cultivo fueron con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL con 0,448 y 0,442 día⁻¹, respectivamente; y fue menor con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL con 0,402 día⁻¹. Los mayores TD al sexto día de cultivo se encontraron con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL con 1,725 día, respectivamente; y fueron menores con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL con 1,549 y 1,567 día, respectivamente. Los mayores porcentajes de proteínas de *Isochrysis* sp. al sexto día de cultivo fueron con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL con 28,18 y 28,31 %, respectivamente; y menor con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL con 21,96 %. Asimismo, la biomasa de proteínas fueron mayores con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL con 115,44 y 111,65 mg L⁻¹, respectivamente, y menor con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL con 66,96 mg L⁻¹. Se concluye que el mejor tratamiento para el crecimiento poblacional y contenido de proteínas fue el dosificado con 5,0 mL L⁻¹ de EGAL.

Palabras Clave: Microalga, *Isochrysis* sp., extracto acuoso, gallinaza, crecimiento poblacional, proteínas.

ABSTRACT

This study aims, determine the population density, growth rate (μ) and doubling time (TD), and the protein content of the microalgae *Isochrysis* sp. cultured at concentrations of 2,5; 5,0 and 10,0 mL L⁻¹ of aqueous extract of chicken manure (ECM) grown outdoors. The highest population densities of *Isochrysis* sp. on the sixth day of culture was with 5,0 and 10,0 mL L⁻¹ with 9,29 and 8,96 cel x10⁶ mL⁻¹ of ECM, respectively; and was lower with 2,5 mL L⁻¹ of ECM with 7,07 x10⁶ cel. mL⁻¹. The highest μ on the sixth day of culture were with 5,0 and 10,0 mL L⁻¹ of ECM with 0,448 and 0,442 day⁻¹, respectively; and was lower with 2,5 mL L⁻¹ of ECM with 0,402 day⁻¹. The highest TD on the sixth day of cultivation was found with 2,5 mL L⁻¹ of ECM with 1,725 day; and were lower with 5,0 and 10,0 mL L⁻¹ of ECM with 1,549 and 1,567 day, respectively. The highest percentages of proteins *Isochrysis* sp. on the sixth day of culture was with 5,0 and 10,0 mL L⁻¹ of ECM with 28,18 and 28,31 %, respectively; and lower with 2,5 mL L⁻¹ ECM with 21,96 %, respectively. Also, biomass protein were higher with 5,0 and 10,0 mL L⁻¹ of ECM with 115,44 and 111,65 mg L⁻¹, respectively; and lower with 2,5 mL L⁻¹ of ECM with 66,96 mg L⁻¹, respectively. We conclude that the best treatment for population growth and protein content was dosed with 5,0 mL L⁻¹ of ECM.

Key Words: Microalgae, *Isochrysis* sp., aqueous extract, chicken manure, population growth, protein.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos unicelulares, coloniales o filamentosos; realizan fotosíntesis, siendo pioneras en la producción primaria de los medios acuáticos (Abalde *et al.*, 1995; Romo, 2002; Garibay *et al.*, 2009; Silva *et al.* 2011; Ulloa, 2011; Marchetti *et al.*, 2012). Estas tienen la capacidad para convertir sustancias inorgánicas en azúcares simples mediante la captura de energía luminosa (Honty, 2010; Ruiz, 2011); también crecen empleando materia orgánica como aguas residuales, excretas de aves o de animales domésticos como fuente de energía o de carbono (Ruiz, 2011), con tasas de crecimiento elevadas, condición que proporciona alta producción de biomasa en intervalos de tiempos que pueden ser de unos pocos días. Las microalgas son una fuente viable y económica para la producción de gran variedad de sustancias, como ácidos grasos poliinsaturados como el DHA (ácido docosahexaenoico), EPA (ácido eicosapentaenoico), omega 3 y omega 6, clorofila, carotenoides, proteínas, ficocianina, ficoeritrina, exopolisacáridos y vitaminas como la A, B1, B2, B6, C, y E, minerales, antioxidantes (carotenos) y otros productos químicos de interés (Del Campo *et al.*, 2007; Quevedo *et al.*, 2008; Ulloa, 2011; Salazar, 2012).

Isochrysis sp. pertenece a la Clase Prymnesiophyceae (Haptophyta) (Sánchez *et al.*, 2000; Falinski, 2009; Yago *et al.*, 2012), de la Familia Isochrysidaceae (Ronsón, 2010; López *et al.*, 1996). Es un alga unicelular móvil, de color amarillo-marrón (González, 2000), de forma elipsoidal, y con un tamaño entre 3 y 6 μm . (López *et al.*, 1996; González, 2000; Falinski, 2009; Ronsón, 2010). Presenta flagelos lisos (López *et al.*, 1996; Falinski, 2009) de más o menos 7 μm de largo (Falinski, 2009). No presentan pared celular (López *et al.*, 1996), sólo poseen una membrana plasmática (Falinski, 2009) la cual le permite ser fácilmente digerible por los consumidores. Es una buena fuente de ácidos grasos poliinsaturados como EPA y DHA (Falinski, 2009; Ronsón, 2010).

Isochrysis sp. es de gran interés en la acuicultura, principalmente para alimentar larvas de moluscos, así como peces y crustáceos en las etapas tempranas de crecimiento (Sánchez *et al.*, 2000), aunque para su cultivo, ya

sea en condiciones de laboratorio o a gran escala, se han utilizado los medios nutritivos analíticos convencionales como Provasoli, Walne, Guillard f/2, entre otros. Sin embargo, éstos tienen costos elevados, lo que constituye un límite de la capacidad productiva en laboratorios, creando la necesidad de evaluar otros medios que brinden buena calidad nutricional, permitan mejorar el rendimiento microalgal y a la vez disminuyan los costos de producción en cultivos masivos (Gómez *et al.*, 2011). En tal sentido, la utilización de fertilizantes agrícolas, tales como urea, sulfato de amonio, superfosfato triple, son alternativas para abaratar costos de producción (Vera & Gonzalez, 2001), sin embargo el creciente aumento en los costos de éstos fertilizantes origina la búsqueda de fuentes alternativas, particularmente de nitrógeno; pero teniendo en cuenta, los serios problemas de contaminación por el uso excesivo de dichos fertilizantes (Quevedo *et al.*, 2008).

En el departamento de Ancash, como a nivel mundial, la industria avícola genera residuos sólidos (heces) que puede ser utilizado; así, en Venezuela estos residuos son utilizados en cultivos agrícolas, permitiendo el uso de un residuo que causaría la contaminación de aguas, suelo y del aire por manejo inadecuado (Rivero & Carracedo, 1999); mientras que la mayoría es desechado o tirado al ambiente terrestre. Su uso como para alimentar organismos acuáticos en cultivos extensivos, es poco aprovechado por los estadios iniciales de peces, moluscos y crustáceos por disminuir la calidad de agua y los tenores de oxígeno disuelto, asimismo el aumento de amonio afecta negativamente la supervivencia de aquellos organismos acuáticos. Adicionalmente los restos no consumidos al sedimentarse en el fondo de los estanques de cultivo, ocasionan serios problemas de eutrofización. Por lo que cultivar *Isochrysis* sp., con estos desechos ayudaría en los problemas de contaminación.

Por ello la atención mundial se ha volcado hacia el uso de desechos orgánicos desechables de diversos orígenes como fertilizantes (Benedetti *et al.*, 1998). Los desechos animales tienen una larga historia de uso como fuente de fósforo, nitrógeno y carbono para el crecimiento microalgal y la producción de alimento natural (Knud-Hansen, 1998). El cultivo de microalgas con desechos

animales ricos en nitrógeno y fósforo se presenta como una alternativa al uso de medios de cultivos inorgánicos los cuales son altamente costosos.

Las excretas de gallina (gallinaza) se compone de deyecciones de las aves de corral y material usado como cama, en general cascarilla de arroz mezclada con cal en pequeña proporción, viruta o pasto seco colocada en el piso (Hernández & Cruz, 1993; Estrada, 2005). Tiene un alto contenido de humedad y altos contenidos de nitrógeno, que se volatiliza rápidamente. Para solucionar el problema es necesario someter a la gallinaza a secado. Al ser deshidratada, se produce un proceso de fermentación aeróbica que genera nitrógeno orgánico, siendo mucho más estable (Estrada, 2005). Uno de los nutrientes más variables es la proteína cruda, la cual es afectada por la humedad que contenga, ya que las bacterias presentes en el material desdoblan el ácido úrico y lo convierten en amoníaco, el cual se evapora. También posee un alto contenido de calcio, que alcanza valores de 6 % hasta 10-12 % (Hernández & Cruz, 1993).

La utilización de extracto acuoso de gallinaza como medio para el cultivo de *Isochrysis* sp. permitiría aprovechar la presencia de carbono, nitrógeno y otros nutrientes orgánicos encontrados en ella para el crecimiento microalgal. Además, el bajo costo de este producto favorecerá a disminuir tanto los costos de producción microalgal y permitirá el reciclaje de tales residuos. Asimismo, los cultivos microalgales pueden realizarse al aire libre, dado que el suministro de energía luminosa es un factor limitante para la producción microalgal y permite la disminución de los costos de cultivo, pero hay que tener en cuenta factores ambientales que se deben controlar como la exposición al ambiente, la temperatura, la irradiación solar y la contaminación por protozoarios (Van Bergeijk *et al.*, 2010; Cordoba-Matson *et al.*, 2013; Sheets *et al.*, 2014).

Van Bergeijk *et al.* (2010), cultivaron *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) en medio Guillard f/2 incorporando CO₂ y condiciones de aire libre en sistema cerrado fotobiorreactores tubulares de serpentín con 60 m de tubos acrílicos a 180° de inclinación, haciendo un volumen de 400 L de cultivo. Determinaron la tasa de crecimiento, productividad y eficiencia energética, los cuales presentaron valores promedio de 0,39 día⁻¹; 0,075 g L⁻¹ día⁻¹ y 2,51 %, los mismos que

fueron cultivados en laboratorio y que les sirvieron de inóculo. Los valores promedio para la tasa de crecimiento, productividad y eficiencia fotosintética al final del trabajo de investigación fueron de $0,91 \text{ día}^{-1}$; $0,076 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y $13,72 \%$, respectivamente. A su vez mencionan que la temperatura y la irradiación solar, son factores más importantes a tener en cuenta de los cultivos al aire libre y que tienen efecto en la tasa de crecimiento y productividad microalgal.

Iyovo *et al.* (2010), trabajaron con gallinaza digerida (GD) y su efecto en la biomasa celular y producción de lípidos en *Chorella vulgaris*. El cultivo se llevó a cabo "con dosificación" y "sin dosificación" de GD teniendo como base el medio basal Bold's según Watanabe (1960). Los tratamientos se realizaron dos etapas (0-120 h y 120-180 h), a 120 h con suplementación de 2 g L^{-1} de glucosa alcanzaron un peso seco de 2,6; 13,14 y 14 g L^{-1} ; y rendimientos de lípidos de 2,9; 3,8 y $4,9 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, después de 180 h. Los autores mencionan que la adición de glucosa parece ayudar al agotamiento de nitrógeno que a su vez resultó en un rápido aumento de los lípidos celulares, indicando que tienen influencia en la composición total de *Chorella vulgaris*.

Las microalgas representan una fuente proteínica con posibles aplicaciones en la nutrición humana y como complemento de piensos animales, debido básicamente a sus elevados contenidos proteicos, potenciados por el hecho de poseer un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteína unicelular (Abalde *et al.*, 1995; Marchetti *et al.*, 2012; Saucedo *et al.*, 2013), siendo su caracterización química, sobre en proteínas, esencial para determinar las especies más adecuadas para aquellos fines (Batista *et al.*, 2013; Saucedo *et al.*, 2013).

Muchas microalgas tienen un alto contenido en proteínas, aunque su utilización es limitada debido principalmente a que los elevados costos de producción de la biomasa microalgal impide competir con los alimentos tradicionales (Quevedo *et al.*, 2008; Ulloa, 2011; Salazar, 2012; Saucedo *et al.*, 2013). Singh *et al.* (2011), evaluaron el potencial de las microalgas *Chlorella minutissima*, *Chl. sorokiniana* y *Scenedesmus bijuga*, cultivadas con efluentes de los desperdicios avícolas digeridas anaeróticamente (EDA) como medio de cultivo, encontrando que la productividad de biomasa fue $76 \text{ mg por L}^{-1} \text{ D}^{-1}$, siendo rica

en proteínas (39 % p/p) e hidratos de carbono (22 %); mientras, que los lípidos (<10%) fueron relativamente bajos. Estos porcentajes pueden tener una gran variación dependiendo de las condiciones de cultivo; así, en *I. galbana*, Batista *et al.* (2013) y Saucedo *et al.* (2013), muestran porcentajes de proteínas de 39,6 y 14,4 %, respectivamente.

Los ensayos previos realizados con el extracto acuoso de gallinaza en el cultivo de *Isochrysis* sp. en laboratorio demuestran la posibilidad de transformarlo eficientemente en biomasa microalgal. Por lo que se considera que la biotransformación de éste subproducto será eficiente y a la vez se desarrollará una metodología de producción de microalgas, lo que justifica la ejecución del presente trabajo. Siendo además importante la presente investigación dado la biotransformación de los residuos de la producción avícola (gallinaza) en biomasa microalgal como proteínas de *Isochrysis* sp. la misma que puede ser utilizado como alimento para la acuicultura y a la vez de reducir la contaminación mediante el reciclaje de los desechos. Por todo ello se ha planteado el siguiente problema de investigación: ¿Cuál será el efecto de la concentración del extracto acuoso de gallinaza en el crecimiento poblacional y contenido de proteína de *Isochrysis* sp. cultivada al aire libre?

De acuerdo a la información obtenida se planteó la siguiente hipótesis: Si empleamos extracto acuoso de gallinaza (EGAL) como medio de cultivo a concentraciones de 2,5; 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ en el cultivo de la microalga *Isochrysis* sp., se encontrará que a 5,0 mL L⁻¹ se obtiene un mayor crecimiento poblacional y contenido de proteínas.

El trabajo de investigación tiene como objetivo general: Evaluar el efecto de la concentración del extracto acuoso de gallinaza en el crecimiento poblacional y contenido de proteína de *Isochrysis* sp. cultivada al aire libre; y como objetivos específicos:

- Determinar la densidad poblacional, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de *Isochrysis* sp. cultivada con diferentes concentraciones de EGAL al aire libre; y
- Determinar el contenido de proteínas de *Isochrysis* sp. cultivada con diferentes concentraciones de EGAL al aire libre.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del experimento

El experimento se realizó en una zona adyacente del Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Perú; entre los días 20 al 31 de agosto del 2014.

2.2. Material biológico

La cepa de microalga *Isochrysis* sp. (Clon T-ISO, CCMP 1324) fue obtenida del Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la E.A.P. Biología en Acuicultura de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, la cual se mantuvo con medio Guillard f/2 (Guillard, 1975) en matraces de 200 mL e iluminados con un fluorescente de 40 w, con agitación manual diaria, hasta la utilización en el trabajo de investigación.

2.3. Tratamiento del agua de cultivo

El agua de mar utilizada para los cultivos fue colectada de la playa "El Dorado" ubicada en la bahía de Samanco, distrito de Nuevo Chimbote (Perú). Se trasladó a la Universidad aproximadamente 700 L de agua de mar en un tanque plástico de 1100 L. Una vez en el laboratorio, 150 L de agua de mar se dejó sedimentando en un bidón de plástico por 5 días y se filtró a 5 μm con malla de Nylal y almacenándolo en bidones plásticos de 18 L, seguido se agregó 0,5 mL de hipoclorito de sodio (5,25 %) por cada litro de agua de mar por 24 h. Luego se agregó tiosulfato de sodio al 15 % a razón de 0,5 mL por cada litro de agua de mar y se proporcionó a dar aireación vigorosa (5 L min^{-1}) por 1 h para volatilizar el posible cloro residual.

2.4. Preparación de los inóculos de *Isochrysis* sp.

Los inóculos microalgales para el experimento fueron preparados inicialmente en 2 matraces de 1000 mL (400 mL volumen efectivo de cultivo), utilizando agua de mar esterilizada en autoclave con medio Guillard f/2 (121 °C, 15 min, 15psi). Estos inóculos de *Isochrysis* sp. se mantuvieron por 4 días con iluminación constante (2000 lux) y se agitaron manualmente dos veces al día. Después fueron transferidos a 2 botellas de 3000 mL con un volumen efectivo de 2000 mL, manteniendo constante la iluminación (2000 lux) y aireación (200 mL min⁻¹), teniendo un volumen efectivo de 4000 mL los que se utilizaron como inóculos para los cultivos del trabajo de investigación, las mismas que se encontraron en la fase de crecimiento exponencial al quinto día de cultivo microalgal.

2.5. Preparación de los medios de cultivo

2.5.1. Medio de cultivo Guillard f/2

El medio de cultivo Guillard f/2 (tabla 4) que se utilizará para el mantenimiento de los inóculos de *Isochrysis* sp. y el grupo control, será preparado según lo propuesto por Guillard (1975).

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Guillard f/2 para 1L.

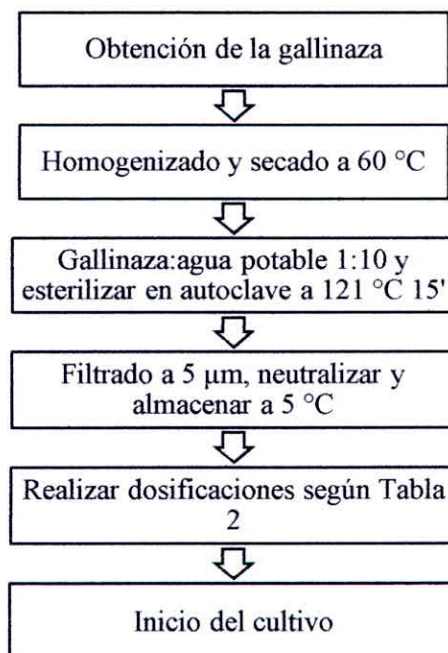
NUTRIENTES	CONCENTRACIÓN
Solución de macronutrientes	
NaNO ₃	75,00 mg
PO ₄ H ₂ Na.H ₂ O	5,00 mg
Solución de metales traza	
Na ₂ EDTA	4,36 mg
Cl ₃ Fe.6H ₂ O	3,15 mg
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0,01 mg
SO ₄ Zn.7H ₂ O	0,022 mg
Cl ₂ Co.6H ₂ O	0,01 mg
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0,18 mg
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	0,006 mg
Solución de vitaminas	
Cianocobalamina (B12)	0,50 mg
Tiamina. HCl (B1)	0,10 mg
Biotina (Vit. H)	0,50 mg

Fuente: Guillard (1975).

2.6. Preparación del medio de cultivo con extracto acuoso de gallinaza (EGAL)

Las excretas secas de gallina (gallinaza) se colectaron de la granja avícola “Cañita Brava” de la ciudad de Chimbote y se trasladó en un balde plástico de 4 L con tapa a temperatura ambiente, al laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Universidad Nacional del Santa.

En el laboratorio las excretas fueron secadas en estufa a 60° C por 24 h seguidamente se pesó 100 g del producto obtenido y se colocó en un matraz y se aforó a 1000 mL con agua destilada manteniendo una concentración de 10 % (p/v). Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min (15 psi) y se dejó enfriar para retirar el envase del autoclave. Dicha solución se filtró con una malla de nylal de 5 µm y se colocó en un frasco de color ámbar para protegerlo de la luz y luego se pasó a refrigerarla hasta su utilización. Las dosificaciones se realizaron según la tabla 1, utilizando agua de mar previamente filtrada con una malla Nylal de 5 µm. El pH del stock de nutrientes EGAL fue ajustado a 7 utilizando hidróxido de sodio (10 %) o ácido clorhídrico (1 %) para subir o bajar el pH, respectivamente (fig. 1).



Fuente: Ilustración propia

Fig. 1. Flujo de la preparación de EGAL utilizado en el cultivo de *Isochrysis* sp.

2.7. Acondicionamiento de las unidades experimentales

Se utilizaron 12 botellas plásticas de 3000 mL de volumen total y con 2000 mL de volumen efectivo del cultivo microalgal, iniciándose los cultivos con un promedio de $0,63 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, las mismas que fueron distribuidas al azar sobre un estante metálico y en condiciones de aire libre en una zona adyacente al laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares en la E.A.P. Biología en Acuicultura, las mismas que tienen incidencia de la luz solar directa.

En el experimento se empleó el diseño estímulo creciente (Steel & Torrie, 1988), con tres tratamientos y un grupo control (Guillard f/2), con tres repeticiones cada uno (tabla 2), siendo los siguientes:

Tabla 2. Tratamientos utilizados en los cultivos de la microalga *Isochrysis* sp. con extracto acuoso de gallinaza y grupo control (Guillard f/2) por triplicado.

Tratamientos	Especificaciones
Control	Cultivo de <i>Isochrysis</i> sp. con medio Guillard f/2 (Control) al aire libre.
T1	Cultivo de <i>Isochrysis</i> sp. utilizando 2,5 mL L ⁻¹ (250 mg de gallinaza) de extracto acuoso de gallinaza al aire libre.
T2	Cultivo de <i>Isochrysis</i> sp. utilizando 5,0 mL L ⁻¹ (500 mg de gallinaza) de extracto acuoso de gallinaza al aire libre.
T3	Cultivo <i>Isochrysis</i> sp. utilizando 10,0 mL L ⁻¹ (1000 mg de gallinaza) de extracto acuoso de gallinaza al aire libre.

Las concentraciones del stock EGAL que se utilizaron en los tratamientos fueron determinadas de acuerdo a ensayos previos de cultivo en laboratorio; y se analizó en el laboratorio de Biología y Ecología, el contenido de los principales nutrientes según métodos propuestos por APHA (2005) para nitratos (N-NO₃), nitrógeno amoniacal (N-NH₃), fosfatos (P-PO₄) y hierro (Fe), utilizando reactivos preparados en viales para espectrofotometría marca Vacu-vials® (tabla 3). En la tabla 4 se compara los rangos teóricos de N como sulfato y amonio, el fosfato y el Fe en el control y los tratamientos.

Tabla 3. Composición química del extracto acuoso de gallinaza.

Componentes	Extracto acuoso de gallinaza (EGAL)
Nitrato (mgN ml ⁻¹)	8,73
NH ₃ (mgN ml ⁻¹)	0,13
Fosfato (mgP ml ⁻¹)	1,14
Hierro (mgFe ml ⁻¹)	0,40

Tabla 4. Concentración calculada de los nutrientes dosificados de EGAL y grupo control (Guillard f/2) en los cultivos de *Isochrysis* sp.

PARÁMETROS	Control (Guillard f/2)	EGAL		
		T1 (2,5 mL L ⁻¹)	T2 (5,0 mL L ⁻¹)	T3 (10,0 mL L ⁻¹)
Nitrato (mgN. ml ⁻¹)	12,36	21,83	43,65	87,30
NH ₃ (mgN. ml ⁻¹)	-	0,33	0,65	1,30
Fosfato (mgP. ml ⁻¹)	1,29	2,85	5,70	11,40
Hierro (mgFe. ml ⁻¹)	0,72	1,00	2,00	4,00

Se realizó el registro diario de cada unidad experimental, el pH y la temperatura, haciendo uso de un pHmetro digital marca Hanna ($\pm 0,01$ unidades) y un termómetro digital marca Boeco ($\pm 0,1$ °C), respectivamente.

La aireación fue constante proporcionada por un Blower de 1/2 HP, impulsada por tubos de PVC de 1/2" y mangueras de 0,5 cm de diámetro y que proveen cada una un flujo de aire de aproximadamente 1000 mL min⁻¹ a cada unidad experimental. Este volumen de aireación fue controlado haciendo mediciones periódicas con un flujómetro Cole Parmer (± 10 mL min⁻¹).

La iluminación natural fue registrada diariamente con ayuda de un luxómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ lux); asimismo se determinó la temperatura del aire y las

horas luz (h) diaria según la información proporcionada en la página web del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI).

2.8. Determinación del crecimiento poblacional de *Isochrysis* sp.

El crecimiento poblacional en los cultivos de *Isochrysis* sp. se determinó por conteos diarios del número de células con alícuotas por duplicado, durante 7 días. Cada muestra de la suspensión microalgal se colocó en una cámara Neubauer con pipeta Pasteur y se observó en un microscopio binocular marca Olympus.

Las curvas de crecimiento poblacional se graficaron con los valores de la densidad poblacional durante el experimento. Asimismo, se determinaron las tasas de crecimiento poblacional por día (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) al sexto día de cultivo, según Guillard (1975) mediante las fórmulas:

$$\mu \text{ (día}^{-1}\text{)} = \frac{\ln\left(\frac{N_f}{N_0}\right)}{T_f - T_0} \qquad TD \text{ (día)} = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde N_0 y N_f equivale al número de células por mL, en los días de cultivo T_0 y T_f , respectivamente.

2.9. Determinación de la biomasa en los cultivos de *Isochrysis* sp.

Para determinar la biomasa por diferencia de peso, se pesó el papel filtro Whatman N° 42 de diámetro 5,5 cm, se colocó en un embudo Büchner con matraz Kitasato y con ayuda de una bomba de vacío se filtró 50 mL de suspensión microalgal por cada unidad experimental, seguido se llevó a la estufa a 60 °C por 8 h para su secado. Luego, se calentó hasta una temperatura de 105 °C por 10 min para eliminar el exceso de agua. Se dejó enfriar en un secador de campana por 1 h y se pesó hasta conseguir un peso constante, los datos obtenidos se reemplazan en la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa (mg L}^{-1}\text{)} = ((P2 - P1) / 50) \times 1000$$

Donde:

P1: Peso inicial (papel) (mg).

P2: Peso final (papel + muestra) (mg).

2.10. Determinación de las proteínas de *Isochrysis sp.*

Al sexto día de cultivo de *Isochrysis sp.*, se obtuvieron las muestras los tratamientos para el análisis de proteínas, y se realizó mediante el método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951) modificado.

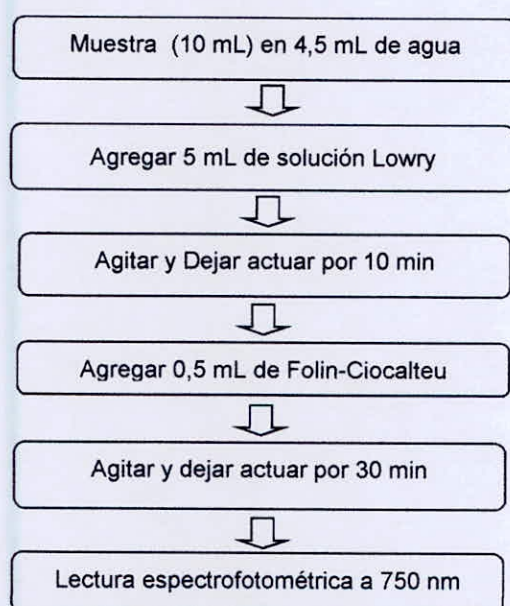


Fig. 2. Flujograma del método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951) empleado en la presente investigación.

De cada unidad experimental se obtuvo 10 mL del cultivo microalgal y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, seguido se eliminó el sobrenadante y se agregó 4,5 mL de agua destilada, y se agitó vigorosamente para resuspender todo el contenido. Seguido a cada muestra se agregó 5 mL de solución de Lowry y se agitó enérgicamente dejándose a temperatura ambiente por 10 min. Luego a cada tubo de ensayo se agregó 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y se dejó por 30 min. Por último, se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a una absorbancia de 750 nm de longitud de onda. Para determinar la

concentración se determinó una curva de calibración utilizando cinco concentraciones de seroalbúmina bovina. La ecuación general para determinar las proteínas resultó en la siguiente:

$$\text{Proteínas (\%)} = \frac{\left(\left(\frac{\text{Absorbancia}}{3,1765} \right) \times 10 \right)}{M} \times 100$$

Donde: M es el Peso seco (mg) en 10 mL de cultivo.

Para determinar el contenido de proteínas en biomasa por litro de cultivo (BP) de cada tratamiento, los datos obtenidos se reemplazan en la siguiente fórmula:

$$BP \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{P \times B}{100}$$

Donde:

P: Porcentaje de proteínas (%), y B: Biomasa seca total por L (mg).

2.11. Análisis estadístico de los datos

Los datos de crecimiento poblacional y contenido de proteínas de todos los tratamientos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente la prueba de Tukey para establecer diferencias entre sus promedios. En ambos casos se aplicó un nivel de significancia de 0,05. El tratamiento estadístico fue desarrollado utilizando los programas, Microsoft Excel 2010 y SPSS 19.0 para Microsoft Windows 7.

III. RESULTADOS

3.1. Registro de parámetros ambientales del cultivo de *Isochrysis* sp.

3.1.1. Temperatura

Los promedios de la temperatura en los cultivos de *Isochrysis* sp. se muestra en la fig. 3.

Estos valores estuvieron entre los 23,3 y 32,3 °C, con un promedio de 26,5 °C para todos los tratamientos y durante toda la experiencia. Los mismos fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$) tomando en cuenta todos los tratamientos por cada día de cultivo. Además, la temperatura del aire durante el experimento osciló entre los 13,4 y 26,2 °C, con un promedio de 19,0 °C; mientras que el tiempo de exposición diaria a la luz solar varió entre 11,85 y 11,92 (h) con una media de 11,88 (h).

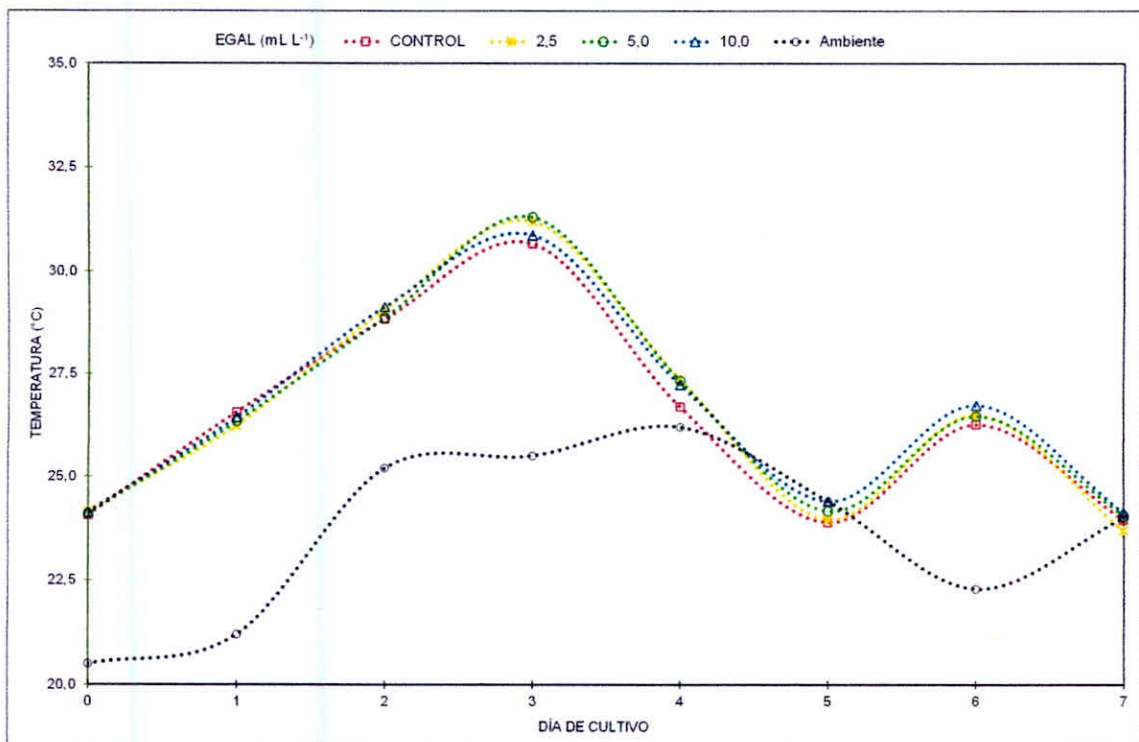


Fig. 3. Valores de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de *Isochrysis* sp. con EGAL y grupo control (Guillard f/2).

3.1.2. pH

Los valores del pH en los cultivos de *Isochrysis* sp. se muestran en la fig. 4. Estos se encontraron entre las 7,64 unidades al inicio y 9,80 unidades al sexto día, con un promedio global para todo el experimento de 9,05 unidades.

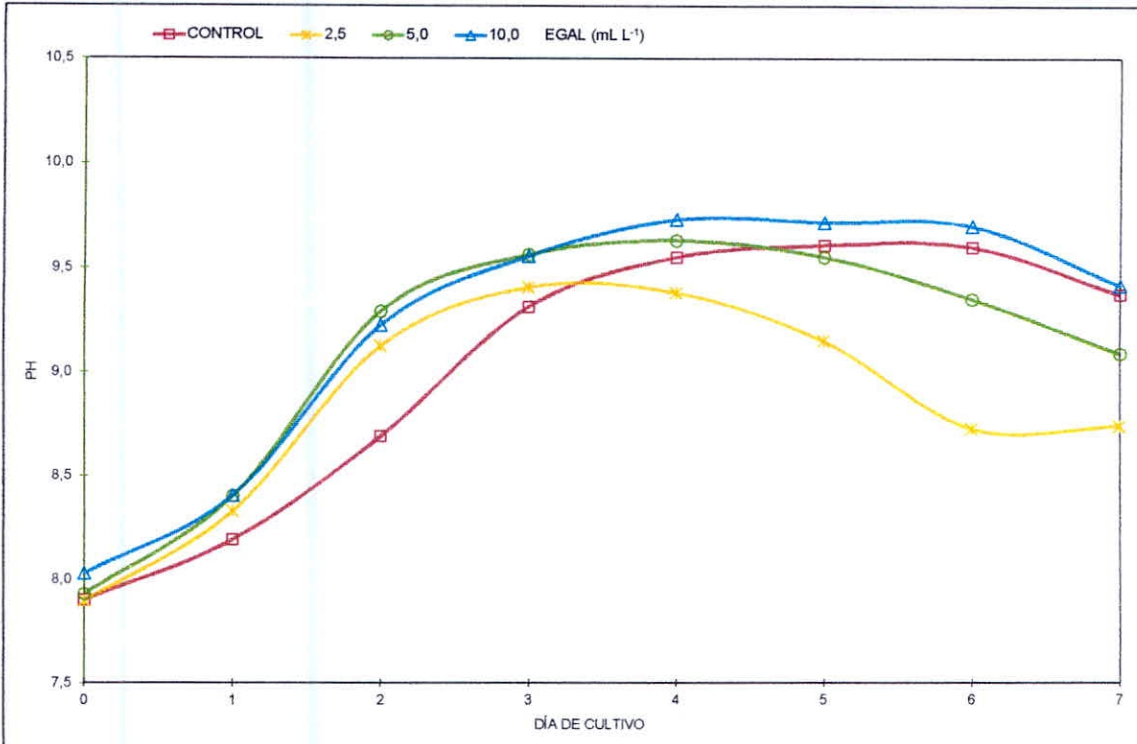


Fig. 4. Valores promedio del pH en los cultivos de *Isochrysis* sp. con EGAL y grupo control (Guillard f/2).

Al primer y tercer día de cultivo, los valores de pH fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$) entre los tratamientos. Posteriormente al cuarto día de cultivo, los tratamientos dosificados con 5,0 y 10 mL L⁻¹ de EGAL, y grupo control tuvieron valores de 9,63; 9,73 y 9,55 unidades, respectivamente.

Al quinto y sexto día de cultivo, se presentaron diversas variaciones de pH, siendo al sexto día los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) registrados en los tratamientos con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL y grupo control, con 9,34; 9,69 y 9,59 unidades, respectivamente.

3.2. Crecimiento poblacional en los cultivos de *Isochrysis* sp.

3.2.1. Curvas de crecimiento poblacional

En la tabla 5 y fig. 5, se observan las densidades poblacionales en los cultivos de *Isochrysis* sp. con EGAL y grupo control (Guillard f/2).

Tabla 5. Densidad Poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de *Isochrysis* sp. en los cultivos con EGAL y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	EGAL (mL L ⁻¹)			
	CONTROL	2,5	5,0	10,0
0	0,63 \pm 0,00a	0,63 \pm 0,00a	0,63 \pm 0,00a	0,63 \pm 0,00a
1	0,75 \pm 0,13c	0,96 \pm 0,23a	1,07 \pm 0,22ab	0,94 \pm 0,23b
2	1,36 \pm 0,15c	2,08 \pm 0,10a	2,06 \pm 0,19ab	1,71 \pm 0,07b
3	2,34 \pm 0,28b	3,88 \pm 0,51a	4,59 \pm 0,35a	4,13 \pm 0,25a
4	4,19 \pm 0,32c	5,18 \pm 0,58b	7,05 \pm 0,33a	6,05 \pm 0,48ab
5	5,04 \pm 0,69b	6,09 \pm 0,94ab	8,23 \pm 0,73a	7,11 \pm 1,16ab
6	7,20 \pm 0,41bc	7,07 \pm 0,74c	9,29 \pm 1,01a	8,96 \pm 0,39ab
7	8,54 \pm 0,37ab	7,24 \pm 0,71b	9,21 \pm 0,54ab	9,44 \pm 1,17a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

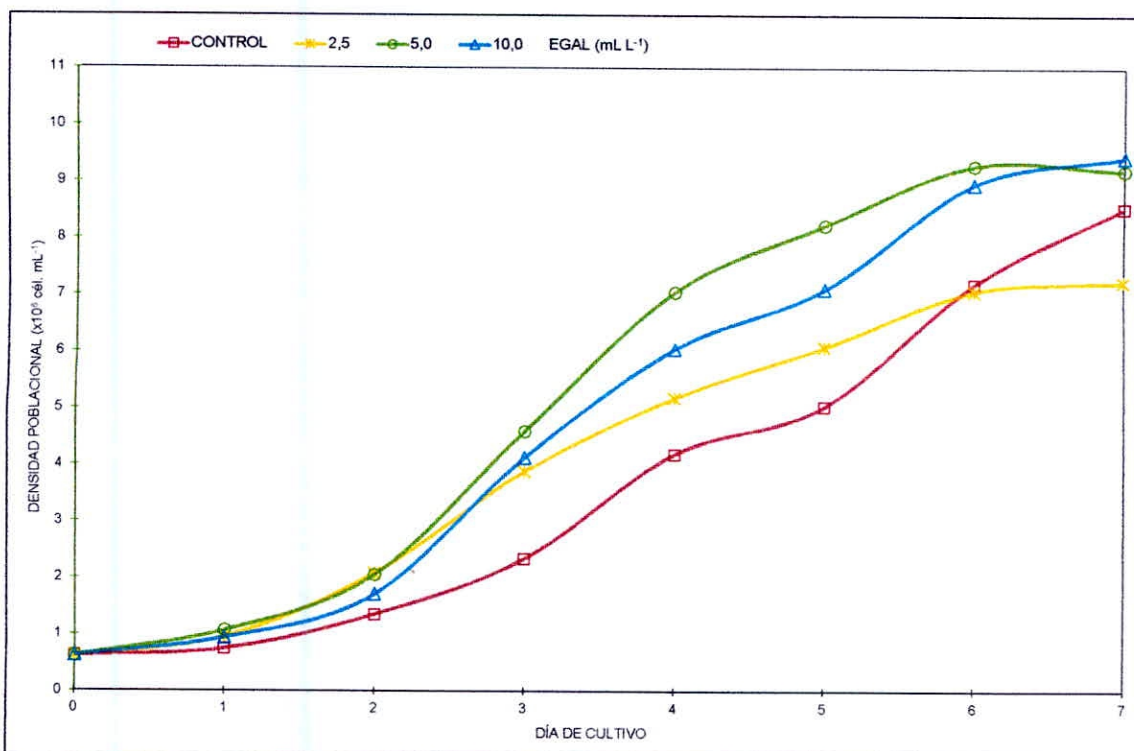


Fig. 5. Densidad poblacional promedio de *Isochrysis* sp. en los cultivos con EGAL y grupo control (Guillard f/2).



Fig. 6. Unidades experimentales de *Isochrysis* sp. cultivadas con medio EGAL y grupo control (Guillard f/2), en distribución completamente al azar.

El crecimiento poblacional registrado en los cultivos de *Isochrysis* sp. se iniciaron con promedios significativamente similares ($p > 0,05$) de $0,63 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, los mismos se incrementaron en los siguientes días de cultivo (tabla 5; fig. 5-6).

Al día 1 y 2 de cultivo, las mayores densidades ($p < 0,05$) se encontraron en los tratamientos con 2,5 y 5,0 mL L⁻¹ de EGAL, y el menor promedio ($p < 0,05$) se presentó en el grupo control (Guillard f/2). En el día 3 de

cultivo, se observa que los mayores promedios se encuentran en los cultivados con 2,5; 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL, con 3,88; 4,59 y 4,13 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente. Para el quinto día de cultivo (tabla 5 y fig. 5-6), las mayores densidades poblacionales de *Isochrysis* sp. (p<0,05) se encontraron en los tratamientos con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL, con 8,23 y 7,11 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente; mientras que el grupo control presentó el menor valor significativo (p<0,05) con 5,04 x10⁶ cél. mL⁻¹.

Para el día 6 de cultivo de *Isochrysis* sp. (tabla 5; fig. 5 y 6), las densidades poblacionales, en los tratamientos, continuaron en aumento sostenido, los mayores promedios significativos se encontraron en los dosificados con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL, con 9,29 y 8,96 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente; mientras que los menores valores estuvieron en el cultivo con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL y el grupo control (Guillard f/2) con 7,07 y 7,20 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente.

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional

En la tabla 6, fig. 7, se observan la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) en los cultivos de *Isochrysis* sp., cultivadas con EGAL y grupo control (Guillard f/2), los mismos que se determinaron al sexto día de cultivo.

Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *Isochrysis* sp., en los cultivos con EGAL y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETRO	EGAL (mL L ⁻¹)			
	CONTROL	2,5	5,0	10,0
μ (día ⁻¹)	0,406 ±0,009b	0,402 ±0,017b	0,448 ±0,018a	0,442 ±0,007a
TD (día)	1,709 ±0,040b	1,725 ±0,073b	1,549 ±0,061a	1,567 ±0,025a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (p<0,05).

Al sexto día de cultivo de *Isochrysis* sp., los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) de la tasa de crecimiento (μ) (tabla 6, fig. 7) se encontraron en los tratamientos dosificados con 5,0 y 10 mL L⁻¹ de EGAL con 0,448 y 0,442 día⁻¹; y los menores promedios significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron en el tratamiento con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL y el grupo control (Guillard f/2) con 0,402 y 0,406 día⁻¹, respectivamente.

El tiempo de duplicación diaria (TD) al sexto día de cultivo de *Isochrysis* sp. (tabla 6; fig. 7) presentaron los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) en el tratamiento dosificado con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL y el grupo control (Guillard f/2), con 1,725 y 1,709 día, respectivamente; y los menores promedios fueron en los dosificados 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL, con 1,549 y 1,567 día, respectivamente.

3.3. Contenido de proteínas en *Isochrysis* sp.

Las proteínas en porcentaje (%) y biomasa (mg L⁻¹) de *Isochrysis* sp., se determinaron al sexto día de cultivo, en los tratamientos con medio EGAL y grupo control (Guillard f/2), los que se muestran en la tabla 7, fig. 8 y 9.

Tabla 7. Contenido de proteínas en porcentaje (%) y biomasa (mg L⁻¹) al sexto día de cultivo en *Isochrysis* sp. dosificados con EGAL y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETROS	EGAL (mL L ⁻¹)			
	CONTROL	2,5	5,0	10,0
Biomasa (mg L ⁻¹)	302,33 ±17,21b	304,33 ±32,32b	409,00 ±44,19a	394,33 ±17,01a
Proteínas (%)	21,28 ±0,49b	21,96 ±0,73b	28,18 ±0,58a	28,31 ±1,02a
Proteínas (mg L ⁻¹)	64,33 ±4,11b	66,96 ±9,01b	115,44 ±14,80a	111,65 ±7,17a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

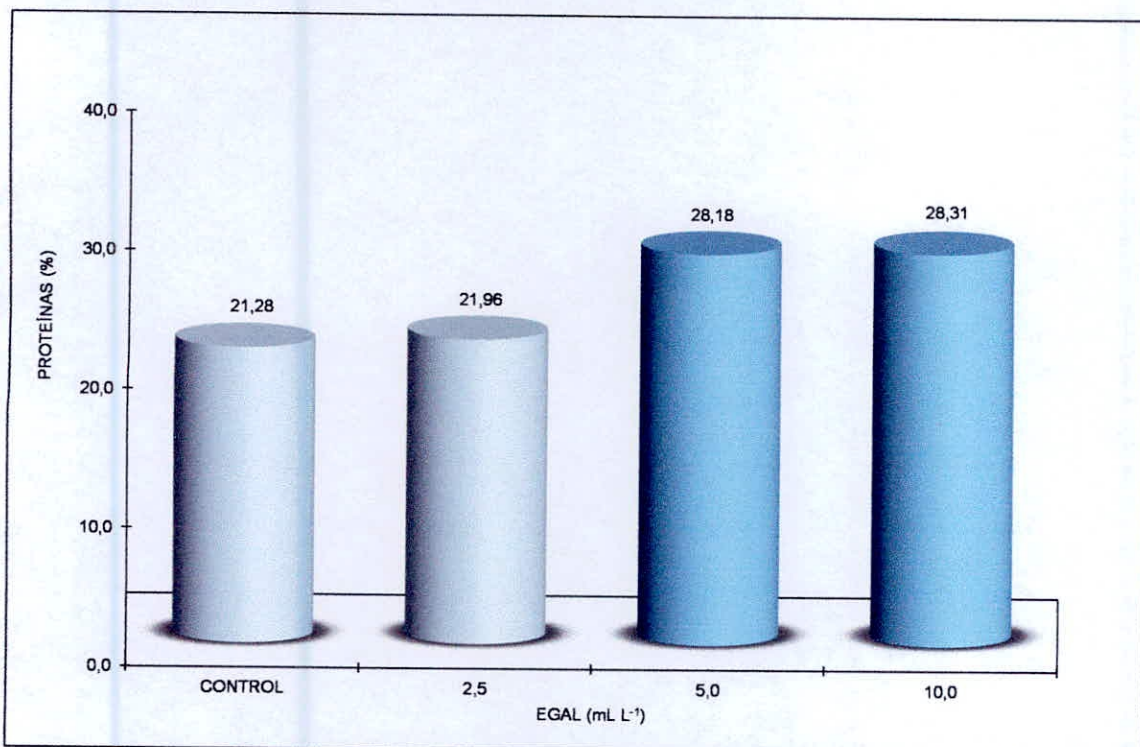


Fig. 7. Porcentaje de proteínas de *Isochrysis* sp. en los tratamientos dosificados con EGAL y grupo control (Guillard f/2).

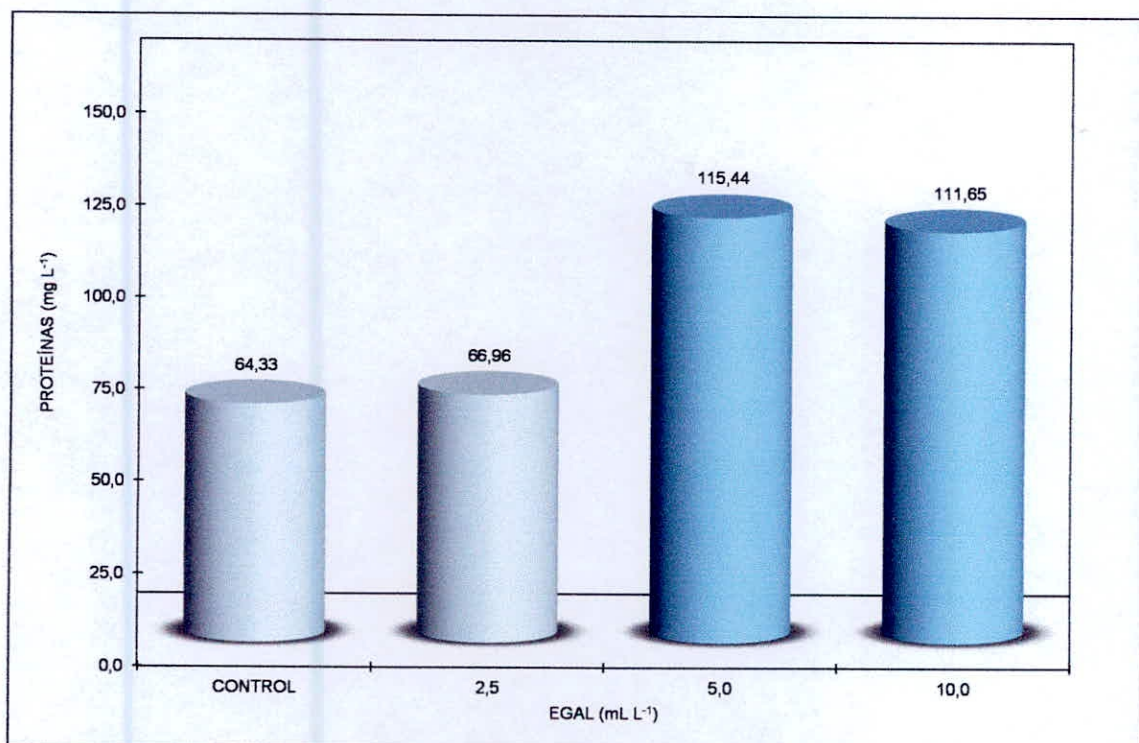


Fig. 8. Biomasa de proteínas de *Isochrysis* sp. en los tratamientos dosificados con EGAL y grupo control (Guillard f/2).

El contenido en porcentaje de proteínas en peso seco (tabla 7 y fig. 8) al sexto día de cultivo, presentaron los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) en los tratamientos dosificados con 5,0 y 10 mL L⁻¹ de EGAL, con 28,18 y 28,31 %, respectivamente; y los menores promedios significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron en el tratamiento dosificado con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL y grupo control (Guillard f/2), con 21,96 y 21,28 %, respectivamente.

Además, el contenido en biomasa en peso seco de *Isochrysis* sp. (tabla 7 y fig. 9) al sexto día de cultivo, presentaron los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) en los tratamientos dosificados con 5,0 y 10 mL L⁻¹ de EGAL, con 115,44 y 111,65 mg L⁻¹, respectivamente; y los menores promedios significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron en el tratamiento dosificado con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL y grupo control (Guillard f/2), con 66,96 y 64,33 mg L⁻¹, respectivamente.

IV. DISCUSIÓN

En general, el rango de temperatura del cultivo de microalgas varía según la especie, así algunas especies no soportarían temperaturas superiores a 25 °C mientras que muchas otras son resistentes teniendo buen crecimiento hasta los 36 °C (Abalde *et al.*, 1995). Barclay (1985), menciona para el caso de *Isochrysis* sp., presenta una temperatura de cultivo óptimo de 28 °C y un rango de salinidad de 5 a 60 ‰; también, Tornabene *et al.* (1986), encontraron un buen crecimiento para *Isochrysis* sp. en un rango de 31 y 33 °C, temperatura superior a lo requerido por *Isochrysis galbana* la cual presenta un óptimo entre los 25 y 27 °C. En el presente experimento, los cultivos de *Isochrysis* sp., el rango fue amplio desde los 23,3 °C hasta los 32,3 °C, con una media de 26,5 °C para todos los tratamientos, dichos valores se encuentran en lo referido para las microalgas por Abalde *et al.* (1995) y específicamente para *Isochrysis* sp. por Barclay (1985) y Tornabene *et al.* (1986), por lo que este factor no tendría efectos que distorsionen la obtención de los resultados.

Otro factor ambiental importante que se tuvo en cuenta para el experimento, fue la variación del pH, que según Richmond & Becker (1986), en general los cultivos de microalgas requieren un rango entre 7 y 8 unidades, pero pueden existir variaciones sin afectar su crecimiento, sobre todo si este va en aumento, dado que son más sensibles a la disminución brusca, aunque también depende de la especie (Richmond & Becker, 1986), y Garibay *et al.* (2009), menciona que para los cultivos las condiciones adecuadas de pH debe estar en el rango de 6,5 y 9,5 unidades; y de acuerdo a Kaplan *et al.* (1986) para *I. galbana* entre 5,0 y 9,0 unidades de pH. Asimismo, Piña *et al.* (2007), encontró en los cultivos de *Isochrysis* sp. valores de pH entre 7,62 y 9,43 unidades. En el cultivo de *Isochrysis* sp. con medio EGAL y Guillard f/2 del presente experimento, se encontró que los valores del pH variaron desde los 7,64 hasta los 9,80 unidades, con un promedio de 9,05 unidades, estando cercano a los mencionados por Kaplan *et al.* (1986), Piña *et al.* (2007) y Garibay *et al.* (2009), por lo que este parámetro no se constituiría en un factor limitante para los cultivos microalgales.

La densidad poblacional, tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) permiten evaluar el crecimiento poblacional, sobre todo si los nutrientes en el medio de cultivo son asimilados y transformados en biomasa, habiéndose obtenido resultados exitosos en el crecimiento de microalgas utilizando medios orgánicos (Basurto, 1994; Merino *et al.*, 2003; Ipanaqué & Paredes, 2009; Cervera, 2011); además, las microalgas asimilan diversas fuentes de nitrógeno como nitrógeno amoniacal, nitrato, urea, así como extracto de levadura, peptona, aminoácidos y purinas (Oh-Hama & Miyachi, 1992; Merino, 1999; Chen & Chen, 2006; Wilhelm *et al.*, 2006; Piña *et al.*, 2007; Ganuza *et al.*, 2008). El medio EGAL, bajo las diferentes concentraciones (2,5; 5,0 y 10,0 mL L⁻¹) mientras cantidades de nitrato, nitrógeno amoniacal, fosfatos y hierro superiores a los contenidos en el medio Guillard f/2 (tabla 4), que sustentan los cultivos de *Isochrysis* sp. del presente trabajo experimental.

Merino *et al.* (2003), utilizando medios no convencionales cultivaron *Tetraselmis suecica* con ensilado de pescado, obteniendo la mejor densidad poblacional ($5,0 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) con 0,5 g L⁻¹ del ensilado; para esta misma especie, Ipanaqué & Paredes (2009), obtuvieron densidades de 6,38 y 6,88 $\times 10^6$ cél. mL⁻¹, con 60 y 80 mL L⁻¹ de extracto de ensilado de "concha de abanico", respectivamente, y siendo mayores a los obtenidos con medio Guillard f/2 ($3,67 \times 10^6$ cél. mL⁻¹). Asimismo, trabajos realizados por Cervera (2011), con excretas de cerdo para el cultivo de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. reportaron un incremento de 2,31 g L⁻¹ y 1,99 g L⁻¹ a 15 días de incubación, y Basurto (1994), utilizando bioabono líquido de borrego en el cultivo de *Chlorella*, reportan poblaciones de $14,9 \times 10^6$ cél. mL⁻¹. Esto indica que las microalgas asimilan los medios orgánicos satisfactoriamente permitiendo crecimientos importantes; resultados que van de acuerdo a lo obtenido en la presente investigación, en donde las mejores densidades de *Isochrysis* sp. al sexto día de cultivo fueron dosificando con 5,0 mL L⁻¹ ($9,29 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) y 10,0 mL L⁻¹ ($8,96 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) de EGAL; siendo mayores a las encontradas dosificando con 2,5 mL L⁻¹ ($7,07 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) de EGAL y el grupo control (Guillard f/2) ($7,20 \times 10^6$ cél. mL⁻¹), demostrando la capacidad de esta microalga para asimilar los nutrientes presentes en el extracto de gallinaza.

Entre los trabajos realizados con medios de cultivo no convencionales como la gallinaza, Gómez *et al.* (2011), encontraron que la microalga *Chlorella* sp. presentó mayor densidad celular ($7,93 \times 10^6$ cél. mL⁻¹), al sexto día de cultivo, y Rosales *et al.* (2007), utilizando fracción soluble de gallinaza (FSG) degradada aeróbicamente como fuente para el cultivo de la microalga *Chroomonas* sp. encontraron que a 18 % la densidad celular fue $131,37 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ superior al resto de los tratamientos con 6 % y 36 % e incluyendo el control (medio inorgánico Algal®). Entonces, algunas microalgas tienen la capacidad de utilizar medios orgánicos, como *Isochrysis* sp., queda demostrado en el presente experimento que utilizando gallinaza como medio de cultivo se obtienen excelentes crecimientos poblacionales con 5 mL L⁻¹ ($9,29 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) y 10 mL L⁻¹ ($8,96 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) de EGAL al sexto día de cultivo.

Campa-Córdova *et al.* (2006), en estudios de crecimiento con el género *Isochrysis*, reportan para *I. galbana* cultivada con medio Guillard f/2 al sexto día, una densidad poblacional de 8×10^6 cél. mL⁻¹; Cordoba-Matson *et al.* (2013), con *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO; UTEX LB 2307) en medio Guillard f/2 y fotoperiodo 12:12 h, encontraron a los cinco días de cultivo una densidad poblacional de $7,75 \times 10^6$ cél. mL⁻¹; y Sánchez *et al.* (2013), con *Isochrysis galbana* una densidad de 7×10^6 cél. mL⁻¹. Siendo estos resultados cercanos al obtenido con 2,5 mL L⁻¹ ($7,07 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) de EGAL y el grupo control ($7,20 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) del presente experimento, pero inferiores a los obtenidos con 5,0 mL L⁻¹ ($9,29 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) y 10,0 mL L⁻¹ ($8,96 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) de EGAL, demostrando la buena asimilación del EGAL, y posiblemente con estas concentraciones, los nutrientes como el N (43,65 - 87,30 mg L⁻¹) y P (5,70 - 11,40 mg L⁻¹), parecen ser adecuados para obtener crecimientos superiores al medio convencional (Guillard f/2).

La tasa de crecimiento indica el potencial biológico de una especie, siendo mayores en los primeros días de cultivo microalgal en donde la disponibilidad de nutrientes no es una limitante (Griffiths *et al.*, 2012; Roleda *et al.*, 2013). Montoya & Acosta (2011), hallaron que la tasa de crecimiento de *Tetraselmis* sp. fue de $0,65$ día⁻¹ con el fertilizante comercial Crezilizer (N, P₂O₅, K₂O) enriquecidos con bicarbonato. Roleda *et al.* (2013), cultivando microalgas con

medio Guillard f/2, encontraron μ más altos a los cinco días en *Chromulina ochromonoides* y *Dunaliella tertiolecta* con 0,677 y 0,745 día⁻¹, respectivamente; mientras que *Thalassiosira pseudonana*, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* tuvieron un μ de 0,564; 0,481 y 0,451 día⁻¹, respectivamente; siendo la μ más baja en *Odontella aurita* con 0,131 día⁻¹. Tasas de crecimiento cercanos a los encontrados en los tratamientos dosificados con 5,0 mL L⁻¹ (0,448 día⁻¹) y 10 mL L⁻¹ (0,442 día⁻¹) de EGAL; que a su vez fueron mayores a los tratamiento con 2,5 mL L⁻¹ (0,402 día⁻¹) de EGAL y el grupo control (Guillard f/2) (0,406 día⁻¹), presentando una relación directa con las densidades poblacionales encontradas en el experimento.

Sheets *et al.* (2014), trabajando al aire libre con *Nannochloropsis salina*, evaluaron el efecto estacional de los cultivos en el crecimiento utilizando como nutrientes diferentes concentraciones (2,1; 4,2; 7; 10,5 y 14 % v/v) de efluentes de la digestión anaeróbica de aguas residuales urbanas (ARU) comparadas con el medio comercial Guillard f/2 (0,12; 0,21; 0,42; 0,62 y 0,84 % v/v). Bajo varias condiciones de luz exterior y temperatura (10-30 °C) la tasa de crecimiento de *N. salina* fue influenciado de manera notoria, así para periodos de exposición luminosa de 6, 12 y 24 h, la tasa de crecimiento (μ) presentó valores de 0,038; 0,093 y 0,151 día⁻¹, respectivamente, mientras que la temperatura entre los 10 y 25 °C, no tuvo influencia significativa en el crecimiento, concluyendo que *N. salina* puede ser cultivada en condiciones de aire libre pudiendo tolerar un amplio rango de temperaturas y utilizando fuentes de nutrientes residuales y orgánicas.

Las condiciones que demuestra *Isochrysis* sp. para asimilar el medio EGAL (5,0 - 10,0 mL L⁻¹) y a su vez estar expuesto a grandes rangos de temperatura (23,3 - 32,7 °C) durante el presente trabajo de investigación, hacen de este organismo, un candidato de gran potencial para cultivos en exteriores con medios orgánicos.

Fábregas *et al.* (1985), afirman que la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo incrementa el TD en *I. galbana*, dado que la velocidad en la cual se multiplican disminuye, y que depende también de un adecuado balance de

nutrientes como nitrógeno y fósforo, condición que puede darse desde el inicio de un cultivo, siendo importante un adecuado balance nutrientes o por lo menos cubrir las necesidades para sostener un cultivo microalgal; pero estas condiciones pueden ser modificadas para obtener mejores resultados que los medios de cultivo convencionales (Rosales *et al.*, 2007). Cordoba-Matson *et al.* (2013), con *I. aff. galbana* encontraron al quinto día de cultivo valores para μ y TD de 0,189 día⁻¹ y 3,70 día, respectivamente. En el presente trabajo, los menores TD estuvieron presentes en los dosificados con 5,0 mL L⁻¹ (1,549 día⁻¹) y 10,0 mL L⁻¹ (1,567 día⁻¹) de EGAL, en concordancia con los valores de la densidad poblacional y tasa de crecimiento del presente experimento, considerándose que los cultivos dosificados con 5,0 mL L⁻¹ de EGAL presentan mejores resultados, debido posiblemente al mejor balance de N y P.

El crecimiento se ve influenciado por otros factores tales como el fotoperiodo, así Sánchez *et al.* (2013), cultivando *I. galbana* para la producción de biodiesel con medio Guillard f/2 en sistemas outdoor durante siete días y con un fotoperiodo de 16:8 h, obtuvieron un tasas de crecimiento entre 0,22 a 0,36 día⁻¹, considerando que los valores de μ tienden a disminuir cuando la concentración de microalgas es alta debido al efecto de sombreado, efecto que ocurre entre las células al ensombrecer por un instante el paso de la luz; asimismo, afirman que los altos valores de μ se esperan en sistemas con bajas densidades microalgales cuando las condiciones de cultivo son ideales.

En cuanto al contenido de proteínas en *Isochrysis* sp., Borges *et al.* (2010), evaluaron el crecimiento y composición química de 10 especies, las mismas que fueron cultivadas en medio Conway por cuadruplicado en 2,4 L con fotoperiodo de 12:12 h y salinidad de 33,2 ups, encontrando los valores más altos de proteínas en las microalgas *Tetraselmis gracilis* (33,6 %), *Prorocentrum minimum* (30,9 %) e *I. galbana* (29,4 %). También, Cordoba-Matson *et al.* (2013), cultivaron microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO; UTEX LB 2307) en medio Guillard f/2, con luz artificial proveídos por LED (diodo emisor de luz) rojo y LED blanco, y un control con fluorescente de luz blanca, y fotoperiodo 12:12 h, encontraron que los valores de proteínas estuvieron entre 276 (27,6 %) y 322 (32,2 %) mg g⁻¹, siendo similares en todos los regímenes de

luz. En el presente experimento se encontraron los mayores contenidos significativos de proteínas al dosificar con 5,0 mL L⁻¹ (28,18 %) y 10,0 mL L⁻¹ (28,31 %) de EGAL, y los menores con 2,5 mL L⁻¹ (21,96 %) de EGAL, y el grupo control (Guillard f/2) (21,28 %). Los mayores valores encontrados con EGAL son similares a los obtenidos en condiciones de iluminación de 12:12 h por Borges *et al.* (2010) y Cordoba-Matson *et al.* (2013).

Piña *et al.* (2007), cultivaron con iluminación 24:0 h, cuatro especies de microalgas con medio Guillard f/2, Nutrilake y urea, encontraron para *Isochrysis* sp. concentraciones de proteínas de 20,77; 21,36 y 23,97 %, respectivamente, lo que indicaría que el contenido de proteínas depende de la naturaleza del medio utilizado; aunque los cambios en el contenido de proteínas también están influenciados por otros factores; así, Tornabene *et al.* (1986), indican que la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo microalgal pueden reducir el porcentaje celular de proteínas, así sucede en *I. galbana* llegando a 12,3 %, y aumentando los tenores de carbohidratos (46,6 %) y lípidos (30,0 %) en peso seco libre de cenizas, cuya productividad disminuye debido al agotamiento del nitrógeno conforme los cultivos llega a su fase final. En tal sentido, un medio equilibrado en su contenido y tipo de nutrientes deben sustentar los cultivos microalgales durante el tiempo requerido, y el agotamiento de nutrientes origina la disminución en el crecimiento poblacional, y ocasionalmente disminución del contenido de proteína. Así, en *Isochrysis* sp., se encontró que a mayores concentraciones de EGAL, el contenido celular de proteínas es mayor, dado una mayor disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno, por lo que la microalga no tendría ninguna limitación por ese componente por lo menos durante los primeros 6 días de cultivo.

Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002), trabajaron durante siete días con *I. aff. galbana* con un medio de cultivo de bajo costo (mezcla de sales agrícolas y nutrientes), alternativo al Guillard f/2, encontrando que el contenido de proteínas corresponde con el incremento en la densidad poblacional durante la fase exponencial que puede durar cinco días, indicando que los cambios en la fuente de nutrientes no afecta la tasa de crecimiento de *I. aff. galbana* durante los días de cultivo, confirmándose la hipótesis que el cultivo de *I. galbana* con

fertilizantes orgánicos pueden producir similar contenido de proteínas que el Guillard f/2 e inclusive superior, y que los cambios en la composición bioquímica están influenciada por la concentración del nutriente en el medio de cultivo. Esto es demostrado en los tratamientos dosificados con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL, por la obtención de mayores contenidos de proteínas, en relación a los dosificados con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL y con Guillard f/2. Así, los cultivos dosificados con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL, incrementaron en 1,32 y 1,33 veces el contenido de proteínas respecto al grupo control; además, Rosales *et al.* (2007), en *Chroomonas* sp. utilizando 18 % de FSG, demostró que las proteínas pueden incrementar hasta 2,5 veces con respecto al control.

Por otro lado, Sánchez *et al.* (2000), cultivando *I. galbana* con diferentes contenidos de nitrógeno en forma de nitrato, en los medio Guillard f/2 (12,353 mg-N L⁻¹), Ukeles (28,000 mg-N L⁻¹), Ben-Amotz (70,000 mg-N L⁻¹), S-88 (13,848 mg-N L⁻¹) y Algal-1 (39,375 mg-N L⁻¹), hallaron contenidos de proteínas de 20,6; 25,3; 37,0; 27,4 y 30,3 %, respectivamente; evidenciando que los valores más altos del porcentaje de proteínas en *I. galbana*, está relacionada con las mayores concentraciones de N en el medio de cultivo, pero que no necesariamente guardaría relación con el crecimiento microalgal, dado que para los mismos medios encontraron valores de μ de 0,396; 0,442; 0,377; 0,467 y 0,490 día⁻¹, respectivamente. En nuestros cultivos con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de EGAL, se presentan los mayores contenidos de proteínas respecto a los dosificados con 2,5 mL L⁻¹ de EGAL y el grupo control (Guillard f/2), dado al mayor contenido de N, considerando que el aumento en N incrementa el contenido de proteínas en *Isochrysis* sp., aunque debe existir una concentración adecuada de N en el medio que permita un óptimo crecimiento poblacional y contenido de proteínas.

V. CONCLUSIONES

- Los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) de las densidades poblacionales de *Isochrysis* sp. al sexto día de cultivo se encontraron dosificando con $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ y 10 mL L^{-1} de EGAL con $9,29 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$ y $8,96 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$, respectivamente; mientras el menor promedio ($p < 0,05$) se encontró con $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ de EGAL con $7,07 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$.
- Los mayores promedios ($p < 0,05$) de la tasa de crecimiento (μ) de *Isochrysis* sp. al sexto día de cultivo se encontraron con $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ y 10 mL L^{-1} de EGAL con $0,448 \text{ día}^{-1}$ y $0,442 \text{ día}^{-1}$, respectivamente; mientras fue menor ($p < 0,05$) con $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ de EGAL con $0,402 \text{ día}^{-1}$.
- El mayor promedio ($p < 0,05$) del tiempo de duplicación (TD) al sexto día de cultivo de *Isochrysis* sp. se encontró con $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ de EGAL con $1,725 \text{ día}$; mientras fueron menores ($p < 0,05$) dosificando con $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ y $10,0 \text{ mL L}^{-1}$ de EGAL con $1,549 \text{ día}$ y $1,567 \text{ día}$, respectivamente.
- Los mayores promedios ($p < 0,05$) del porcentaje de proteínas de *Isochrysis* sp. al sexto día de cultivo se encontraron dosificando con $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ y $10,0 \text{ mL L}^{-1}$ de EGAL con $28,18 \%$ y $28,31 \%$, respectivamente; mientras fue menor ($p < 0,05$) dosificando con $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ de EGAL con $21,96 \%$.
- Los mayores promedios ($p < 0,05$) de biomasa de proteínas en peso seco de *Isochrysis* sp. al sexto día de cultivo se encontraron con $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ y $10,0 \text{ mL L}^{-1}$ de EGAL con $115,44 \text{ mg L}^{-1}$ y $111,65 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente; mientras fue menor ($p < 0,05$) con $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ de EGAL con $66,96 \text{ mg L}^{-1}$.

VI. RECOMENDACIONES

- Determinar el crecimiento poblacional y composición bioquímica de *Isochrysis* sp. utilizando diferentes concentraciones de EGAL en cultivos masivos en laboratorio y al aire libre para efectuar comparaciones.
- Evaluar el efecto del régimen de dosificaciones de EGAL en el cultivo de *Isochrysis* sp. en laboratorio, para establecer la mejor dosificación que permite un mayor crecimiento poblacional de *Isochrysis* sp.
- Realizar estudios del perfil de aminoácidos, ácidos grasos y pigmentos de *Isochrysis* sp. cultivado con diferentes concentraciones de EGAL, para establecer la calidad bioquímica de la biomasa obtenida.
- Efectuar un análisis costo/beneficio de la producción de biomasa de *Isochrysis* sp. utilizando diferentes concentraciones del extracto acuoso de gallinaza comparadas con el medio Guillard f/2 cultivadas al aire libre.



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J.; A. Cid; P. Fidalgo; E. Torres & C. Herrero. 1995. *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Monografía N° 26. Coruña: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña. La Coruña, España. 181p.
- APHA. 2005. *Métodos estándares para el análisis de agua potable y agua residuales*. Standard Methods for the examination of wastewater. 21 edit. American Public Health Association (APHA) - American Water Works Association (AWWA) - Water Environment Federation (WEF). 1082p.
- Barclay, W. 1985. SERI Microalgae Culture Collection. SERI (Solar Energy Research Institute).
- Basurto, E. 1994. *Bioabono líquido como medio de cultivo para microalgas*. Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México. 31p.
- Batista, A.; L. Gouveia; N. Bandarra; J. Franco & A. Raymundo. 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*. 2:164-173.
- Benedetti, A.; S. Canali & F. Lianello. 1998. *La fertilizzazione organica dei suoli*. En *I Fertilizzanti Organici*. Paolo Sequi (Ed.). Italia. Edizioni L'Informatore Agrario. 1-12pp.
- Borges, V.; E. Barbarino & S. Lourenço. 2010. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*. 40(2):339-347.
- Campa-Córdova, A.; A. Luna-González; F. Ascencio; E. Cortés-Jacinto & C. Cáceres-Martínez. 2006. Effects of chloramphenicol, erythromycin, and

- furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture*. 260:145–150.
- Cervera, O. 2011. Tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal. Tesis para Optar el Grado de Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Facultad de Ciencias Experimentales. Almería, España. 32p.
- Chen, G. & F. Chen. 2006. Growing phototrophic cells without light. *Biotechnol. Lett.* 28:607-616.
- Cordoba-Matson, M.; B. Arredondo-Vega & L. Carreó-Palau. 2013. Evaluation of growth, cell size and biomass of *Isochrysis aff. galbana* (TISO) with two LED regimes. *All Res. J. Biol.* (4):7-15.
- Del Campo, J.; M. García & M. Guerrero. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Universidad de Sevilla. *Revista Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(1):1163-1174.
- Estrada, M. 2005. Manejo y procesamiento de la gallinaza - Handling and processing of hen waste as manure. *Revista Lasallista de Investigación*. 2(1):43-48.
- Fábregas, J.; C. Herrero & C. Abalde. 1985. Growth, chlorophyll α and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 50:1-11.
- Falinski, K. 2009. Effects of different aeration conditions on *Isochrysis galbana* (T-ISO) CCMP 1324 in a bench-scale photobioreactor. Tesis Master en Ciencias. Cornell University, USA. 69p.

- Ganuza, E.; A. Anderson & C. Ratledge. 2008. High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH auxostat fed-batch system. *Biotechnol. Lett.* 30:1559-1564.
- Garibay, A.; R. Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología.* 13(3):38-61.
- Gómez, O.; R. Rodríguez & S. Subero. 2011. Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*) en medios nutritivos no convencionales. *Revista Saber.* 23(1):84-90.
- González, A. 2000. Alternativas en el cultivo microalgas. Tesis Bachiller en Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador. 79p.
- Griffiths, M.; R. Van Hille & S. Harrison. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* 24:989-1001.
- Guillard, R. 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In*: W.L. Smith and M. H. Chanley, eds., Culture of marine invertebrate animals. Plenum Book Publ. Corp., New York, U.S.A. 29-60pp.
- Hernández, J. & A. Cruz. 1993. Boletín informativo sobre el uso de subproductos: Gallinaza. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 5p.
- Honty, G.; A. Raffaele & R. Pedace. 2010. Tecnología y biocombustibles de segunda generación: Una herramienta para la toma de decisiones. Reunión regional de expertos. Serie Buenas Prácticas en Cambio Climático. UNESCO. Vol. 2. Montevideo, Uruguay. 156p.
- Ipanaqué, J. & I. Paredes. 2009. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico", en el crecimiento

- poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.
- Iyovo, G.; G. Du & J. Chen. 2010. Poultry manure digestate enhancement of *Chlorella vulgaris* biomass under mixotrophic condition for biofuel production. *J. Microbial Biochem. Technol.* 2(2):51-57.
- Kaplan, D.; Z. Cohen & A. Abeliovich. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass.* 9:37-48.
- Knud-Hansen, C. 1998. Pond fertilization: ecological approach and practical applications. Pond dyn MICS/Aquaculture collaborative research support program. Oregon State University, Corvallis, Or. 125p.
- López, D.; J. Sánchez; J. García; F. García & E. Molina. 1996. Microalga marina y su empleo en acuicultura y en la obtención de ácidos grasos poliinsaturados. Informe final de Investigación. Universidad de Almería, España. 12p.
- Lowry, O.; N. Rosebrough.; A. Farr & R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Marchetti, J.; G. Bougaran; L. Le Dean; C. Mégrier; E. Lukomska; R. Kaas; E. Olivo; R. Baron; R. Robert & J. Cadoret. 2012. Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture.* 326-329(0):106-115.
- Merino, F. 1999. Efecto del ácido acético con sustrato limitante en el crecimiento de *Scenedesmus acutus* usando cultivos batch. Informe de Investigación. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú.

- Merino, F.; W. Capa & G. Alayo. 2003. Efecto combinado de la fuente nitrogenada y la concentración de silicato en el crecimiento y contenido de lípidos y carbohidratos de *Chaetoceros gracilis* en laboratorio. Informe de investigación. Universidad Nacional del Santa. Chimbote - Perú. 32p.
- Montoya, C. & A. Acosta. 2011. Producción de biomasa microalgal de *Tetraselmis* sp. en fotobiorreactor tipo columna de burbujeo. V Simposio Internacional de Biofábricas y I Congreso Internacional de Flujos Reactivos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de minas. Colombia. 157-158pp.
- Oh-Hama, T. & S. Miyachi. 1992. *Chlorella*. In: Borowitzka, M.A. & L.J. Borowitzka (Eds.), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. United Kingdom. 3-26pp.
- Piña, P.; M. Medina; M. Nieves; S. Leal; J. López-Elías & M. Guerrero. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Rev. Invest. Mar.* 28(3):225-236.
- Quevedo, C.; S. Morales & A. Acosta. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgas. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 15(1): 25-31.
- Rivero, C. & C. Carracedo. 1999. Efecto del uso de gallinaza sobre algunos parámetros de fertilidad química de dos suelos de pH contrastante. *Rev. Fac. Agron.* 25:83-93.
- Richmond, A. & E.W. Becker. 1986. *Technological aspects of mass cultivation - A general outline*. In: Richmond A (ed.), *CRC Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press Inc., Boca Raton. 245-264pp.

- Roleda, M.; S. Slocombe; R. Leakey; J. Day; E. Bell & M. Stanley. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*. 129:439-449.
- Romo, A. 2002. Manual para el cultivo de microalgas. Tesis Bachiller en Biología Marina. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 65p.
- Ronsón, J. 2010. Modificación de la transferencia de nutrientes en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-*Artemia* mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal. Tesis Doctoral en Biología Marina y Acuicultura. Universidad Santiago de Compostela. España. 546p.
- Rosales, N.; J. Bermúdez; R. Moronta & E. Morales. 2007. Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 9(1):41-48.
- Ruiz, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Master Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia, España. 102p.
- Salazar, E. 2012. Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Tesis para optar el Título de Ingeniero Industrial y de Sistemas de la Facultad de Ingeniería. Universidad de Piura, Perú. 145p.
- Sánchez, S.; M. Martínez & F. Espinola. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*. 6:13-18.

- Sánchez, Á.; R. Maceiras; Á. Cancela & A. Pérez. 2013. Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Applied Energy*. 101:192-197.
- Saucedo, P.; A. González-Jiménez; H. Acosta-Salmón; J. Mazón-Suástegui & J. Ronsón-Paulín. 2013. Nutritional value of microalgae-based diets for lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) juveniles reared at different temperatures. *Aquaculture*. 392–395:113-119.
- Sheets, J.; X. Ge; S. Park & Y. Li. 2014. Effect of outdoor conditions on *Nannochloropsis salina* cultivation in artificial seawater using nutrients from anaerobic digestion effluent. *Bioresource Technology*. 152:154-161.
- Singh, M.; D. Reynolds & K. Das. 2011. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 102(23):10841-10848.
- Silva, J.; V. Vásquez & F. Merino. 2011. Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. *Scientia Agropecuaria*. 2(2011):13-23.
- Steel, R. & J. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da. edic. Edit. McGraw-Hill. Traducción por Ricardo Martínez. México. 622p.
- Tornabene, T.; J. Beneman; D. Tillett; Y. Suen & J. Hubbard. 1986. Chemical profiles of microalgae with emphasis on lipids. Final Report to the Solar Energy Research Institute Under Subcontract X-K-4-04143-01. School of Applied Biology, Georgia Institute of Technology Atlanta, G.A. 103p.
- Ulloa, R. 2011. Inducción de productos bioactivos de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Tesis para optar al grado de Doctor, Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España. 220p.

- Valenzuela-Espinoza, E.; R. Millán-Núñez & F. Núñez-Cebrero. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll α content in *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*. 25:207-216.
- Van Bergeijk, S.A.; E. Salas-Leiton & J.P. Cañavate. 2010. Low and variable productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte *Isochrysis* aff. *galbana* (T-iso) in outdoor tubular photobioreactors. *Aquacultural Engineering*. 43:14–23.
- Vera, L. & A. Gonzalez. 2001. Cultivo da microalga *Tetraselmis chuii* prings em diferentes meios de cultura. *Ciências Agron. Fortaleza*. 24(1/2):91-100.
- Watanabe, A. 1960. List of algal strains in the collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo. *J. Gen. Appl. Micro*. 6:283-292.
- Wilhelm, C.; C. Büchel; J. Fisahn; R. Goss; T. Jakob; J. LaRoche; J. Lavaud; M. Lohr; U. Riebesell; K. Stehfest; K. Valentin & P. Kroth. 2006. The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist*. 157:91-124.
- Yago, T.; H. Arakawa; K. Fukui; B. Okubo; K. Akima; S. Takeichi; Y. Okumura & T. Morinaga. 2012. Effects of flashing light from light emitting diodes (LEDs) on growth of the microalga *Isochrysis galbana*. *African Journal of de Microbiology Research*. 6(30):5896-5899.