



Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum*

Efecto de tres fuentes de nutrientes en la producción de biomasa y pigmentos de la microalga dulce acuícola *Hyaloraphidium contortum*

Brito, D.J.¹, Caña, E.¹, Guevara, M.², Subero, J.¹ Colivet, J.¹.

¹Universidad de Oriente Núcleo Monagas, Escuela de Zootecnia, Departamento de Biología y Sanidad Animal. Av. Universidad, Maturín A.P.6201. Monagas, Venezuela.

²Universidad de Oriente Núcleo Sucre, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Cerro Colorado, Cumaná, Sucre, Venezuela.

ABSTRACT

Multifunctionality of microalgae is becoming increasingly important, hence science develops new techniques to maximize their potential by providing food, sustainable and affordable fuels and innovative environmental solutions. In this study, we analyzed the effect of different nutrient sources (Nitrofoska®, Quimifol® and Guillard) and sowing time on the kinetics of growth and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum*; besides of registering some physical and chemical variables in different growth mediums. Bioassays were performed in batch cultures by quadruplicate, continuously maintaining and controlling temperature, ventilation and lighting. Growth was determined by cell count and production of pigments by spectrophotometry. The largest population densities and productivities per volume of culture were obtained in F/2 Guillard ($9.7 \pm 0.2 \times 10^7$ cel mL⁻¹ and 7.6×10^8 cel/L/day) and Nitrofoska® ($8.7 \pm 0.5 \times 10^7$ cel mL⁻¹ and 5.7×10^8 cel/L/day). The highest average chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoid concentration was achieved with foliar fertilizer Nitrofoska®, on days 18 and 24 (8, 3.29 and 2.2 µg mL⁻¹, respectively), followed by the obtained by Guillard and Quimifol®. We conclude that this

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: April 16th 2015.

Accepted/Aceptado: July 16th 2015.

*Corresponding Author:

Brito, Diagnora. Universidad de Oriente Núcleo Monagas, Escuela de Zootecnia, Departamento de Biología y Sanidad Animal. Av. Universidad, Maturín A.P.6201. Monagas, Venezuela. Phone: 0414-280 8419. E-mail: diagnorajb@yahoo.es

RESUMEN

La multifuncionalidad de las microalgas es cada vez más importante, por lo cual la ciencia desarrolla nuevas técnicas para aprovechar al máximo su potencial, proporcionando alimento, combustibles sostenibles y accesibles, así como soluciones ecológicas novedosas. En el presente estudio, se analizó el efecto de diferentes fuentes de nutrientes (Nitrofoska®, Quimifol® y Guillard) y el tiempo de siembra sobre la cinética de crecimiento y producción de pigmentos de la microalga de agua dulce *Hyaloraphidium contortum*; además de registrarse algunas variables físicas y químicas en los diferentes medios de crecimiento. Los bioensayos se realizaron en cultivos discontinuos por cuadruplicado, manteniendo controlados y de forma continua la temperatura, aireación e iluminación. El crecimiento se determinó por recuento celular y la producción de pigmentos por espectrofotometría. Las mayores densidades poblacionales y productividades por volumen de cultivo se obtuvieron en F/2 Guillard ($9.7 \pm 0.2 \times 10^7$ cel mL⁻¹ y 7.6×10^8 cel/L/día) y Nitrofoska® ($8.7 \pm 0.5 \times 10^7$ cel mL⁻¹ y 5.7×10^8 cel/L/día). La mayor concentración promedio de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales, se logró con el fertilizante foliar Nitrofoska®, durante los días 18 y 24 (8; 3.29 y 2.2 µg mL⁻¹, respectivamente), seguido por los obtenidos en Guillard y Quimifol®. Se concluye que esta microalga puede ser cultivada con fertilizantes agrícolas comerciales, como fuente alternativa de nutrientes para producir biomasa y pigmentos con aplicaciones en las industrias biotecnológicas y acuícolas.

microalgae can be grown with commercial agricultural fertilizers as an alternative source of nutrients to produce biomass and pigments with applications in biotechnology and aquaculture industries.

KEY WORDS

Microalgae, nutrients, biomass, pigments.

Introduction

Microalgae have been widely used in the last decades as live food for a great variety of culture organisms as fishes, crustaceans, molluscs and zooplankton (rotifers, copepods, cladocerans, artemia), given their high growth rate and excellent nutritional values (Muller-Feuga *et al.*, 2003). Its use has been increased in the biotechnological industries, given by the great diversity of metabolites of high industrial value (pigments, fatty acids, bioactive components, etc.) proceeding from these microorganisms (Wijffels *et al.*, 2013).

Amongst freshwater microalgae with potential for laboratory and massive production, *Hyaloraphidium contortum* highlights, which has been characterized by reaching high population densities and important contents of chlorophyll *a* by being grown in monoalgal and polialgal forms (Brito *et al.*, 2013a; 2013b). However, it is necessary to continue on researching the aspects related to the use of alternative sources of fertilizers for their culture, given the high costs of conventional cultivation mediums, which increase the costs of massive production of the biomass of any microalgae (Chisti, 2007).

A number of studies have shown the utilization of agricultural fertilizers and municipal or industrial residual waters in microalgae cultures, since they contain all necessary nutrients and micronutrients to support microalgal growth and reducing production costs (Ungsethaphand *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014).

In Venezuela, the ignorance of physiology, biochemistry and sowing of plenty of freshwater microalgae has generated the need to research this resource practically unexplored and unused. The aim of this paper was to compare the biomass and photosynthetic pigment production of a freshwater microalgae species *Hyaloraphidium contortum*, in the traditional medium Guillard F/2, and in mediums based on agricultural fertilizers at lower cost.

PALABRAS CLAVE

Microalgas, nutrientes, biomasa, pigmentos.

Introducción

Las microalgas han sido utilizadas en las últimas décadas como alimento vivo para una gran variedad de organismos sometidos a cultivo, entre estos peces, crustáceos, moluscos y zooplancton (rotíferos, copépodos, cladóceros, artemia), dado a sus altas tasas de crecimiento y excelente valor nutricional (Muller-Feuga *et al.*, 2003). También se ha incrementado su uso en las industrias biotecnológicas, motivado a la gran diversidad de metabolitos de alto valor industrial (pigmentos, ácidos grasos, bioactivos, etc.) procedentes de estos microorganismos (Wijffels *et al.*, 2013).

Entre las microalgas de agua dulce con potencial para su producción a escala de laboratorio y masivamente destaca *Hyaloraphidium contortum*, la cual se ha caracterizado por alcanzar elevadas densidades poblacionales e importantes contenidos de clorofila *a* al ser cultivada en forma monoalgal y polialgal (Brito *et al.*, 2013a; 2013b). Sin embargo, es necesario seguir investigando los aspectos relacionados con el uso de fuentes alternativas de fertilizantes para su cultivo, dado a los altos costos de los medios de cultivo convencionales los cuales encarecen la producción masiva de la biomasa de cualquier microalga (Chisti, 2007).

Numerosos estudios han demostrado la utilización de los fertilizantes agrícolas y de las aguas residuales municipales e industriales en los cultivos de microalgas por contener todos los nutrientes y micronutrientes necesarios para soportar el crecimiento microalgal y a la vez aminoran los costos de producción (Ungsethaphand *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014).

En Venezuela, el desconocimiento de la fisiología, bioquímica y cultivo de muchas microalgas dulce acuícola, ha generado la necesidad de investigar este recurso prácticamente inexplorado y sin uso. El propósito del presente trabajo fue comparar la producción de biomasa y pigmentos fotosintéticos de una especie de microalga de agua dulce *Hyaloraphidium contortum*, en el medio tradicional Guillard F/2, y en medios a base de fertilizantes agrícolas de menor costo.

Materials and Methods

Microorganism and culture conditions

A strain from the freshwater microalgae *H. contortum* procedent from the Biology and Crustaceous Culture Laboratory from the Institute of Tropical Zoology from the Central University of Venezuela was used. This strain was cultivated in three nutritional mediums, from which two were inorganic fertilizers: Nitrofoska® and Quimifol® (Table 1), and the traditional medium F/2 Guillard (Guillard, 1975), at a concentration of 3.5 mM of total nitrogen. Cultures were started with a cellular density of 1×10^5 cel mL⁻¹, by quadruplicate using 1L glass recipients with functional volume of 750 mL of sterile nutritional medium (autoclaved at 20 PSI, 120 °C for 15 min) and kept in temperatures from 27±2°C, constant lighting of 5000 lux, given by two fluorescent cold light lamps of 40 w, placed in an average distance of 20 cm and continual aeration of 200 mL min⁻¹.

Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de la microalga de agua dulce *H. contortum*, procedente del Laboratorio de Biología y Cultivo de Crustáceos, del Instituto de Zoología Tropical de la Universidad Central de Venezuela. Esta cepa fue cultivada en tres medios nutritivos; de los cuales dos de ellos fueron fertilizantes inorgánicos comerciales: Nitrofoska® y Quimifol® (Tabla 1) y el medio tradicional F/2 Guillard (Guillard, 1975), a una concentración de 3.5 mM de nitrógeno total. Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de 1×10^5 cel mL⁻¹, por cuadruplicado usando recipientes de vidrio de 1L de capacidad con un volumen funcional de 750 mL de medio nutritivo estéril (autoclavado a 20 PSI, 120 °C por 15 min) y se mantuvieron en temperaturas de 27±2°C, iluminación constante de 5000 lux, proporcionada por dos lámparas fluorescentes de luz blanca fría de 40 w, colocadas a una distancia promedio de 20 cm y aireación continua de 200 mL min⁻¹.

Table 1.
Chemical composition of fertilizers used.

Tabla 1.
Composición química de los fertilizantes utilizados.

Ingredients	Quimifol®	Nitrofoska®
Nitrogen	15 %	10 %
Phosphoric Anhydride	5 %	4 %
Potassium Oxide	5 %	7 %
Boron	0.02 %	11 ppm
Iron	0.08 %	70 ppm
Manganese	0.04 %	8 ppm
Zinc	0.08 %	2 ppm
Cobalt	0.004 %	12 ppm
Molybdenum	0.002 %	1 ppm
Copper	0.02 %	12 ppm
Magnesium	0.03 %	0.2 %
Sulphur	0.162 %	0.8 %
Calcium	0.03 %	

Analysis of growth parameters and pigment content

Every two days during 24 days microalgae growth was evaluated by the recount of cells previously fixed with lugol at 1 % in a Neubauer camera of 0.1 mm depth. Cellular density of microalgae was determined by the equation $C = (N/2) * 10^4$, where C = cells mL, N = number of cells present in both central fields of the Neubauer camera and 10^4 = conversion factor of the number of cells in 0.1 μ L to mL (Manacorda *et al.*, 2007). Using the cellular density data, growth curves were made and growth rates, duplication time and productivity were calculated from these, following the criteria of Madigan *et al.*, (1999). Instant growth rate (K) is the average of the population in a limited period of time. This value is determined by the exponential growth phase as follows: $K = \log_{10} X_1 - \log_{10} X_0 / 0,301 * (t_1 - t_0)$, where: K = instant growth rate (div/day), X_1 ; X_0 = Initial and final cellular density in logarithmic phase, t_1 ; t_0 = Initial and final time of culture. While duplication time (Dt) is the period of time required to duplicate the microalgae population and is calculated $Dt = 1/K$.

Pigments were analyzed every 6 days. 5 mL of the sample of each replica were centrifuged at 4000 rpm/10 min, and to the resulting pellet, 5 mL of an acetone solution: methanol (2:1 V/V) were added; posteriorly, tubes were left in the dark during 24 h at 4 °C. After, they were centrifuged and the contents of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids of the supernatant were determined by the reading of absorbance in a spectrophotometer (brand Orion) at a wavelength of 480,647 and 664nm, following the recommendations of Jeffrey and Humphrey (1975) and Strickland and Parsons (1972), respectively. Pigment concentration was expressed per culture volume (μ g mL).

Physical-chemical parameters of cultures

During the assay, pH, conductivity and total dissolved solids were measured using a multiple portable meter brand Hanna® model HI1991301.

Analysis of results

Data were analyzed by the microcomputer program Statistix version 7, Analytical Software 2002. Once the normality and homogeneity assumptions of variances were proven with the random normality and Shapiro tests, a variance analysis was applied to determine the effects

Análisis de los parámetros de crecimiento y del contenido de pigmentos

Cada dos días, por un periodo de 24 días, se evaluó el crecimiento de la microalga, mediante el recuento de células previamente fijadas con lugol al 1 %, en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Se calculó la densidad celular de las microalgas aplicando la ecuación de $C = (N/2) * 10^4$, donde C = células mL, N = sumatoria del número de células presentes en los dos campos centrales de la cámara de Neubauer y 10^4 = factor de conversión del número de células en 0.1 μ L a mL (Manacorda *et al.*, 2007). Con los datos de densidad celular se realizaron las curvas de crecimiento y a partir de éstas se calcularon las tasas de crecimiento, el tiempo de duplicación y la productividad, siguiendo los criterios de Madigan *et al.*, (1999). La tasa instantánea de crecimiento (K) es el valor promedio de la población en un periodo de tiempo limitado. Este valor se determina en la fase de crecimiento exponencial de la siguiente manera: $K = \log_{10} X_1 - \log_{10} X_0 / 0,301 * (t_1 - t_0)$, dónde: K = Tasa instantánea de crecimiento (Div/día), X_1 ; X_0 = Densidad celular final e inicial en fase logarítmica, t_1 ; t_0 = Tiempo final e inicial del cultivo. Mientras, el tiempo de duplicación (Td) es el período de tiempo requerido para duplicar la población microalgal y se calcula $Td = 1/K$.

Los pigmentos se analizaron cada 6 días. Para ello, se centrifugaron 5 mL de muestra de cada réplica a 4000 rpm/10 min y al pellet resultante se le agregaron 5 mL de una solución acetona: metanol (2:1 V/V); posteriormente, los tubos se dejaron en oscuridad durante 24 h a 4 °C. Seguidamente, se centrifugaron y al sobrenadante se le determinó los contenidos de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales, mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (marca Orion) a una longitud de onda de 480, 647 y 664nm, siguiendo las recomendaciones de Jeffrey y Humphrey (1975) y Strickland y Parsons (1972), respectivamente. La concentración de pigmentos se expresó por volumen de cultivo (μ g mL).

Parámetros físico-químicos de los cultivos

Durante el ensayo se midió el pH, conductividad y sólidos disueltos totales, utilizándose un medidor múltiple portátil marca Hanna® modelo HI1991301.

Análisis de los resultados

Los datos se analizaron mediante el programa para microcomputadoras Statistix versión 7, Analytical Software 2002. Una vez comprobados los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas, con las pruebas de normalidad aleatoria y Shapiro; se aplicó

of the independent variables: growth medium, sowing time and their interactions on the cellular density variable (cel mL^{-1}), and chlorophyll pigments ($\mu\text{g mL}^{-1}$) using SAS (1998). Those variables with significant effects were applied an average test Duncan α 0.05.

Results and Discussion

Growth parameters

Microalgae *H. contortum* growth showed an algal kinetic significantly influenced ($p < 0.0001$) by the nutrient source and the sowing time. Figure 2 and table 2 indicate the different growth phases and culture productivity of *H. contortum*. Cultures in Quimifol® and F/2 Guillard did not present adaptation phase, unlike the cultures in Nitrofoska®, where this phase lasted 48 hours. Exponential growth in the different cultures was presented at different times. Cultures in F/2 and Quimifol® showed this phase between days 0-6 and 0-4 with densities among 100 to $4.656 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ and 100 to $500 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$, respectively; while in Nitrofoska®, between days 4-6 with averages of 220 to $2.372.5 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$. Most population and productivity densities per volume of culture were obtained in the means of F/2 Guillard medium at 24 days of sew ($9.7 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$ and $7.6 \times 10^8 \text{ cel/L/day}$) and Nitrofoska® ($8.7 \pm 0.5 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$ and $5.7 \times 10^8 \text{ cel/L/day}$).

Growth velocity of *H. contortum* was significantly affected ($p < 0.05$) by the different culture mediums, observing higher growth rates and less duplication times in F/2 Guillard and Nitrofoska® (approximately $K = 1 \text{ div/day}$; $Dt = 1 \text{ day}$); while in Quimifol® growth rate was lower and duplication time was higher ($K = 0.6 \text{ div/day}$; $TD = 1.7 \text{ days}$).

Higher cellular densities were found in Guillard and Nitrofoska®, this can be due to the adequate supply of nutriment in regard of quantity and quality for the development of the reproductive capacity of *H. contortum*. High performance observed in this microalgae in Nitrofoska® in contrast to Quimifol® might be due to the proportionality of chemical components in the fertilizer Nitrofoska®, and not for the higher availability of nutrients, since this source contains less proportion N: P: K $10:4:7$ in comparison to Quimifol® $15:5:5$. Ortega-Salas and Reyes-Bustamante (2012) appoint a higher performance of the following freshwater microalgae

un análisis de varianza, para determinar los efectos de las variables independientes: medio de crecimiento, tiempo de siembra y sus interacciones sobre la variable dependiente densidad celular (cel mL^{-1}), y pigmentos clorofílicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por medio del SAS (1998). Aquellas variables con efectos significativos se les aplicaron una prueba de promedio Duncan α 0.05.

Resultados y Discusión

Parámetros de crecimiento

El crecimiento de la microalga *H. contortum*, mostró una cinética algal influenciada significativamente ($p < 0.0001$) por la fuente de nutriente y el tiempo de siembra. La figura 2 y tabla 2 indica las diferentes fases de crecimiento y productividad del cultivo de *H. contortum*. Los cultivos en Quimifol® y F/2 Guillard no presentaron fase de adaptación, a diferencia de los cultivos en Nitrofoska®, donde esta fase duro 48 horas. El crecimiento exponencial en los diferentes cultivos se presentó en distintos tiempos. Los cultivos en F/2 y Quimifol® mostraron esta fase entre los días 0-6 y 0-4 con densidades entre 100 a $4.656 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ y 100 a $500 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$, respectivamente; mientras en Nitrofoska® entre los días 4-6 con promedios de 220 a $2.372.5 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$. Las mayores densidades poblacionales y productividades por volumen de cultivo, se obtuvieron en los medios de F/2 Guillard a los 24 días de siembra ($9.7 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$ y $7.6 \times 10^8 \text{ cel/L/día}$) y Nitrofoska® ($8.7 \pm 0.5 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$ y $5.7 \times 10^8 \text{ cel/L/día}$).

La velocidad de crecimiento de *Hyaloraphidium contortum* fue afectada significativamente ($p < 0.05$) por los diferentes medios de cultivo, observándose las mayores tasas de crecimiento y menores tiempos de duplicación en F/2 Guillard y Nitrofoska® (aproximadamente $K = 1 \text{ div/día}$; $TD = 1 \text{ día}$); mientras en Quimifol® la tasa de crecimiento fue menor y por ende el tiempo de duplicación fue mayor ($K = 0.6 \text{ div/día}$; $TD = 1.7 \text{ días}$).

Las mayores densidades celulares en Guillard y Nitrofoska®, probablemente se debe al suministro adecuado de nutrimentos en cuanto a cantidad y calidad para el desarrollo de la capacidad reproductiva de *H. contortum*. Los altos rendimientos observados de esta microalga en el medio Nitrofoska®, con respecto al medio Quimifol®, quizás sea por la proporcionalidad de los componentes químicos en el fertilizante Nitrofoska®, y no por la mayor disponibilidad de nutrientes, dado que esta fuente contiene menor propor-

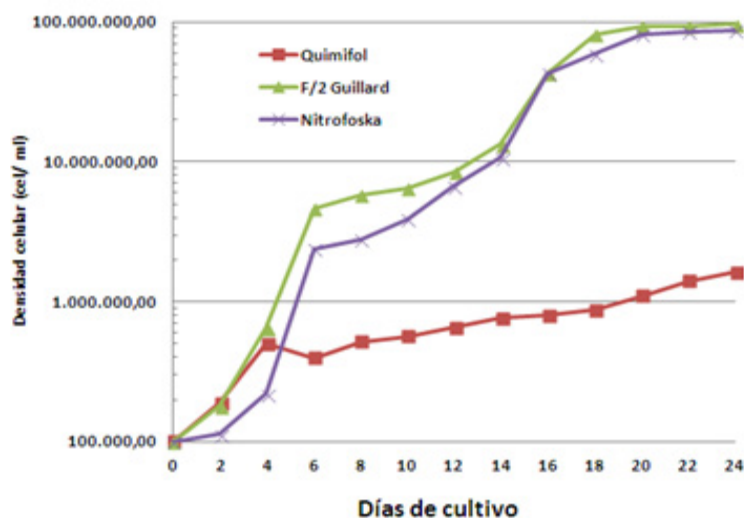


Figure 1. Cellular density in monoculture *Hyaloraphidium contortum*

Figura 1. Densidad celular en el monocultivo *Hyaloraphidium contortum*

Table 2.

Growth parameters during the exponential growth phase from the microalgae *Hyaloraphidium contortum* cultured in mediums Quimifol, F/2 Guillard and Nitrofoska.

Tabla 2.

Parámetros de crecimiento, durante la fase de crecimiento exponencial, de la microalga *Hyaloraphidium contortum* cultivada en los medios Quimifol, F/2 Guillard y Nitrofoska

Growth parameters	Quimifol®	F/2 Guillard	Nitrofoska®
Maximum density (Cel mL ⁻¹)	1.6x10 ⁶	9.7x10 ⁷	8.7x10 ⁷
K (Div day ⁻¹)	0.6	0.9	1.1
DT (Days)	1.7	1.1	0.9
Productivity (Cel L ⁻¹ day ⁻¹)	1.0x10 ⁸	7.6x10 ⁸	5.7x10 ⁸

Kirchneriella obesa, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorococcum infusorium* in fertilizer I, which contains a proportion of N: P: K 2.4:1, $7.1.3 \times 10^5$ ppm, while the lowest performance was obtained in fertilizer II with N: P: K 2:3:1 $\times 10^5$ ppm, similar answers to those found in this study despite the existing differences in the cultured species, used mediums and chemical composition of fertilizers.

Several authors have appointed this microalgae behavior, Brito et al., (2013a, 2013b) determined cellular densities at 24 days of sowing of 13.825 ± 5.603 , 94 ; 29.125 ± 10.902 , 10 and $30.375 \pm 8.900 \times 10^6$ cel mL⁻¹ in Nitrofoska®, Poliverdol® and Guillard, respectively, in mix cultures of *H. contortum* and *Chlorella vulgaris*. In the *H. contortum* and *Pseudokirchneriella subcapitata* they reported densities at 24 days of sowing of 65.88; 65.38 and 63.5×10^6 cel mL⁻¹ in Guillard, Nitrofoska® and Poliverdol®, respectively, similar results to those obtained in this monoculture. In monoculture of *H. contortum*, Brito et al., (2006) obtained at 18 days of sowing 21.3×10^6 cel mL⁻¹, inferior result to the one reported in this investigation, in the Nitrofoska® medium. These differences in cellular density with the same species and growth medium are probably due to culture conditions, as light intensity used, inoculum not adapted to used growth mediums, low temperatures and harvesting time. Romero (2011), obtained cellular concentrations over 20×10^6 cel mL⁻¹ in *Chlorella* culture in residual waters in the processing facilities of fishing products, for a retention time of six days, cataloged as very good in both controlled lab and the exterior condition. Kim et al., (2007), Greque and Viera (2007), obtained increases in the algae biomass with the age of the culture in microalgae *Scenedesmus* sp. and *Scenedesmus obliquus*.

Pigment content

Significant statistical differences ($p < 0.05$) were determined in the concentration of photosynthetic pigments of *H. contortum* in the different sowing times in each of the sources of nutrients used. The behavior of the microalgae in each of the medium cultures is indicated in table 3, observing the higher average concentration in the enriched medium with Nitrofoska® of chlorophyll *a*, *b* and total carotenoids at 18 and 24 days (8; 3.3 and 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively), in Guillard, higher concentration of the pigment was determined at 24 days and Quimifol® at 12 and 24 days. Probably, the increase in the pigment concentration with culture

ción N: P: K 10:4:7, en comparación con Quimifol® 15:5:5. Ortega-Salas y Bustamante (2012), señalan un mayor rendimiento de las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorococcum infusorium* en el fertilizante I, el cual contiene una proporción N: P: K de 2.4:1, $7.1.3 \times 10^5$ ppm, mientras el menor rendimiento lo obtuvieron en el fertilizante II con N: P: K de 2:3:1 $\times 10^5$ ppm, respuestas similares a las halladas en este estudio a pesar de las diferencias existentes en cuanto a las especies cultivadas, medios utilizados y composición química de los fertilizantes.

Varios autores han señalado este comportamiento microalgal, Brito et al., (2013a, 2013b) determinaron en cultivos mixto de *H. contortum* y *Chlorella vulgaris* densidades celulares a los 24 días de siembra de 13.825 ± 5.603 , 94 ; 29.125 ± 10.902 , 10 y $30.375 \pm 8.900 \times 10^6$ cel mL⁻¹ en Nitrofoska®, Poliverdol® y Guillard, respectivamente. En el cultivo *H. contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata* reportaron densidades a los 24 días de siembra de 65.88; 65.38 y 63.5×10^6 cel mL⁻¹ en Guillard, Nitrofoska® y Poliverdol® respectivamente, resultados similares a los obtenidos en este monocultivo. Brito et al., (2006) en monocultivos de *H. contortum* a los 18 días de siembra obtuvieron 21.3×10^6 cel mL⁻¹, resultado inferior a lo reportado en esta investigación, en el medio Nitrofoska®. Estas diferencias en densidad celular con la misma especie y medio de crecimiento, probablemente se deben a condiciones cultivos tales como la intensidad de luz empleada, inoculo no adaptado a los medios de crecimiento empleado, bajas temperatura y tiempo de cosecha. Romero (2011), en cultivo de *Chlorella* spp. en aguas residuales de las instalaciones procesadoras de productos pesqueros, obtuvo concentraciones celulares por encima de 20×10^6 cel mL⁻¹ para un tiempo de retención de seis días, valor catalogado como muy bueno tanto en condiciones controladas de laboratorio como al exterior. Kim et al., (2007), Greque y Viera (2007), obtuvieron aumentos en la biomasa algal con la edad del cultivo en las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Scenedesmus obliquus*.

Contenido de pigmentos

Se determinaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en la concentración de pigmentos fotosintéticos de *H. contortum* en los diferentes tiempos de siembra en cada una de las fuentes de nutrientes empleadas. En la tabla 3 se indican el comportamiento de la microalga en cada uno de los medio de cultivo, observándose en el medio enriquecido con Nitrofoska®, la mayor concentración promedio de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales, durante los días 18 y 24 (8; 3.3 y 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), en Gui-

age is due to the nutrient depletion and experimental conditions. Researchers as Fabregas *et al.*, 1985; Fan *et al.*, 1994; Tjahjono *et al.*, 1994 and Griffiths *et al.*, 2014 have appointed accumulation of pigments and lipids in several algae species due to light intensity, presence of acetate in the environment, high temperature and lack of nitrogen or other composites.

Brito *et al.*, (2013a,b) determined the higher production of chlorophyll *a*, *b* and total carotenoids in the mix culture *H. contortum* and *Pseudokirchnerilla* with the fertilizer Nitrofoska®, with averages 10.87±1.53 µg of chlorophyll *a*/mL; 3.59±0.76 µg of chlorophyll *b*/mL and 3.91±0.64 µg of total carotenoids at 24 days of sowing, similar response to those obtained in the monoculture of *H. contortum*. In the mix culture of *H. contortum* and *Chlorella vulgaris*, higher production of photosynthetic pigments was obtained in Guillard at 18 days of sowing with averages of 3.07±1.4 µg of chlorophyll *a*/mL and 1.10±0.5 µg of chlorophyll *b*/mL and the higher concentration of total carotenoids at 24 days with averages of 1.11±0.12 µg mL⁻¹, contrasting with the results obtained in this experiment. Loreto *et al.*, (2003) reported in cultures of cyanobacteria *Anabaena* PCC7120 values of 12.6±3.2 to 15.7±1.2 µg mL⁻¹ chlorophyll *a* and in total carotenoids 1.2±0.3 to 4.5±0.3 µg mL⁻¹. Chacón *et al.*, (2006), using *Chlorella* sp. obtained 4.95 ± 0.54 µg mL⁻¹ of total carotenoids in stationary phase of the culture. Andrade *et al.*, (2009), in the stationary phase (15 days) in culture of *Scenedesmus* and using Nitrofoska® as culture medium, obtained 1.11±0.03 µg mL⁻¹ of total carotenoids, inferior values to those found in this study. These differences found with previous research were possibly caused by the used experimental conditions in each of the assays, concentration and type of nutrients, harvest time and microalgae species used.

Physical and chemical parameters of culture water

Electric conductivity (µs cm⁻¹), total dissolved solids (ppm) and pH in culture water are shown in figure 3. Highest values in electric conductivity and total dissolved solids were recorded in the medium Guillard (0.03-0.30 µs cm⁻¹ and 0.01-0.16 ppm), while commercial fertilizers presented lower values than the latter. The pH fluctuated with sowing time and growth medium; in Quimifol® it was kept neutral. In cultures fertilized with Nitrofoska®, pH was initially acid, having neutrality within time, while in the medium Guillard, pH was kept slightly basic. The variation of the pH is directly related with the cellular increase due to the increase in the consumption of CO₂, having in consequence the alkalization

llard la mayor concentración de pigmento se determinó a los 24 días y Quimifol® a los 12 y 24 días. Probablemente, el incremento en la concentración de pigmentos con la edad del cultivo, se debe al agotamiento de nutrientes y condiciones experimentales. Investigadores como Fábregas *et al.*, 1985; Fan *et al.*, 1994; Tjahjono *et al.*, 1994 y Griffiths *et al.*, 2014 han señalado en varias especies de algas la acumulación de pigmentos y de lípidos debido a la intensidad de luz, presencia de acetato en el medio, temperatura elevada y carencia de nitrógeno u otros compuestos.

Brito *et al.*, (2013a,b) determinaron en el cultivo mixto *H. contortum* y *Pseudokirchnerilla subcapitata* la mayor producción de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales en el fertilizante Nitrofoska®, con promedios 10.87±1.53 µg de clorofila *a*/mL; 3.59±0.76 µg de clorofila *b*/mL y 3.91±0.64 µg de carotenoides totales/mL a los 24 días de siembra, respuesta similar a las obtenidas en el monocultivo de *H. contortum*. En el cultivo mixto *H. contortum* y *Chlorella vulgaris* la mayor producción de pigmentos fotosintéticos se obtuvo en Guillard a los 18 días de siembra con promedios de 3.07±1.4 µg de clorofila *a*/mL y 1.10±0.5 µg de clorofila *b*/mL y la mayor concentración de carotenoides totales a los 24 días con promedios de 1.11±0.12 µg mL⁻¹, contrastando con los resultados obtenidos en este experimento. Loreto *et al.*, (2003), reportaron en cultivos de cianobacterias *Anabaena* PCC7120 valores de 12.6±3.2 a 15.7±1.2 µg mL⁻¹ de clorofila *a* y en carotenoides totales 1.2±0.3 a 4.5±0.3 µg mL⁻¹. Chacón *et al.*, (2006), empleando *Chlorella* sp. obtuvieron 4.95±0.54 µg mL⁻¹ de carotenoides totales en fase estacionaria del cultivo. Andrade *et al.*, (2009), en cultivo de *Scenedesmus* en fase estacionaria (15 días) y utilizando Nitrofoska® como medio de cultivo obtuvieron 1.11±0.03 µg mL⁻¹ de carotenoides totales; valores inferiores a los hallados en este trabajo. Estas diferencias encontradas con los anteriores investigaciones posiblemente fueron ocasionadas por las condiciones experimentales empleadas en cada uno de los ensayos, concentración y tipo de nutrientes, tiempo de cosecha y especie microalgal utilizada.

Parámetros físicos y químicos del agua de cultivo

La conductividad eléctrica (µs cm⁻¹), sólidos disueltos totales (ppm) y pH en el agua de cultivos son mostrados en la figura 3. Los valores más altos en conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales se registraron en el medio Guillard (0.03-0.30 µs cm⁻¹ y 0.01-0.16 ppm), mientras los fertilizantes comerciales presentaron valores menores a este. El pH fluctuó con el tiempo de siembra y medio de crecimiento; en el medio Quimifol® se mantuvo aproximadamente neutro. En cultivos fertilizados con Nitrofoska®, el pH fue inicialmente ácido, tendiendo a la neutralidad en el transcurso del tiempo, mientras en el medio Guillard el pH se mantuvo ligeramente básico. La variación del pH está directamente relacionada

Table 3.
Content of chlorophyll *a*, *b* and total carotenoids ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in the monoculture
Hyaloraphidium contortum

Tabla 3.
Contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en el
monocultivo *Hyaloraphidium contortum*

Treatment	Days	Chlorophyll <i>a</i>	Chlorophyll <i>b</i>	Carotenoids
Quimifol®	6	0.024±0.01 ^c	0.04±0.02 ^c	0.016±0.01 ^d
	12	0.062±0.01 ^a	0.07±0.02 ^{b,c}	0.039±0.01 ^c
	18	0.035±0.01 ^{c,b}	0.17±0.08 ^{b,a}	0.059±0.01 ^b
	24	0.046±0.01 ^b	0.26±0.11 ^a	0.139±0.01 ^a
F/2 Guillard	6	0.38±0.03 ^c	0.11±0.02 ^c	0.14±0.01 ^c
	12	2.04±0.57 ^b	0.60±0.23 ^b	0.81±0.21 ^b
	18	4.48±0.54 ^a	1.35±0.25 ^a	1.80±0.28 ^a
	24	5.03±0.42 ^a	2.52±0.63 ^a	1.96±0.22 ^a
Nitrofoska®	6	0.34±0.14 ^b	0.21±0.11 ^c	0.142±0.05 ^c
	12	2.08±0.44 ^b	0.67±0.12 ^c	0.744±0.20 ^{b,c}
	18	7.99±4.79 ^a	2.21±1.20 ^{b,a}	2.903±1.71 ^a
	24	7.56±4.09 ^a	3.29±1.76 ^a	2.219±1.15 ^{b,a}

N° de observaciones=4. Medias con iguales letras no difieren estadísticamente entre sí. Duncan α 0.05.

N° of observations=4. Means with same letters do not differ statistically among themselves. Duncan α 0.05.

of the medium, hence, if the medium is very acid, the growth will be slow or simply stopped, as happened with the foliar fertilizer Nitrofoska®, where pH was slightly acid at the beginning, provoking a slow cellular growth at the beginning of the culture. Fuenmayor *et al.*, (2009) indicated in cyanobacteria *Oscillatoria* sp. maximum growth values in pH 9. Moronta *et al.*, (2006), with reference to the microalgae *Chorella sorokiniana* determined a significant effect of pH in the cellular density. In addition, its effect in microalgal growth was proven in this assay, especially in Nitrofoska®, where pH changed from slightly acid at the beginning of the assay to neutral pH, which coincide with the increases in population density of microalgae (Figure 1).

Electric conductivity and concentration of total dissolved solids show low values in all growth mediums used, due to the scarce presence, concentration, mobility and charge or valence of all ions present in them. Therefore, there is few

con el incremento celular debido al aumento en el consumo de CO₂, trayendo como consecuencia la alcalinización del medio, por ende si el medio es muy ácido el crecimiento es lento o simplemente se detiene, como sucedió en el fertilizante foliar Nitrofoska®, donde inicialmente el pH fue ligeramente ácido provocando un lento crecimiento celular al inicio del cultivo. Fuenmayor *et al.*, (2009), indicaron en cianobacteria *Oscillatoria* sp. máximos valores de crecimiento en pH 9. Moronta *et al.*, (2006), con referencia a la microalga *Chorella sorokiniana* determinaron un efecto significativo del pH en la densidad celular. Así mismo, en este ensayo se comprobó su efecto en el crecimiento microalgal, especialmente en Nitrofoska®, donde el pH cambio de ligeramente ácido al inicio del ensayo a pH neutro, el cual coinciden con los incrementos en la densidad poblacional de la microalga (Figura 1).

La conductividad eléctrica y la concentración de sólidos disueltos totales muestran valores bajos en todos los medios de crecimiento utilizados, debido a la escasa presencia, concentración, movilidad y carga o valencia de todos los

saline instruction, probably for the utilization of distilled water and the small amount of fertilizer used in the preparation of the growth mediums. In general terms, electric conductivity and total dissolved solids showed low influence in growth and concentration of photosynthetic pigments of *H. contortum*. Similar responses were found by Brito *et al.*, (2013a,b) in mix cultures of freshwater microalgae.

iones presentes en ellos. Por lo tanto, existe poca instrucción salina probablemente por la utilización de agua destilada y a la pequeña cantidad de fertilizante utilizado en la preparación de los medios de crecimiento. En términos generales la conductividad eléctrica y los sólidos disueltos totales mostraron poca influencia en el crecimiento y concentración de pigmentos fotosintéticos de *H. contortum*. Similares respuestas fueron encontradas por Brito *et al.*, (2013a,b) en cultivos mixto de microalgas dulce acuícolas.

Conclusions

Growth and content of pigments of the microalgae *H. contortum* was influenced by growth mediums and culture age. Stressing the higher population

Conclusiones

El crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *H. contortum*, fue influenciado por los medios de

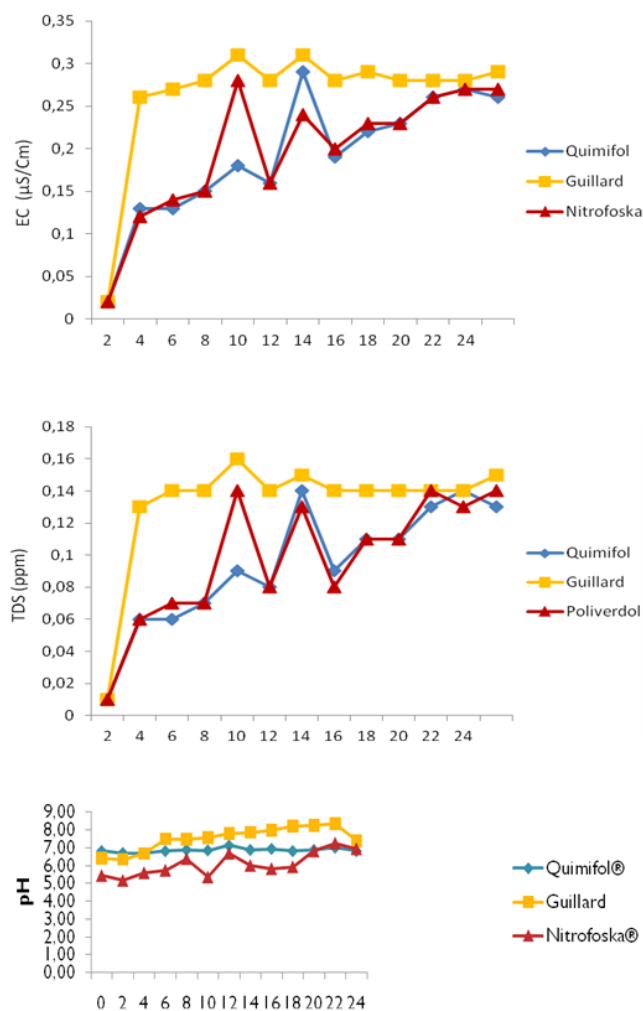


Figure 2. Physical and chemical parameters (EC: electric conductivity, TDS: total dissolved solids) in monoculture *Hyaloraphidium contortum*.

Figura 2. Parámetros físicos y químicos (EC: conductividad eléctrica, TDS: sólidos totales disueltos) en monocultivo *Hyaloraphidium contortum*.

density, instant growth rate and productivity in Guillard and Nitrofoska®. Higher production of photosynthetic pigments was obtained in Nitrofoska®, which is an affordable source of nutrient (19.20 Bs/L), easy acquisition and management, in comparison to Guillard (78 Bs/L). In general terms, this microalgae species can be used in massive cultures for different aims, biomass and pigments obtaining, for the feasibility of culture, quick growth and high pigment production. Nevertheless, it is necessary to evaluate the higher amount of parameters to determine the biochemical characteristics and its potential in the obtaining of bioproducts.

crecimiento y la edad del cultivo. Destacándose, la mayor densidad poblacional, tasa de crecimiento instantáneo y productividad en Guillard y Nitrofoska®. La mayor producción de pigmentos fotosintéticos se obtuvo en Nitrofoska®; el cual es una fuente de nutriente económica (19,20 Bs/L), de fácil adquisición y manejo, en comparación con el medio Guillard (78 Bs/L). En términos generales, esta especie de microalga puede ser utilizada en cultivos masivos para diferentes fines, obtención de biomasa y pigmentos por la facilidad de cultivo, rápido crecimiento y alta producción de pigmento. Sin embargo, se hace necesario evaluar la mayor cantidad de parámetros para determinar las características bioquímicas y su potencial en la obtención de bioproductos.

References

- Andrade, C., Vera, A., Cárdenas, C. and Morales, E. 2009. Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia* 32(2): 126–134. http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702009000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Brito, D., Milani, N., Pereira, G., González, M. and Morán, R. 2006. Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska®. *Revista Ciencia* 14(4): 394 – 410. <http://200.74.222.178/index.php/ciencia/article/view/9505>
- Brito, D., Castro, A., Colivet, J., Gómez, E. and Mora, R. 2013a. Cinética de crecimiento de un cultivo mixto *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Interciencia* 38(8): 604–608. <http://www.redalyc.org/pdf/339/33928557009.pdf>
- Brito, D., Castro, A., Guevara, M., Gómez, E., Ramos-Villarroel, A. and Aron, N. 2013b. M. Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on commercial fertilizer. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI Food Technology* 37(1): 85–97. <http://search.proquest.com/openview/ebaa4dc71ee108420809ee7362c3f884/1?pq-origsite=gscholar>
- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I. and Morales, E. 2006. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 38(2): 98–108. <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/26>
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294–306. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007000262>
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J. and Cabezas, B. 1985. Growth chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch culture with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture* 50: 1–11. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0044848685901474>
- Fan, L., Vonshak, A. and Boussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Phycology* 30: 829–833. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0022-3646.1994.00829.x/abstract>
- Fuenmayor, G., Jonte, L., Rosales-Loaiza, N. and Morales, E. 2009. Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 29: 21–25. http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100005
- Greque, M. and Vieira, A. 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal Biotechnology* 129: 439–445. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165607000892>
- Griffiths, M., Van Hille, R. and Harrison, S. 2014. The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 2345–2356. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5442-4#page-1>
- Guillard, R.R.L.. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA; 26–60 pp.

- Jeffrey, S. and Humphrey, G. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c, and c_2 in higher plants, algae and natural populations. *Biochemie Physiologie Pflanzen* 167: 191-194. <http://www.robtheoceanographer.com/docs/jeffreyhumphrey1975.pdf>
- Kim, K., Park, W., Park, S., Kim, J., Jeune, H. and Chang, U. 2007. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresource Technology* 98: 2220–2228. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406004767>
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J. and Morales, E. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Botánica* 60 (2): 83 – 89. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-66432003000200001&script=sci_arttext
- Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J. 1999. *Biología de los Microorganismos*. 1064 pp. 8va edición. Madrid, España: Editorial Prentice.
- Manacorda, A., Cuadros, D. and Álvarez, A. 2007. *Manual Práctico de Microbiología*. Tomo I: Microbiología Ambiental I. 8 pp.
- Moronta, R., Mora, R. and Morales, E. 2006. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 23: 27-41. <http://200.74.222.178/index.php/agronomia/article/view/12162>
- Muller-Feuga, A., Moal, J. and Kaas, R. 2003. The Microalgae of Aquaculture. 1-16 pp. En: *Live feeds in marine aquaculture*. Støttrup, J. G. and McEvoy, L. A. (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford.
- Ortega-Salas, A. and Reyes-Bustamante, H. 2012. Cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorococcum infusorium* empleando tres medios de cultivo. *Avances en Investigación Agropecuaria* 16(2): 35-44. <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2012/mayo/3.pdf>
- Romero, L. 2011. Desarrollo de *Chlorella* spp. En riles orgánicos pesqueros y su influencia en la remoción de la contaminación. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental* (3): 32-38. https://scholar.google.com.mx/scholar?q=Desarrollo+de+Chlorella+sp+En+riles+org%C3%A1nicos+pesqueros+y+su+influencia+en+la+remoci%C3%B3n+de+la+contaminaci%C3%B3n.+Ingenier%C3%ADa+Hidr%C3%A1ulica+y+Ambiental++%283%29%3A+32-38&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5
- SAS. Statistical Analysis System. 1998. *User's Guide Statistics (Version 6.01.Ed)*. SAS. Int. Inc. Cary, NC, 748.
- Singh, B., Guldhe, A., Rawat, I. and Bux, F. 2014. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 29, 216-245. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032113006072>
- Strickland, J. and Parsons, T. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. 310-318 pp. Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167 (2^{da} Edition) Ottawa.
- Tjahjono, A., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. and Nagai, S. 1994. "Hyperaccumulation of astaxanthin in a green-alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters* 16:133-138. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01021659#page-2>
- Ungsethaphand, T., Peerapornpisa, Y., Whangchai, N. and Sardud, U. 2007. Productivity and chemical composition of *Spirulina platensis* using dry chicken manure as nitrogen sources, Proceedings of the 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Bangkok, Thailand. 43-48 pp.
- Vásquez-Suárez, A., Guevara, M., González, M., Cortez, R. and Arredondo-Vega, B. 2013. Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. *Revista de Biología Tropical* 61 (3): 1003-1013. <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v61n3/a02v61n3.pdf>
- Wijffels, R., Kruse, O. and Hellingwerf, K. 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology* 24(3): 405–413. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166913000852>

Cite this paper/Como citar este artículo: Brito, D.J., Caña, E., Guevara, M., Subero, J., Colivet, J. (2016). Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias* 4(1): 15-26. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/193/241>

