

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**EVALUACIÓN DEL CULTIVO CONTINUO DE TRES ESPECIES
MICROALGALES**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

MARCO ANTONIO ANZUETO SÁNCHEZ

Ensenada, Baja California, México, Octubre de 2008.

RESUMEN de la tesis de **Marco Antonio Anzueto Sánchez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California. Octubre de 2008.

EVALUACIÓN DEL CULTIVO CONTINUO DE TRES ESPECIES MICROALGALES

Resumen aprobado por:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Director de Tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de Tesis

Se cultivaron tres especies de microalgas: *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Chaetoceros muelleri* durante 60 días en un sistema de cultivo continuo, empleando tres diferentes factores de dilución, 0.11, 0.15 y 0.21, los cuales corresponden a tiempos de residencia de 4.82, 6.65 y 9.44 días, respectivamente. Se evaluó la biomasa producida cuantificando la densidad celular, el peso seco y la cantidad de ácidos grasos en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento de las microalgas. En *Isochrysis* sp la mayor densidad celular se alcanzó empleando el factor de dilución de 0.11 con un promedio de 7.14×10^6 cél·ml⁻¹, sin embargo la mayor producción de biomasa por día se obtuvo con los factores de dilución de 0.15 y 0.21, con 3.32 y 3.68 g·día⁻¹, respectivamente. Para *N. oculata* la mayor densidad celular fue de 27.61×10^6 cél·ml⁻¹ empleando el factor de dilución de 0.11, la mayor cantidad de biomasa producida por día se obtuvo con los factores de dilución de 0.15 y 0.21, con 7.18 y 7.36 g·día⁻¹, respectivamente. Para *C. muelleri* la mayor densidad celular se obtuvo al emplear el factor de dilución de 0.15, con un promedio de 1.49×10^6 cél·ml⁻¹ y la mayor producción de biomasa por día se obtuvo al cultivarla con el factor de dilución de 0.21 y 0.15, con 3.69 y 3.57 g·día⁻¹, respectivamente. Por otra parte, la clase más abundante de ácidos grasos encontrados en *Isochrysis* sp. fue la de los AGPI, con un contenido de 41.35 a 49.06% del total de los ácidos grasos, de estos el más abundante fue el ácido docosahexaenóico (DHA). En *N. oculata* la clase más abundante fue la de los AGPI con un contenido de 35.70 a 41.32% del total de los ácidos grasos, de estos el más abundante fue el ácido eicosapentaenóico (EPA) y el ácido araquidónico (ARA). Para *C. muelleri* la clase más abundante fue la de los AGMI, con un contenido de 30.79 a 34.86% del total de los ácidos grasos. Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, los más abundantes para esta especie fueron el DHA y el EPA. La temperatura promedio de los cultivos en los primeros 30 días de experimento fue de 24.9 °C ± 0.32, en los siguientes 30 días se registró una temperatura promedio de 25.6 °C ± 0.15. Desde la primera cosecha de microalgas hasta el día 60 de cultivo los valores de pH variaron de 8.46±0.20 a 9.44±0.33. Se registraron valores de intensidad luminosa de entre 23.15 y 56.03 x 10³ lux a lo largo del experimento.

Palabras Clave: microalgas, cultivo continuo, ácidos grasos

ABSTRACT of the thesis by **Marco Antonio Anzueto Sánchez**, presented as a partial requirement, to obtain the degree of MASTER IN SCIENCES with orientation in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California. October of 2008.

CULTURE CONTINUOUS EVALUATION OF THREE MICROALGAL SPECIES

Three microalgae *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata*, and *Chaetoceros muelleri* were grown for 60 days in continuous system culture at three daily dilution rates of 0.11, 0.15, and 0.21 that correspond to residency time of 4.82, 6.65 y 9.44 days respectively. Biomass was harvested and evaluated in three points of the growth curve to determine cell density, dry weight, and fatty acid concentration. In *Isochrysis* sp. high cell density was reached at the dilution rate of 0.11 with an average of 7.14×10^6 cells·ml⁻¹, but the highest biomass production per day was obtained with dilution rates of 0.15 and 0.21 with 3.32 and 3.68 g·day⁻¹, respectively. In *N. oculata* high cell density was reached at dilution rates of 0.11 with 27.61×10^6 cells·ml⁻¹, but the highest biomass production per day was obtained with dilution rates of 0.15 and 0.21 with 7.18 and 7.36 g·day⁻¹, respectively. In *C. muelleri* high cell density was reached at dilution rates of 0.15 with an average of 1.49×10^6 cells·ml⁻¹, but the highest biomass production per day was obtained with dilutions rates of 0.21 and 0.15 with 3.69 and 3.57 g·day⁻¹, respectively. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) were most abundant in *Isochrysis* sp and *N. oculata* with 41.35 to 49.06% and 35.70 to 41.32% of the total fatty acids, respectively. Docosahexaenoic acid (DHA) was higher in *Isochrysis* sp., and eicosapentaenoic acid (EPA) and araquidonic acid (ARA) were higher in *N. oculata*. In *C. muelleri* the monounsaturated fatty acids were most abundant with 30.79 to 34.89% of the total fatty acids. PUFA abundances were represented by EPA and DHA in this strain. During the first 30 days of the culture the average temperature was $24.9 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.32$, but in the next 30 days the temperature reached an average of $25.6 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.15$. pH changed from the first day of biomass harvest to day 60 of the culture with values from 8.46 ± 0.20 to 9.44 ± 0.33 . Light intensity varied between 23.15 and 56.03×10^3 lux in all the days of the experiments.

Key words: microalgae, continuous culture, fatty acids

DEDICATORIA

Con todo mi amor a mis padres y
hermanos por su apoyo incondicional

A mi familia entera

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento, con mucho cariño y respeto a mis directores de tesis: Dra. Beatriz Cordero Esquivel y al Dr. Benjamín Barón Sevilla por aceptarme en su equipo de trabajo, por su paciencia y apoyo incondicional.

A los integrantes del comité de tesis: Dr. Juan Pablo Lazo Corvera y Dra. Diana Tentori Santacruz, por el tiempo dedicado a sus revisiones acertadas de este trabajo.

A la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega y a la M. en C. Laura Carreón Palau, por su asesoría y colaboración en el análisis de ácidos grasos.

A los técnicos del Departamento de Acuicultura por su apoyo: Luis Alberto Murillo, Adrián Celaya, Norberto Flores, Carlo Carballo, y especialmente a Francisco Valenzuela por los dibujos realizados, y a José Espinosa, por sus valiosas sugerencias en el montaje del experimento.

Un especial agradecimiento al Ingeniero Luis Márquez, por su valiosa ayuda en la inoculación de las bolsas de cultivo en el trabajo experimental.

A la M. en C. Janeth Guerrero por los análisis bacteriológicos de agua marina realizados al inicio del experimento.

A la Bióloga Patricia Ascencio Padilla por su ayuda en el análisis de las muestras.

A todos los profesores del Departamento de Acuicultura que se preocuparon por mi formación académica.

Al personal administrativo del Departamento de Acuicultura: Cecilia Loera, Bibiana Medina y Cristina Sánchez, por todo su apoyo logístico.

A mis compañeros de generación: Julio, Verónica, Roger, Adolfo, Gustavo y Emilio.

A Luis, Francisco y Emmanuel, por esos buenos y malos momentos que hemos pasado en este lugar.

A Deisy, por el apoyo constante durante mucho tiempo, sin tu compañía hubiera sido más difícil.

A todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en el desarrollo de este trabajo, mis más sinceros agradecimientos.

Al CONACYT por otorgarme una beca durante mis estudios de maestría.

CONTENIDO

	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
I. Introducción	1
I.1 Antecedentes.....	6
I.2 Objetivos.....	9
I.2.1 Objetivo general.....	9
I.2.2 Objetivos particulares.....	9
II. Material y Métodos	9
II.1 Cultivo de Microalgas.....	9
II.1.1 Mantenimiento de las cepas.....	9
II.1.2 Cultivo de inóculos.....	9
II.1.3 Tratamiento del agua.....	10
II.1.4 Descripción del sistema de cultivo continuo.....	10
II.2 Evaluación de la biomasa producida.....	16
II.2.1 Conteo celular.....	16
II.2.2 Cuantificación del peso seco.....	16
II.2.3 Cuantificación de ácidos grasos.....	17
II.3 Registro de parámetros ambientales.....	17
II.4 Análisis de ácidos grasos.....	17
II.5 Parámetros poblacionales.....	18
II.6 Análisis estadístico.....	18
III. Resultados	19
III.1 Regulación de los factores de dilución (Flujos de agua).....	19
III.2 Temperatura.....	19
III.3 pH.....	19
III.4 Intensidad luminosa.....	20
III.5 Evaluación de la biomasa producida.....	21
III.5.1 <i>Isochrysis</i> sp.	21
III.5.1.1 Conteo celular	21
III.5.1.2 Crecimiento	22
III.5.2 <i>Nannochloropsis oculata</i>	24
III.5.2.1 Conteo celular	25
III.5.2.2 Crecimiento.....	27
III.5.3 <i>Chaetoceros muelleri</i>	27

CONTENIDO (continuación)

	Página
III.5.3.1 Conteo celular.....	28
III.5.3.2 Crecimiento.....	28
III.6 Cuantificación del peso seco.....	30
III.7 Cuantificación de ácidos grasos.....	32
III.7.1 <i>Isochrysis</i> sp.....	32
III.7.2 <i>Nannochloropsis oculata</i>	37
III.7.3 <i>Chaetoceros muelleri</i>	41
IV. Discusión.....	46
V. Conclusiones.....	54
VI. Recomendaciones.....	55
Literatura citada.....	56

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Diagrama del sistema de cultivo continuo de microalgas. Sección de tratamiento de agua de mar por pasteurización.	12
2	Diagrama del sistema de cultivo continuo de microalgas. Sección del cultivo en bolsas: 1) Bolsa de plástico de 288 l; 2) Entrada de medio de cultivo; 3) Entrada de aire; 4) Entrada de CO ₂ ; 5) Salida de microalgas; 6) Tubo de distribución de medio; 7) Tubos de distribución de aire; 8) Llaves de bronce para aireación; 9) Lámparas; 10) Tubos de cosecha, 11) Tornillos sin fin y sujetadores.	15
3	Curva de calibración para la absorbencia a 679 nm y el número de cél·ml ⁻¹ para <i>Isochrysis</i> sp.	22
4	Curvas de crecimiento de <i>Isochrysis</i> sp. cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución (Valores promedio, FD: factor de dilución).	24
5	Curva de calibración para la absorbencia a 679 nm y el número de cél·ml ⁻¹ para <i>Nannochloropsis oculata</i> .	25
6	Curvas de crecimiento de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución (Valores promedio, FD: Factor de dilución).	27
7	Curva de calibración para la absorbencia a 679 nm y el número de cél·ml ⁻¹ para <i>Chaetoceros muelleri</i>	28
8	Curva de crecimiento de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución (Valores promedio, FD: Factor de dilución).	30
9	Porcentaje total promedio de los contenidos de ácidos grasos de <i>Isochrysis</i> sp. cultivada en forma continua en la fase estable de crecimiento. Las líneas horizontales indican la desviación estándar, FD: Factor de dilución, AGS: saturados, AGMI: monoinsaturados, AGPI: poliinsaturados, AGAI: altamente insaturados.	36

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Porcentaje total promedio de los contenidos de ácidos grasos de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada en forma continua en la fase estable de crecimiento. Las líneas horizontales indican la desviación estándar, FD: Factor de dilución, AGS: saturados, AGMI: monoinsaturados, AGPI: poliinsaturados, AGAI: altamente insaturados.	39
11	Porcentaje total promedio de los contenidos de ácidos grasos de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en forma continua en la fase estable de crecimiento. Las líneas horizontales indican la desviación estándar. FD: Factor de dilución, AGS: saturados, AGMI: monoinsaturados, AGPI: poliinsaturados, AGAI: altamente insaturados.	43

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Factores de dilución para los cultivos experimentales de <i>Isochrysis</i> sp., <i>Nannochloropsis oculata</i> y <i>Chaetoceros muelleri</i> en un sistema de cultivo continuo.	19
II	Valores promedio del pH durante los 60 días de cultivo continuo de <i>Isochrysis</i> sp (ISX), <i>Nannochloropsis oculata</i> (NNX) y <i>Chaetoceros muelleri</i> (CHX), divididos en 4 fases de la curva de crecimiento.	20
III	Intensidad luminosa promedio (lux) en 4 diferentes horas del día en un sistema de cultivo continuo de microalgas.	21
IV	Concentración celular promedio (cél·ml ⁻¹) y tasa de crecimiento (μ) en los puntos de muestreo de <i>Isochrysis</i> sp. cultivada en un sistema continuo con un factor de dilución de 0.11, 0.15 y 0.21. En paréntesis se indica la desviación estándar.	23
V	Concentración celular promedio (cél·ml ⁻¹) y tasa de crecimiento (μ) en los puntos de muestreo de <i>Nannochloropsis oculata</i> . cultivada en un sistema continuo con un factor de dilución de 0.11, 0.15 y 0.21. En paréntesis se indica la desviación estándar.	26
VI	Concentración celular promedio (cél·ml ⁻¹) y tasa de crecimiento (μ) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en un sistema continuo con un factor de dilución de 0.11, 0.15 y 0.21. En paréntesis se indica la desviación estándar.	29
VII	Producción de biomasa de <i>Isochrysis</i> sp. (ISX), <i>Nannochloropsis oculata</i> (NNX) y <i>Chaetoceros muelleri</i> (CHX) en un sistema de cultivo continuo con tres diferentes factores de dilución en los diferentes puntos de muestreo.	31
VIII	Contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y polinsaturados (AGPI) de <i>Isochrysis</i> sp. cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (A, B, C). Los valores expresan el promedio de la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) y el porcentaje (%). En paréntesis se indica la desviación estándar. Letras o números diferentes indica diferencias significativas ($p<0.05$), FD: Factor de dilución.	33

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tablas		Página
IX	Contenido promedio de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) de la microalga <i>Isochrysis</i> sp. cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores dilución y analizada en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (Muestras A, B y C). PS= Peso seco. En paréntesis se indica la desviación estándar.	34
X	Contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (A, B, C). Los valores expresan el promedio de la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y el porcentaje (%). En paréntesis se indica la desviación estándar. Letras o números diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$), FD: Factor de dilución.	38
XI	Contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) de la microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y analizada en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (Muestras A, B y C). PS= Peso seco, en paréntesis se indica la desviación estándar.	40
XII	Contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (A, B, C). Los valores expresan el promedio de la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) y el porcentaje (%). En paréntesis se indica la desviación estándar. Letras o números diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$).	41
XIII	Contenido promedio de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) de la microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y analizada en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (Muestras A y B). PS= Peso seco, en paréntesis se indica la desviación estándar.	44

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el cultivo controlado o semicontrolado de organismos acuáticos para fines comerciales, cuyo motivo principal es satisfacer la demanda de alimentos generada por la población. Según la FAO, la acuicultura mundial está creciendo alrededor del 7.2% anual, con tendencias hacia la intensificación de los sistemas de cultivo y el control de los aspectos nutricionales. En este sentido, las microalgas tienen un valor muy importante, ya que, en aproximadamente el 90% del total de la producción por acuicultura, se emplean como alimento en al menos una etapa de desarrollo de los organismos cultivados (Duerr *et al.*, 1998), ya sea directamente en moluscos, larvas de crustáceos y peces o bien en organismos intermediarios, como rotíferos, copépodos o *Artemia*.

Es por esto que en las granjas productoras de especies marinas, el cultivo de las microalgas tiene un papel trascendental y deben emplearse sistemas de cultivo especializados que sean una parte integral de las granjas y que además, resulten rentables y suministren la biomasa necesaria durante el tiempo en que transcurran los larvicultivos o como en el caso del cultivo de moluscos bivalvos, este suministro debe ser continuo durante toda la temporada de cultivo.

Las microalgas son el alimento comúnmente empleado en la acuicultura marina porque aportan los nutrientes adecuados en cantidad y calidad, como las proteínas, lípidos, carbohidratos y vitaminas, además, su importancia radica en la presencia de otros factores no nutricionales desconocidos, que mantienen adecuadamente a las especies en un cultivo (Saracco-Álvarez, 2007). A pesar de que en los últimos años se han venido investigando y desarrollando alimentos alternativos que sustituyan el uso de las microalgas, todavía no se han diseñado alimentos de calidad que las reemplacen totalmente, por lo que, seguramente, durante los próximos años la producción de larvas de especies marinas seguirá dependiendo del cultivo de microalgas (Reitan *et al.*, 1997).

Las microalgas han colonizado una gran variedad de ambientes, que van desde los

climas con aguas calientes, hasta las aguas frías, algunas muestran resistencia a condiciones de desecación, alta salinidad y baja intensidad luminosa. Su metabolismo tan plástico les permite adaptarse a estos ambientes tan hostiles, por ejemplo, ante una situación de baja disponibilidad de nitrógeno, necesario para la síntesis de proteínas para el crecimiento y la división celular, el metabolismo de las microalgas se dirige a la síntesis de carbohidratos (como los carotenoides) o de lípidos (como los ácidos grasos) (Sukenik y Wahnou, 1991). Esta plasticidad de las microalgas se ha estudiado extensamente, especialmente por su capacidad para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), benéficos y esenciales para la nutrición de las larvas de organismos marinos. (Renaud *et al.*, 2002; Martínez-Fernández *et al.*, 2006).

Los lípidos son moléculas orgánicas que forman compuestos con un gran contenido de energía, con un valor aproximado de 9 kcal·g y que proporcionan a los organismos ciertos ácidos grasos esenciales que no pueden ser sintetizados “de novo” o si lo son, no en cantidades adecuadas. Los ácidos grasos son moléculas orgánicas formadas por cadenas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo. Su fórmula es CX:Y, donde CX es el número de átomos de carbono e Y es el número de dobles enlaces. Los ácidos grasos ω -3 y ω -6 son ácidos grasos esenciales, la notación ω se refiere al último carbono de la cadena y el número tres y seis se refieren al carbono donde se localiza el último doble enlace, contado desde el último carbono (ω) hacia el -COOH terminal (Muller-Feuga *et al.*, 2003). Los ácidos grasos cumplen ciertas funciones esenciales en los organismos vivos, entre ellas como reserva energética en depósitos grasos (ceras y triglicéridos), como elementos estructurales de las membranas celulares (fosfolípidos y esfingolípidos) y como precursores de eicosanoides, que actúan como reguladores de procesos como la inflamación, vasodilatación, vasoconstricción y coagulación (Carreón-Palau *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos más importantes para los organismos, tomando como base los estudios que evalúan su valor nutricional son, el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω -3), el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 ω -3) y el ácido araquidónico (ARA, C20:4 ω -

6) (Patil *et al.*, 2007). El EPA y DHA son ácidos grasos importantes en el tratamiento de la arteriosclerosis, cáncer, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Drevon *et al.*, 1993; Simopoulos, 1999). El ARA es precursor de eicosanoides como las prostaglandinas que son importantes en procesos como el movimiento vasculatorio y la cicatrización de heridas (Simopoulos, 1999).

Desde el punto de vista de la nutrición humana, la fuente principal de DHA y EPA está en los peces marinos, sin embargo, su utilización ha presentado algunas inconveniencias, como la sobreexplotación de los recursos pesqueros, que en los últimos años ha provocado un decline de las poblaciones naturales, aumentando los precios de este recurso. Además, los peces pueden bioacumular sustancias tóxicas del medio.

Una fuente alternativa de ácidos grasos poliinsaturados que genera una gran expectativa e interés, son las microalgas marinas, ya que sus compuestos lipídicos tienen mayor estabilidad, en comparación con las fuentes de pescado porque las microalgas tienen compuestos antioxidantes como son los carotenoides y vitaminas, además, los lípidos en las microalgas están bioencapsulados por las paredes celulares lo cual ayuda a prevenir su oxidación (Patil *et al.*, 2007).

La acumulación de ácidos grasos en las microalgas es un proceso especie-específico, es decir, cada especie de microalga contiene cantidades y variedades de ácidos grasos específicos que se sintetizan bajo condiciones específicas, que pueden ser producto de factores genéticos y/o ambientales, por lo que es muy difícil hacer una generalización respecto a qué ácidos grasos y en qué cantidad son producidos por cierta microalga, incluso, su composición y concentración varían según la edad o fase del cultivo de las microalgas (Roncarati *et al.*, 2004). Aunque, es posible que el contenido de lípidos en las diatomeas se incremente cuando los cultivos se acercan a la fase estacionaria, etapa en la que los silicatos o el nitrógeno son limitantes (Pernet *et al.*, 2003).

Aún cuando las microalgas tienen características deseables para la acuicultura, no

todas son adecuadas como alimento para los organismos cultivados y deben tomarse en cuenta varias consideraciones si se desea llevar a cabo con éxito el cultivo larval de peces marinos, crustáceos, moluscos o de los organismos que se cultivan como alimento para estos estadios larvales. En primer lugar, las microalgas no deben ser tóxicas, deben tener el tamaño adecuado para ser ingeridas, una pared digerible y además, deben tener una composición bioquímica adecuada, especialmente de los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que estos son esenciales para el desarrollo larval de los organismos. Otros criterios están relacionados con la fisiología de las microalgas e incluyen la resistencia a la fotoinhibición, la respuesta a las fluctuaciones diurnas, la sensibilidad a concentraciones de oxígeno y el estrés osmótico, ya que es común que en los sistemas de cultivo masivo realizados al exterior, se presenten condiciones limitantes que repercuten en el volumen de producción y por lo tanto en la rentabilidad (Abalde *et al.*, 1995).

Entre las especies de microalgas que se usan comúnmente en la alimentación de especies marinas se encuentran *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Rhodomonas* sp. debido a su aceptable composición bioquímica, con altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados y altas tasas de crecimiento (Dhert *et al.*, 2001; Cerón-Ortíz, 2006).

En los laboratorios tradicionales de peces marinos, los sistemas de cultivo de microalgas generalmente son estáticos (comúnmente llamados cultivos “batch” o discontinuos), en los cuales, un medio enriquecido se inocula con una cantidad inicial de microalgas y se espera a que las células alcancen la fase exponencial de crecimiento o bien la densidad máxima para cosecharlas. Estos sistemas son poco estables, por lo que las microalgas sólo están disponibles en tiempos cortos, además, conforme pasa el tiempo, se acumulan en el medio los metabolitos de desecho de las propias microalgas y la flora bacteriana se incrementa, lo que hace inapropiado su uso por tiempos prolongados. También se han empleado cultivos semicontinuos, que se caracterizan por un sistema de cosechas parciales en tiempos determinados y por el reemplazo del volumen equivalente al cosechado, con medio de cultivo nuevo, lo que comúnmente se llama dilución, sin

embargo, por problemas de contaminación, estos sistemas también tienen una vida media corta, por lo que sólo se pueden usar por tiempos cortos. Un sistema de cultivo en el que la producción sea constante y por periodos más prolongados es una solución alternativa, que resuelve las dificultades propias de los sistemas discontinuos y semicontinuos (Trotta, 1980).

Un sistema de cultivo continuo es aquel en el que se sustrae un volumen del cultivo (microalgas en su medio de cultivo) a una tasa constante, y al mismo tiempo, el volumen cosechado es reemplazado por un volumen equivalente de medio nuevo, enriquecido con nutrientes, asegurando así la producción constante y estable de microalgas por tiempos prolongados (Richmond, 1988).

Uno de los factores que tienen mayor influencia sobre el crecimiento de las microalgas en estos sistemas continuos es la tasa de dilución, que debe ser igual a la tasa de crecimiento de las microalgas, para que el sistema se mantenga en equilibrio o se mantenga estable (“steady state”). Si la tasa de dilución es demasiado baja, el cultivo tiende a comportarse como un sistema estático y las microalgas llegan a una fase de crecimiento estacionaria. Por otra parte, si la tasa de dilución es demasiado alta, las microalgas son sustraídas del cultivo a una tasa mayor que su velocidad de duplicación, por lo que no hay incremento en la densidad de cultivo y por lo tanto tampoco hay producción (Richmond, 1988). Cabe destacar que es probable que la calidad bioquímica no sea la misma al emplear diferentes factores de dilución, porque la fisiología microalgal se comportará de manera distinta. La tasa de crecimiento de las microalgas depende directamente de la dilución, por lo que es necesario aplicar el factor de dilución acorde a la especie de microalga. Una vez determinadas éstas, el flujo de agua entrante al sistema de cultivo se debe regular cuidadosamente.

I.1 Antecedentes

El interés en la producción de microalgas tiene su origen desde hace ya muchos años, ya que son una fuente de compuestos útiles para el hombre, como lípidos, proteínas, polisacáridos, pigmentos y vitaminas, entre otros. Sin embargo, es a partir de 1960 cuando surge con fuerza la biotecnología de las microalgas y cianobacterias, desarrollándose constantemente hacia la producción masiva, aunque en menor proporción que en el área de las bacterias y hongos, quizá debido a la naturaleza biológica de las microalgas que requieren luz para crecer y esto limitó el desarrollo de la biotecnología fotoautotrófica (Muller-Feuga *et al*, 2003). En muchos casos, la producción de microalgas a gran escala no es económicamente rentable, en gran medida por los problemas y por el costo que conlleva la separación de las células microalgales del medio de cultivo (Becker, 1994). Pero en otros casos, como el de la acuicultura, no es necesario este procedimiento, ya que las microalgas (incluyendo el medio de cultivo) pueden usarse directamente como alimento para los organismos cultivados.

Inicialmente, para el cultivo de las larvas de organismos acuáticos, las microalgas se producían induciendo su desarrollo en estanques rústicos, empleando agua enriquecida con productos naturales como el estiércol, entonces, las larvas se trasladaban a estos estanques donde se desarrollaban. En la actualidad, éstas técnicas rudimentarias todavía se usan en algunas regiones del mundo para la producción de peces y camarones. Después, en los años 70, las microalgas empezaron a cultivarse en instalaciones mas especializadas, desde donde eran transportadas a los estanques donde se cultivaban las larvas, esta técnica es la más utilizada en la actualidad. Desde entonces los sistemas de cultivo de microalgas han venido desarrollándose día tras día con el fin de lograr una mayor producción a menor costo.

Típicamente, en la actualidad las unidades de cultivo de microalgas consisten en tanques cilíndricos (100-500 litros) hechos de plásticos transparentes (acrílico, fibra de vidrio y polietileno) cerrados o semicerrados, iluminados en forma artificial con lámparas dispuestas alrededor de los tanques, se les inyecta aire comprimido desde el fondo de

forma que las burbujas generen un proceso de mezcla al subir a la superficie y los cultivos se mantengan homogéneos y no se sedimenten las microalgas. También se usan tanques rectangulares (con una profundidad de 0.5 a 1.0 m), provistos de lámparas para iluminar la superficie del cultivo, además de inyectar aire comprimido (Muller-Feuga *et al*, 2003).

Existe una vasta información sobre el cultivo de microalgas en sistemas estáticos y semicontinuos, sobre todo, que hacen énfasis en las variables ambientales que los afectan y en la composición bioquímica de las especies cultivadas (Pernet *et al.*, 2003). Sin embargo, pocos son los estudios que describen los cultivos continuos masivos y la composición bioquímica de las microalgas cultivadas a gran escala en estos sistemas.

Entre los cultivos continuos, comúnmente se emplean los turbidostatos y los chemostatos. En los turbidostatos, las microalgas se cosechan continuamente y se agrega el medio de cultivo nuevo, entonces, el volumen de microalgas cosechadas y de medio de cultivo adicionado se ajustan automáticamente para mantener la densidad celular constante. Por otra parte, los chemostatos actúan con el principio del nutriente vital limitante, como el nitrato. Cuando las concentraciones de este nutriente disminuyen a un cierto nivel, se adiciona una cantidad fija del nutriente. Aquí la tasa de crecimiento de las células es regulada por el suministro del nutriente limitante (Richmond, 1988).

Por otra parte, la selección de la microalga que se desea cultivar es fundamental, los géneros *Chaetoceros*, *Nannochloropsis* e *Isochrysis* son los más empleados por sus características benéficas para la acuicultura.

Las especies del género *Chaetoceros* son de las más cultivadas para las larvas de crustáceos y peces, principalmente por su alto contenido en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA`s, por sus siglas en inglés), además de que pueden producirse masivamente con costos relativamente bajos (López-Elías, 2005).

Por otra parte, el género *Nannochloropsis* también se emplea ampliamente en la acuicultura marina. *N. oculata* es la especie más importante para el cultivo de organismos intermediarios como *Brachionus plicatilis*, porque contiene altos niveles de vitamina B12, promueve el rápido crecimiento poblacional de rotíferos y además contiene ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el ácido eicosapentaenoico (20:5 n3). Sin embargo, el valor nutricional de *N. oculata* para otros organismos acuáticos es bajo, porque tiene una pared celular dura que la hace difícil de digerir (Brown *et al.*, 1997).

El género *Isochrysis* también se emplea para la alimentación de larvas de peces y bivalvos. El valor nutricional de esta especie es alto, ya que tiene concentraciones elevadas de ácidos grasos poliinsaturados como el docosahexaenóico (22:6 n3).

Los cultivos continuos de microalgas son una expresión de un alto nivel de integración técnica y científica, con una alta productividad y un elevado nivel de automatización, características que se buscan para la industria. En este sentido, trabajar con procesos continuos requiere un buen conocimiento de los procesos que ocurren en él, puesto que su dinámica es mucho más compleja que la de los cultivos discontinuos o estáticos. Por lo anterior, investigar el crecimiento de las microalgas y su composición bioquímica en este tipo de cultivos llevan directamente al desarrollo de estudios científicos más profundos y complejos, que estimulan el desarrollo tecnológico en esta área.

El objetivo de este trabajo es evaluar los cultivos continuos masivos de tres especies de microalgas comúnmente empleadas como alimento en los cultivos larvarios de diferentes especies de organismos marinos.

I.2 OBJETIVOS

I. 2.1 Objetivo General

Evaluar el cultivo de las microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis oculata* en un sistema de cultivo continuo.

I.2.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la cinética del crecimiento de tres especies de microalgas en un sistema de cultivo continuo masivo con tres factores de dilución diferentes.
2. Evaluar la composición de ácidos grasos de tres especies de microalgas en un sistema de cultivo continuo masivo con tres diferentes factores de dilución.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1 Cultivo de Microalgas

II.1.1 Mantenimiento de las Cepas

Las especies de microalgas que se utilizaron en este trabajo *Chaetoceros muelleri*, con clave CHX1, *Isochrysis* sp., con clave ISX1 y *Nannochloropsis oculata*, con clave NNX1 se obtuvieron de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación superior de Ensenada (CICESE). Las cepas se mantuvieron en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo “f/2” de Guillard y Ryther (1962) y en condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (35‰) y luz continua.

II.1.2 Cultivo de Inóculos

Para obtener la cantidad de microalga suficiente para realizar los cultivos continuos se siguió la secuencia clásica de escalonamiento, es decir, desde volúmenes pequeños (125 ml) hasta volúmenes mayores (20 l). Se inocularon matraces Fernbach de 2 l y se cultivaron hasta que se alcanzó la fase exponencial, entonces sirvieron para la inoculación

de botellones de 20 l. Nuevamente, estos cultivos se mantuvieron en sistemas estáticos y una vez que alcanzaron la máxima fase de crecimiento se usaron para inocular las bolsas de plástico de aproximadamente 288 l que conformaron el sistema de cultivo continuo.

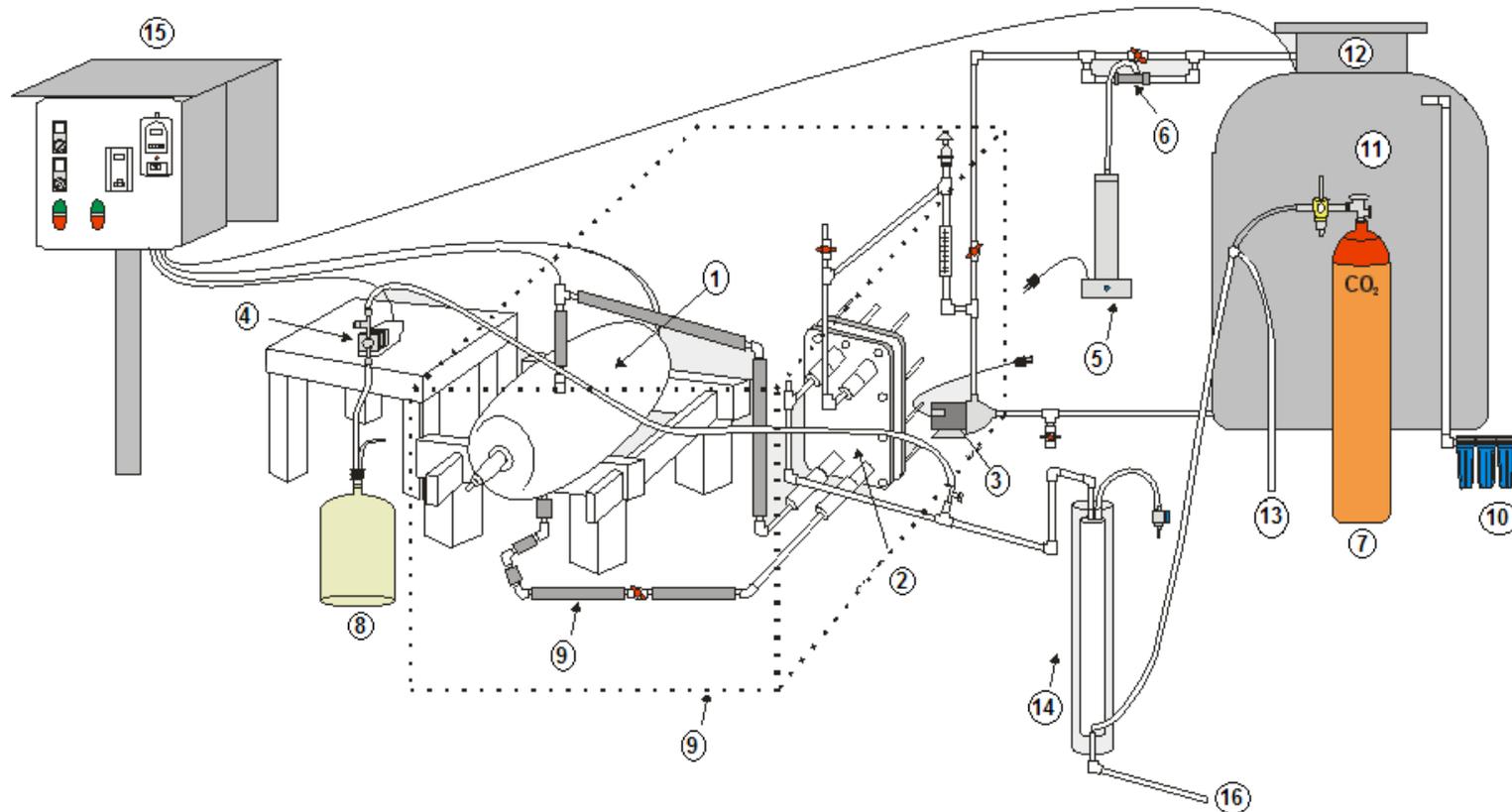
II.1.3 Tratamiento del agua

Para el mantenimiento de las cepas y cultivos en matraces Fernbach se utilizó el agua de mar proveniente del sistema cerrado del laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, se filtró a través de una serie de cartuchos de 10, 5 y 1 μm , se irradió con luz ultravioleta y se esterilizó en una autoclave a 121°C y a una presión de 1.05 kg cm^{-2} durante 15 minutos. Para los cultivos en garrafones de 20 l, el agua fue desinfectada empleando la técnica recomendada por Hemerick (1973), que consiste en añadir hipoclorito de sodio al 5% (blanqueador comercial) al agua de mar (3 ml l^{-1}), dejando actuar al cloro durante 24 horas, para posteriormente neutralizarlo con 150 mg de tiosulfato de sodio por litro de agua y con aireación profusa.

II.1.4 Descripción del Sistema de Cultivo Continuo

El sistema de cultivo continuo de las tres especies microalgales constó básicamente de dos secciones integradas, una de tratamiento del agua y otra de cultivo. La primera sección consistió de un depósito de agua marina de 2000 l, filtrada con filtros de cartucho de polipropileno de 20, 10 y 5 μm y abastecido directamente de la red de distribución del sistema cerrado del Departamento de Acuicultura del CICESE. Enseguida, una bomba abasteció de agua marina al sistema de tratamiento, donde se esterilizó y se le adicionaron los nutrientes y el CO_2 necesarios para el óptimo crecimiento de las microalgas. Para esterilizar el agua de mar se utilizó un generador de ozono por luz UV de 40 watts (marca ClearWater, modelo S-1200) el ozono se inyectó con un venturi instalado en el retorno del flujo sobrante que entraba de nueva cuenta al depósito de 2000 l. Enseguida el agua se dirigió a un tanque de 100 l, equipado con una resistencia de 3000 watts para calentarla a 93°C, a continuación el agua pasó por un intercambiador de calor de placas de titanio

(marca Alfa Laval) para reducir su temperatura antes de entrar a las bolsas de cultivo, el calor recuperado en este proceso sirvió para precalentar el agua que entró al tanque de calentamiento. Posteriormente, el agua pasó por un tubo de vidrio donde se le agregó CO₂ (para mantener el pH entre 7.5 y 8.5). Un depósito de vidrio de 20 l, sirvió para contener los nutrientes que se abastecieron al sistema de cultivo (medio de cultivo para microalgas f/2, Pro-Line, Origen), a través de una bomba de diafragma (Pulsafeeder, Aquatic Ecosystem), de tal manera que siempre se suministrara medio f/2 a las bolsas. Para el caso de la diatomea *C. muelleri*, los silicatos se agregaron directamente en las bolsas de forma semanal. El tanque de 100 l y el intercambiador de calor fueron encerrados en una caja aislante, para evitar pérdidas de calor. Todo el sistema estuvo conectado a un tablero electrónico como medida de seguridad, de modo que si la temperatura excedía los 95°C, el pasteurizador perdía agua o el tanque de 2000 l se vaciaba, el sistema se apagaba (Figura 1).



DIBUJO: Tec. Francisco Valenzuela Buriel

Figura 1. Diagrama del sistema de cultivo continuo de microalgas. Sección de tratamiento de agua de mar por pasteurización. 1) Pasteurizador; 2) Intercambiador de calor; 3) Bomba; 4) Bomba peristáltica; 5) Ozonificador; 6) Venturi; 7) Cilindro de CO₂; 8) Garrafón con nutrientes; 9) Aislante; 10) Filtros de cartucho de polipropileno; 11) Tinaco de 2 m³; 12) Flotador; 13) Manguera; 14) Intercambiador de CO₂; 15) Tablero electrónico de control; 16) Agua marina tratada.

En la segunda sección se realizó el cultivo continuo de las tres especies microalgales: *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Chaetoceros muelleri* (tres tratamientos y tres repeticiones), se instalaron 27 bolsas de polietileno de 40 cm de diámetro, 250 cm de altura y un volumen aproximado de 288 l, distribuidas en 3 bloques de 9 bolsas cada uno y colocadas en posición vertical, el cultivo tuvo una duración de 60 días. Cada bolsa se sostuvo con una reja cilíndrica de alambre de acero recubierto de plástico. Con la finalidad de evitar pliegues en la base de cada bolsa se colocaron estructuras de fibra de vidrio o concreto de forma piramidal. A cada bolsa se le hicieron 4 perforaciones pequeñas, 2 en la parte superior, una para la entrada constante del medio de cultivo y la otra para la cosecha y 2 en la parte inferior, una para la aireación y otra para el suministro directo de CO₂ (de 15 a 20 minutos por bolsa al día).

Las bolsas se perforaron con el cuidado necesario para mantenerlas estériles, con la ayuda de una punta metálica estéril, lo que facilitó la inserción del tubo de vidrio estéril, correspondiente a las entradas o salidas de la bolsa. El medio de cultivo entró a la bolsa a través de una manguera de silicón, conectada a la punta de vidrio que penetró directamente en la bolsa. De igual forma se hizo para la cosecha y para la aireación de los cultivos. Las tuberías de vidrio de distribución de agua de mar y las conexiones hidráulicas se lavaron semanalmente con vapor, para reducir el crecimiento de bacterias y protozoarios.

Para cada microalga se evaluaron 3 factores de dilución (tratamientos), que corresponden a un tiempo de residencia de 5, 7 y 9 días. El factor de dilución se calculó dividiendo el volumen extraído al día entre el volumen total de la bolsa. La cantidad de inóculo para cada bolsa de cultivo fue de 6 litros (que resultó en aproximadamente 145,000, 100,000 y 135,000 cél·ml⁻¹ para *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Chaetoceros muelleri*, respectivamente), aproximadamente una tercera parte del inóculo contenido en un botellón de vidrio de 20 l, de tal forma que una de las tres repeticiones de cada tratamiento se inocularon con las microalgas del mismo garrafón. El inóculo se agregó a las bolsas de cultivo cuando tenían 2/3 del volumen total de medio de cultivo.

El sistema se construyó en una de las plataformas del CICESE, por lo que se mantuvo a la intemperie, únicamente fue protegido en la parte superior por una malla sombra de 95% de reducción solar para homogenizar la cantidad de luz en las bolsas de cultivo, cada columna se iluminó además con una lámpara de luz fluorescente blanca de 40W (Figura 2).

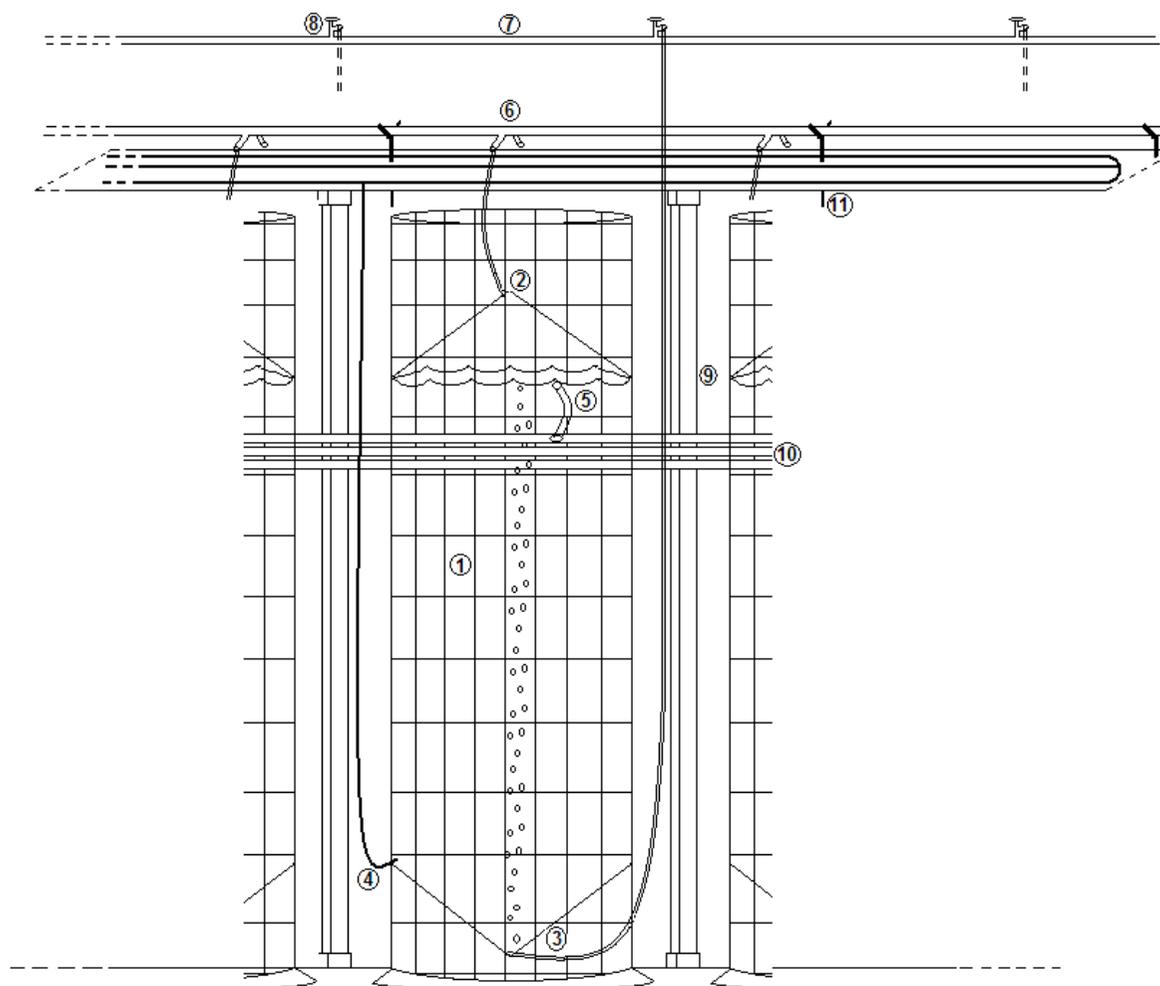


Figura 2. Diagrama del sistema de cultivo continuo de microalgas. Sección del cultivo en bolsas: 1) Bolsa de plástico de 288 l; 2) Entrada de medio de cultivo; 3) Entrada de aire; 4) Entrada de CO₂; 5) Salida de microalgas; 6) Tubo de distribución de medio; 7) Tubos de distribución de aire; 8) Llaves de bronce para aireación; 9) Lámparas; 10) Tubos de cosecha, 11) Tornillos sin fin y sujetadores.

II.2 Evaluación de la biomasa producida

Para evaluar el desarrollo de las microalgas en el sistema continuo se estimó la biomasa producida por dos métodos: a) conteo celular y b) cuantificación del peso seco.

II.2.1 Conteo Celular

Para conocer el número de células de cada una de las microalgas se realizaron curvas de calibración, relacionando la densidad óptica con el número de células en una muestra. Para cuantificar la densidad óptica se usó un espectrofotómetro para placas multipozo AD L200, marca Bekman Coutler, a una longitud de onda de 679 nm y empleando 350 µl de muestra por pozo. Para el conteo celular se empleó un microscopio óptico marca Wesco, modelo Bio VU 2500 y una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad marca Hausser Scientific. Para evaluar el crecimiento diario de las microalgas en cada condición experimental diariamente se registraron los valores de absorbencia a 679 nm y luego se relacionaron con el número de células por mililitro a través de los datos obtenidos en la curva de calibración.

II.2.2 Cuantificación del peso seco

Para cuantificar la biomasa con base en el peso seco, durante el experimento se recolectaron tres muestras (por triplicado), una cada 15 días (punto A, B y C), cada muestra consistió de una alícuota de 30 ml de los cultivos, la primera muestra se recolectó a los 13, 14 y 15 días de iniciado el cultivo, para *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Chaetoceros muelleri*, respectivamente. Las muestras se centrifugaron en tubos falcon de 15 ml a 4500 rpm y se congelaron a -20 °C hasta el momento de su análisis. Para cuantificar el peso seco, las muestras se filtraron a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro (previamente lavados, incinerados en una mufla a 490 °C y pesados), entonces se lavaron con formiato de amonio al 3% para eliminar los residuos de sales del agua de mar. Los filtros con la muestra se colocaron en una estufa a 60 °C por 24 horas para obtener el peso seco total.

II.3 Registro de parámetros ambientales

Diariamente se registró la temperatura de los cultivos con un termómetro digital marca Extech, de igual forma se tomaron registros diarios de los valores del pH de cada una de las bolsas con un potenciómetro marca Orión, modelo 210 y la irradiancia en los cultivos se registró cada 10 días, a las 8, 12, 16 y 20 horas con un irradiómetro marca Fisher Scientific Traceable.

II.4 Cuantificación de ácidos grasos

Para evaluar los ácidos grasos de las microalgas cultivadas se realizaron tres muestreos a lo largo del experimento (de igual forma y al mismo tiempo que para la cuantificación del peso seco). En cada muestreo se colectaron 730 ml de cada cultivo para cuantificar la composición y el contenido de ácidos grasos de *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*. Para *Nannochloropsis oculata* se recolectaron 660 ml. Estas muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 15 minutos a 4 °C para concentrar las microalgas y obtener la biomasa necesaria para los análisis, posteriormente las muestras fueron congeladas hasta el momento de su análisis.

II.4.1 Análisis de Ácidos Grasos

Para la extracción de lípidos se adoptó el método de Bligh y Dier (1959). La extracción de ácidos grasos se realizó con hexano grado HPLC y la cuantificación por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas. La fase lipídica extraída se secó con nitrógeno gaseoso, se sometió a metanólisis con 5% de HCl en metanol durante 2.5 horas en baño maría a 85 °C (Sato y Murata, 1988). El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, de la Ciudad de La Paz, Baja California, Sur.

Para el análisis de los resultados los ácidos grasos se agruparon en saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) y altamente insaturados (AGAI) (ácido docosahexaenóico, DHA; eicosapentaenóico, EPA y araquidónico, ARA, puesto que son los más importantes en la nutrición larval de organismos marinos).

II.5 Parámetros poblacionales

Para calcular la tasa del crecimiento de cada una de las especies de microalgas estudiadas se utilizó la ecuación descrita por Ricica (1966), tomando en consideración los intervalos entre los puntos de muestreo.

$$\mu = \log_2(X_2) - \log_2(X_1) / (t_2 - t_1) + FD \quad (1)$$

Donde:

- μ = Tasa de crecimiento específica
- X_2 = Número de células en el tiempo t_2
- X_1 = Número de células en el tiempo t_1
- $t_2 - t_1$ = Tiempo transcurrido entre muestreos sucesivos
- FD = Factor de dilución

Se utilizaron logaritmos en base dos porque se consideran los más apropiados para representar el crecimiento de organismos con una reproducción de tipo binaria (Palleroni, 1970).

II.6 Análisis Estadístico

Para contrastar las diferencias del crecimiento y de la calidad bioquímica entre los diferentes factores de dilución y los puntos de muestreo para una misma especie de microalga, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. En los casos en los que se encontraron diferencias significativas, se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Duncan, con un nivel de significancia de 0.05, mediante el programa de cómputo Statistica, versión 6 para Windows.

III. RESULTADOS

III.1 Regulación de los factores de dilución (Flujos de agua)

Los factores de dilución de los cultivos y sus flujos correspondientes fueron regulados para obtener tiempos de residencia de 5, 7 y 9 días (el tiempo necesario para agregar un volumen equivalente al del medio de cultivo contenido en una bolsa) (Tabla I).

Tabla I. Factores de dilución para los cultivos experimentales de *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Chaetoceros muelleri* en un sistema de cultivo continuo.

Valores teóricos o esperados			Valores experimentales u observados		
Días de residencia	Factor de dilución	Flujo ml·min ⁻¹ bolsa	Días de residencia	Factor de dilución	Flujo ml·min ⁻¹ bolsa
5	0.20	40.03	4.82±0.17	0.21	41.5±1.21
7	0.14	28.60	6.65±0.14	0.15	30.1±1.39
9	0.11	22.24	9.44±0.11	0.11	21.2±1.78
Volumen de las bolsas de cultivo = 288 ± 3.11 l					

III.2 Temperatura

La temperatura promedio de los cultivos en los primeros 30 días de experimento fue de 24.9 °C ± 0.32, en los siguientes 30 días se registró una temperatura promedio de 25.6 °C ± 0.15.

III.3 pH

Para el análisis del pH los valores registrados durante el cultivo se dividieron en 4 fases, la primera incluyó desde el momento de la inoculación hasta el punto de muestreo A, la segunda incluyó los valores obtenidos del punto de muestreo A al B, la tercera del punto de muestreo B al C y, finalmente, la cuarta última fase del cultivo incluyó los valores obtenidos del punto C al día 60 de cultivo.

Los valores más bajos de pH se registraron en la primera fase de cultivo (del inóculo hasta el punto de muestreo A). Del punto de muestreo A hasta el día 60 de cultivo, los valores de pH variaron de 8.46 ± 0.20 a 9.44 ± 0.33 , los valores más altos se registraron en los cultivos de *Nannochloropsis oculata*. Los valores de pH se mantuvieron sin diferencias entre las microalgas de la misma especie cultivadas con diferentes factores de dilución (Tabla II)

Tabla II. Valores promedio del pH durante los 60 días de cultivo continuo de *Isochrysis* sp (ISX), *Nannochloropsis oculata* (NNX) y *Chaetoceros muelleri* (CHX), divididos en 4 fases de la curva de crecimiento.

Especie	Factor de dilución	pH			
		Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
ISX	0.11	8.59 ± 0.28	8.77 ± 0.15	8.84 ± 0.14	8.79 ± 0.28
ISX	0.15	8.64 ± 0.25	8.82 ± 0.02	8.95 ± 0.16	8.80 ± 0.25
ISX	0.21	8.44 ± 0.49	8.79 ± 0.18	8.97 ± 0.06	8.84 ± 0.49
NNX	0.11	9.00 ± 0.36	9.24 ± 0.14	9.25 ± 0.03	9.05 ± 0.36
NNX	0.15	8.95 ± 0.37	9.18 ± 0.22	9.44 ± 0.33	9.16 ± 0.37
NNX	0.21	8.59 ± 0.61	9.02 ± 0.21	9.34 ± 0.18	9.31 ± 0.61
CHX	0.11	8.73 ± 0.20	9.18 ± 0.13	8.80 ± 0.17	8.46 ± 0.20
CHX	0.15	8.71 ± 0.45	9.02 ± 0.12	9.09 ± 0.26	8.48 ± 0.45
CHX	0.21	8.47 ± 0.54	8.84 ± 0.23	8.89 ± 0.18	8.57 ± 0.54

III.4 Intensidad luminosa

En virtud de que el cultivo se realizó al exterior, la cantidad de luz fue un parámetro que varió diariamente y a cada momento, por lo que los registros son heterogéneos. Se registró la menor cantidad de luz en los cultivos el día 33, con un promedio de 23.15×10^3 lux, el día 3 fue el de mayor intensidad de luz, con un promedio de 56.03×10^3 lux (Tabla III).

Tabla III. Intensidad luminosa promedio (lux) en 4 diferentes horas del día en un sistema de cultivo continuo de microalgas.

Día de cultivo	Intensidad luminosa				Promedio
	Lux (x 10 ³)				
	8:00 hrs	12:00 hrs	16:00 hrs	20:00 hrs	
3	42.88±0.10	98.51±0.15	76.74±0.14	6.01±0.36	56.03
13	37.23±0.34	88.23±0.23	78.67±0.21	5.89±0.22	52.51
23	47.34±0.10	76.04±0.18	69.13±0.11	6.15±0.20	49.66
33	26.28±0.31	33.08±0.34	27.27±0.39	5.95±0.33	23.15
43	38.24±0.24	87.23±0.21	73.43±0.32	6.03±0.27	51.23
53	20.33±0.29	73.04±0.37	61.67±0.28	5.95±0.19	40.25

III.5 Evaluación de la biomasa producida

III.5.1 *Isochrysis* sp.

III.5.1.1 Conteo celular

El coeficiente de correlación de la regresión lineal que relaciona la densidad óptica (DO=absorbencia a 679nm) con la densidad celular (DC=número de células por mililitro) fue alto ($r^2=0.99$), lo que permite realizar interpolaciones muy confiables entre 16.1×10^6 y 97×10^3 cél·ml⁻¹ (Figura 3). La ecuación de la regresión obtenida fue la siguiente:

$$DC = 17882262.57 (DO) - 587817.63 \quad (2)$$

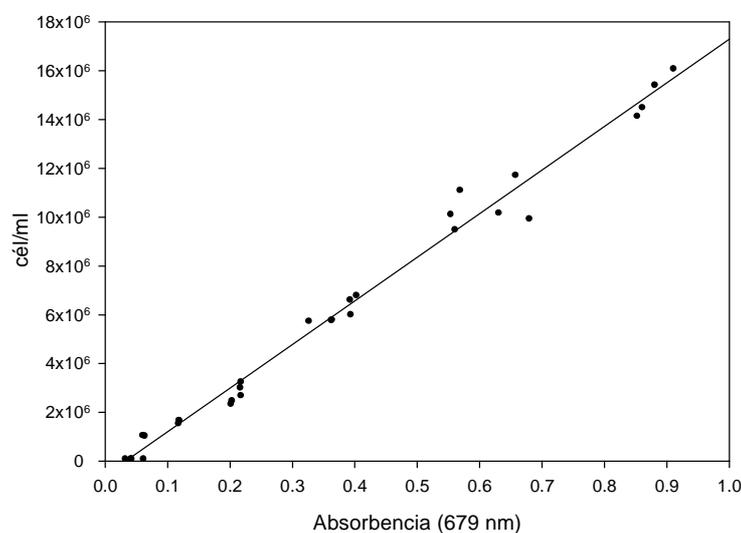


Figura 3. Curva de calibración para la absorbencia a 679 nm y el número de $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *Isochrysis sp.*

III.5.1.2 Crecimiento

La microalga *Isochrysis sp.* cultivada con un factor de dilución de 0.11 durante 60 días, creció rápidamente hasta el día 14, cuando alcanzó la máxima densidad celular de $5.02 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$, sin embargo las muestras para los diferentes análisis propuestos, se tomaron un día antes, cuando se registró una densidad de $4.61 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ y una tasa de crecimiento de 5.1 respecto al día de la inoculación. A partir del día 14 se observó un lento pero gradual crecimiento hasta llegar a una fase estable aparente al día 40 de cultivo, con una densidad de $7.14 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$, donde se observó que la tasa de crecimiento registrada entre los días 43 al 60 de cultivo se acercaba al factor de dilución (Tabla IV, Figura 4).

El crecimiento de *Isochrysis sp.* cultivada con un factor de dilución de 0.15 fue muy similar al anterior, con una tasa de crecimiento de 4.56 en el día 13 respecto al día de la inoculación, luego las microalgas siguieron creciendo gradualmente hasta alcanzar una densidad de $4.27 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ en el día 28 de cultivo, la máxima densidad se registró en el día 40, con $5.50 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$, a partir del cual se observó una disminución de la tasa de crecimiento, luego es notable una fase de estabilización aparente, y posteriormente también se obtienen tasas de crecimiento muy cercanas a la tasa de dilución (Figura 4)

Finalmente, el crecimiento de *Isochrysis* sp. con una tasa de dilución de 0.21 alcanzó su fase estable a partir del día 26, más rápido que con los factores de dilución de 0.11 y 0.15, sin embargo, a partir del día 43 de cultivo, se observó una disminución en el crecimiento hasta que entró a una nueva fase de equilibrio.

Tabla IV. Concentración celular promedio (cél·ml⁻¹) y tasa de crecimiento (μ) entre los puntos de muestreo de *Isochrysis* sp. cultivada en un sistema continuo con un factor de dilución de 0.11, 0.15 y 0.21. En paréntesis se indica la desviación estándar.

Tiempo (días)	Concentración cél·ml ⁻¹ x 10 ⁶	Tasa de crecimiento μ
Factor de dilución 0.11		
1	0.15	
13	4.61 (0.38)	5.10
28	5.85 (0.39)	0.34
43	6.72 (0.42)	0.24
60	6.74 (0.08)	0.11
Factor de dilución 0.15		
1	0.15	
13	3.18 (0.49)	4.56
28	4.27 (0.51)	0.53
43	5.07 (0.55)	0.36
60	5.38 (0.89)	0.17
Factor de dilución 0.21		
1	0.15	
13	2.89 (0.36)	4.53
28	4.03 (0.96)	0.69
43	4.37 (2.07)	0.32
60	3.25 (1.01)	0

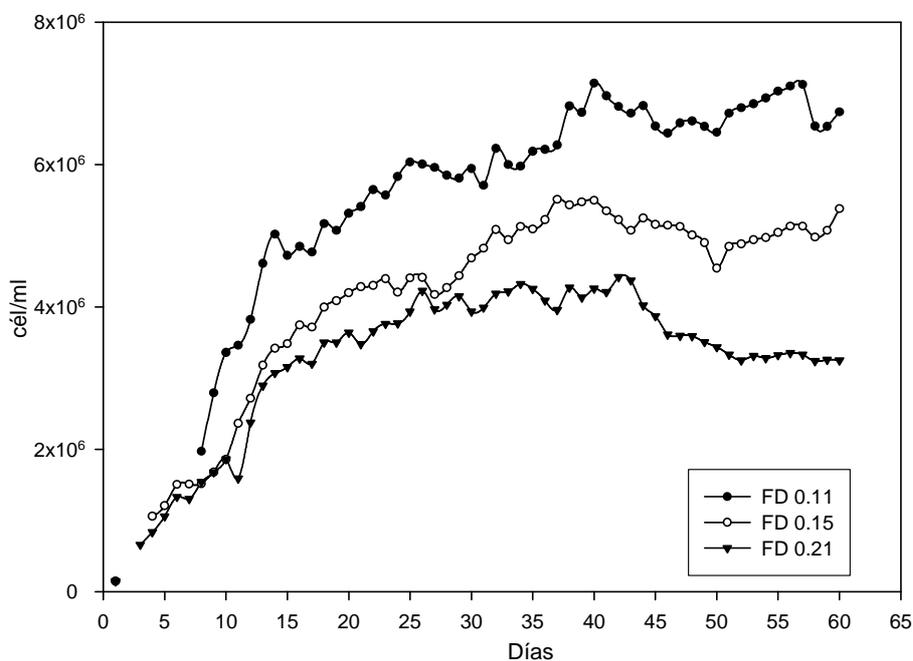


Figura 4. Curvas de crecimiento de *Isochrysis* sp. cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución (Valores promedio, FD: factor de dilución).

III.5.2 *Nannochloropsis oculata*.

III.5.2.1 Conteo celular

El coeficiente de correlación de la regresión lineal que relaciona la densidad óptica (absorbencia a 679 nm) con la densidad celular (DC=número de células por mililitro) de *N. oculata* también fue alto ($r^2=0.99$), lo anterior permite realizar una interpolación de los valores de densidad óptica y el número de células para esta especie entre los valores de 27.8×10^6 y 7.6×10^3 $\text{cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Figura 5). La ecuación de la regresión obtenida fue la siguiente:

$$\text{DC} = 38256078.49 (\text{DO}) - 1608167.63 \quad (3)$$

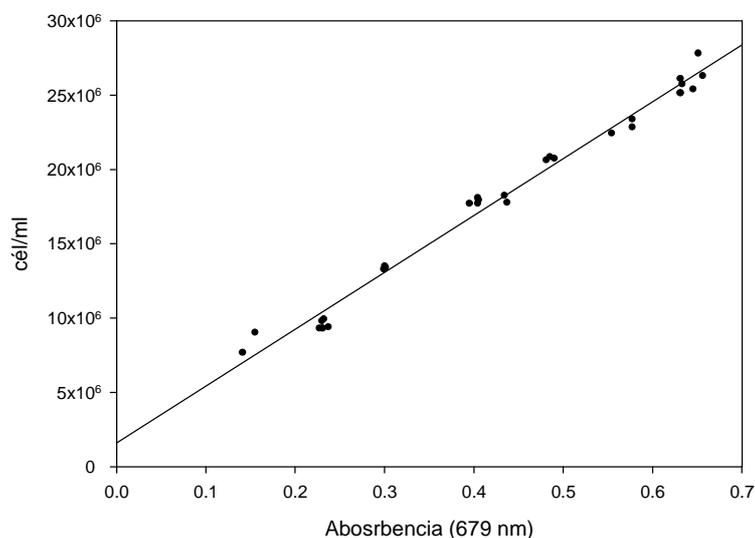


Figura 5. Curva de calibración para la absorbancia a 679 nm y el número de $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ mililitro para *Nannochloropsis oculata*.

III.5.2.1.2 Crecimiento

El cultivo de esta especie con una tasa de dilución de 0.11 mostró un proceso de crecimiento rápido y de larga duración. En el primer muestreo (día 14) se registró una tasa de crecimiento de 7.42 respecto al primer día de cultivo, y una densidad de $15.91 \times 10^6 \text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$. Después, las microalgas siguieron creciendo paulatinamente, el día 29 se registró una tasa de crecimiento de 0.70. El máximo crecimiento se registró al día 40 de cultivo cuando alcanzó una densidad de $27.61 \times 10^6 \text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$, a partir de este punto tuvo un ligero decline el cual puede considerarse como el inicio de una fase estable, con una tasa de crecimiento muy cercana al factor de dilución (Tabla V, Figura 6).

El crecimiento con un factor de dilución de 0.15 propició una tasa de crecimiento de 7.23 al día 14 de cultivo, con una densidad aproximada de $13.55 \times 10^6 \text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$. Las microalgas continuaron con su proceso de crecimiento hasta el día 40, cuando se observó la mayor densidad celular, con $21.97 \times 10^6 \text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$. A partir de este punto, se registró una ligera disminución del crecimiento, la cual se puede considerar como el inicio de la fase estable (Figura 6).

Por último, se observó un comportamiento muy parecido en la cinética de crecimiento de esta especie cuando se utilizó una tasa de dilución de 0.21, la fase estable se observó el día 29 de cultivo y se registró una densidad celular de 16.74×10^6 cél·ml⁻¹. A partir de este punto, se observó una ligera disminución en la densidad, que podría considerarse como el inicio de un estado estable (Figura 6).

Tabla V. Concentración celular promedio (cél·ml⁻¹) y tasa de crecimiento (μ) en los puntos de muestreo de *Nannochloropsis oculata* cultivada en un sistema continuo con un factor de dilución de 0.11, 0.15 y 0.21. En paréntesis se indica la desviación estándar.

Tiempo	Concentración cél·ml ⁻¹ x 10 ⁶	Tasa de crecimiento μ
Factor de dilución 0.11		
1	0.10	
14	15.91 (2.48)	7.42
29	23.99 (3.20)	0.70
44	24.53 (2.83)	0.24
60	25.29 (1.07)	0.05
Factor de dilución 0.15		
1	0.10	
14	13.55 (1.20)	7.23
29	17.52 (1.95)	0.52
44	21.73 (4.18)	0.46
60	20.22 (2.24)	0.05
Factor de dilución 0.21		
1	0.10	
14	12.02 (3.52)	7.12
29	16.74 (4.64)	0.68
44	15.54 (4.86)	0.10
60	15.61 (5.74)	0.21

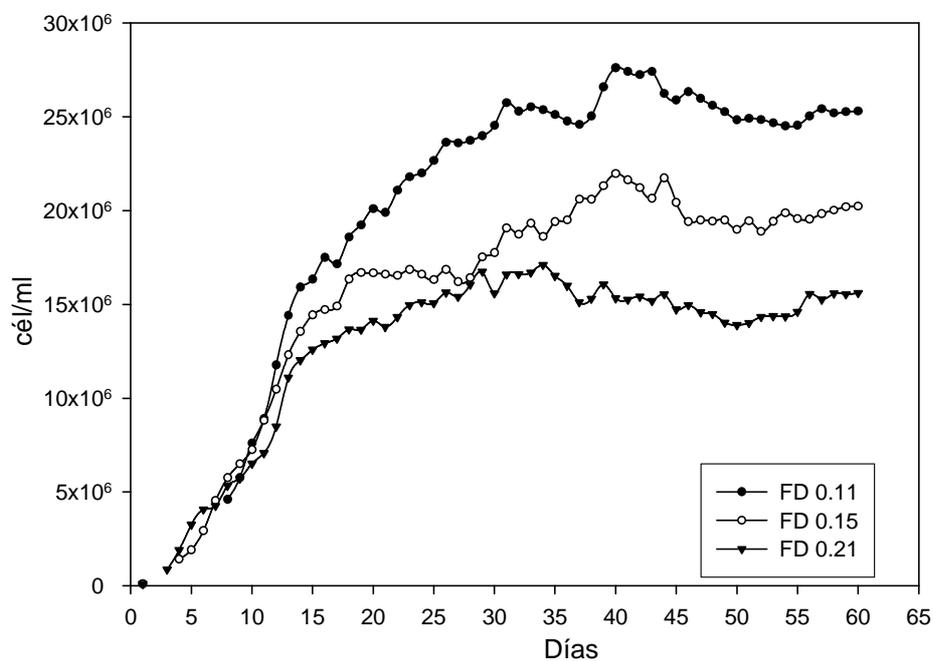


Figura 6. Curvas de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución (Valores promedio, FD: Factor de dilución).

III.5.3 *Chaetoceros muelleri*

III.5.3.1 Conteo celular

El coeficiente de correlación obtenido en la regresión lineal que relaciona la densidad óptica (absorbencia a 679 nm) con la densidad celular (DC=número de células por mililitro) para *C. muelleri* fue de 0.98 (Figura 7). Esto permite realizar interpolaciones confiables entre 2.3×10^5 y 1.8×10^3 cél·ml⁻¹. La ecuación de la regresión obtenida fue la siguiente:

$$DC = 5804121.82 (DO) - 54488.03$$

(4)

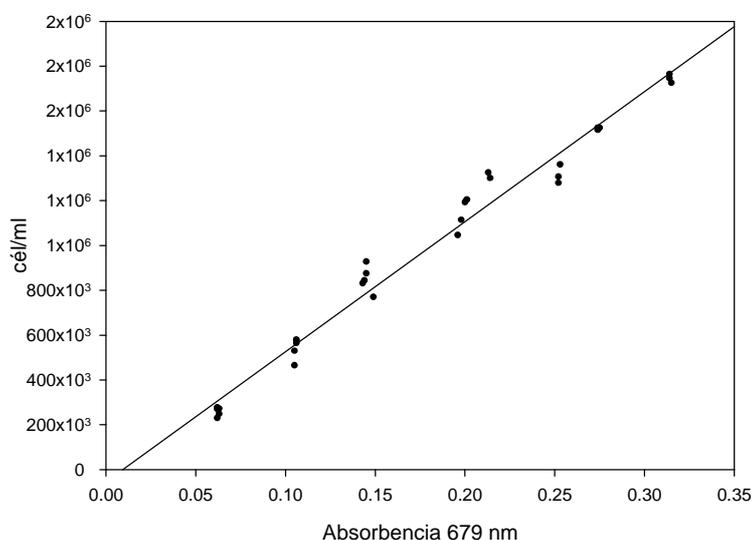


Figura 7. Curva de calibración para la absorbencia a 679 nm y el $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *Chaetoceros muelleri*

III.5.3.2 Crecimiento

El crecimiento de esta especie con un factor de dilución de 0.11 tuvo una tasa de crecimiento de 3.04 en el primer muestreo (día 15 de cultivo), y una densidad de 1.03×10^6 $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tabla VI, Figura 8). La máxima densidad se registró en el día 25 con 1.43×10^6 $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$, a partir de este punto el cultivo empezó a decaer y no se observó la fase estable. Al emplear la tasa de dilución de 0.15 el comportamiento fue el mismo, la tasa de crecimiento al día 15 fue de 3.30, con una densidad de 1.20×10^6 $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$. Luego, el cultivo siguió creciendo y alcanzó su máxima densidad el día 22 con 1.49×10^6 $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$. A partir de este punto, la densidad empezó a disminuir hasta el día 35 donde se observa una fase estable durante 5 días, después de los cuales volvió a disminuir. Finalmente, para el cultivo con una tasa de dilución de 0.21 se registró una tasa de crecimiento de 3.07 para el día 15 de cultivo y la mayor densidad se registró el día 27, con 1.32×10^6 $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$, a partir de este punto, la tasa de crecimiento y la densidad se redujeron en forma paulatina (Figura 8).

Tabla VI. Concentración celular promedio (cél·ml⁻¹) y tasa de crecimiento (μ) de *Chaetoceros muelleri* cultivada en un sistema continuo con un factor de dilución de 0.11, 0.15 y 0.21. En paréntesis se indica la desviación estándar.

Tiempo (días)	Concentración cél·ml⁻¹ x 10⁶	Tasa de crecimiento μ
Factor de dilución 0.11		
1	0.14	
15	1.03 (0.41)	3.04
30	1.04 (0.41)	0.12
45	0.68 (0.13)	0
Factor de dilución 0.15		
1	0.14	
15	1.20 (0.29)	3.30
30	1.37 (0.94)	0.34
45	0.68 (0.93)	0
Factor de dilución 0.21		
1	0.14	
15	0.98 (0.44)	3.07
30	1.15 (0.19)	0.43
45	0.76 (0.12)	0

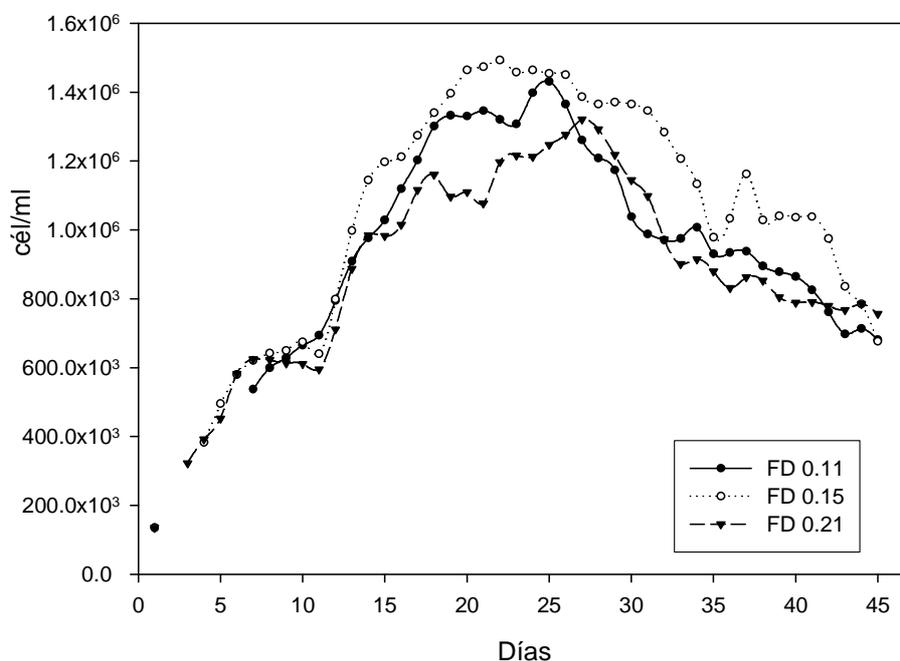


Figura 8. Curva de crecimiento de *Chaetoceros muelleri* cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución (Valores promedio, FD: Factor de dilución).

III.6 Cuantificación del peso seco

Al comparar la cantidad de biomasa producida en los cultivos de *Isochrysis* sp. entre los diferentes factores de dilución y los puntos de muestreo, se encontró que la mayor producción se obtuvo en los puntos de muestreo B y C, con los factores de dilución de 0.15 (3.32 y 3.68 g·día⁻¹ respectivamente) y 0.21 (3.12 y 3.27 g·día⁻¹ respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre estos cuatro puntos. ($p < 0.05$) (Tabla VII).

Por otra parte, para *N. oculata* se encontró que los factores de dilución de 0.21 y 0.15 en el punto de muestreo B, produjeron 7.36 y 7.18 g·día⁻¹ de biomasa respectivamente, cantidad significativamente mayor ($p < 0.05$) a la obtenida con los otros factores de dilución.

Finalmente, para *Chaetoceros muelleri* también se observó una mayor producción de biomasa al cultivarla con el factor de dilución de 0.21 y 0.15. Para el primer factor de dilución, en los puntos de muestreo A y B se encontró una producción de 3.69 y 3.57 g·día⁻¹. Con el factor de dilución de 0.15 en el punto de muestreo A, se registró una producción de 3.12 g·día⁻¹, sin embargo, no se encontraron diferencias entre estos tres puntos de muestreo ($p < 0.05$).

Tabla VII. Producción de biomasa de *Isochrysis* sp. (ISX), *Nannochloropsis oculata* (NNX) y *Chaetoceros muelleri* (CHX) en un sistema de cultivo continuo con tres diferentes factores de dilución en los diferentes puntos de muestreo.

Especie	Punto de muestreo	Factor de dilución		
		0.11	0.15	0.21
ISX	A	2.33 ^a	2.27 ^{ab}	2.83 ^{abc}
	B	2.96 ^{abc}	3.32 ^b	3.68 ^c
	C	2.88 ^{ab}	3.12 ^{abc}	3.27 ^{abc}
NNX	A	4.31 ^a	5.05 ^a	6.41 ^{ab}
	B	5.60 ^{abcd}	7.18 ^{bcd}	7.36 ^{cd}
	C	5.08 ^{ab}	5.71 ^{bcd}	5.52 ^{bcd}
CHX	A	2.18 ^a	3.12 ^{bc}	3.69 ^c
	B	1.90 ^a	2.93 ^b	3.57 ^{bc}

Letras diferentes indican diferencias ($p \leq 0.05$).

NOTA: Las comparaciones se hicieron entre factores de dilución y puntos de muestreo para cada especie en particular.

III.7 Cuantificación de ácidos grasos

III.7.1 *Isochrysis* sp.

La clase más abundante de ácidos grasos encontrados fue la de los AGPI, con un contenido de 41.35 a 49.06% del total de los ácidos grasos, con concentraciones que variaron de 77.45 a 99.80 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco (PS). La concentración promedio (de los diferentes muestreos), fue más alta con la dilución mayor (86.39 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$). El AGPI más abundante fue el DHA. Le siguió en abundancia la clase de los AGS con contenidos de 31.04 a 35.04%, con concentraciones que variaron de 49.38 a 68.84 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS, siendo la concentración promedio alrededor de 56 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS. Finalmente la clase de ácidos grasos menos abundantes fue la de los AGMI con contenidos de 19.77 a 23.60%, en este caso las concentraciones obtenidas variaron de 31.73 a 55.67 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS, siendo la concentración promedio alrededor de 38 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS (Tabla VIII).

Tabla VIII. Contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) de *Isochrysis* sp. cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (A, B, C). Los valores expresan el promedio de la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) y el porcentaje (%). En paréntesis se indica la desviación estándar. Letras o números diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), FD: Factor de dilución.

AG		FD 0.11		FD 0.15		FD 0.21	
		%	Mg	%	μg	%	μg
AGS	A	32.49 ¹ (0.78)	57.90 ^a (0.49)	35.04 ¹ (3.45)	64.79 ^a (3.37)	32.38 ¹ (0.44)	68.84 ^a (27.86)
	B	31.68 ¹ (1.25)	54.89 ^a (7.53)	30.83 ¹ (2.45)	49.38 ^a (11.68)	32.28 ¹ (0.71)	51.34 ^a (10.46)
	C	31.04 ¹ (1.04)	49.71 ^a (5.02)	31.95 ¹ (0.72)	52.28 ^a (9.65)	31.38 ¹ (0.42)	53.83 ^a (19.89)
	\bar{x}	31.74	54.17	32.61	55.48	32.01	58
AGMI	A	22.30 ¹ (0.90)	39.65 ^a (0.30)	23.60 ¹ (2.02)	43.65 ^a (1.71)	20.76 ¹ (1.15)	43.99 ^a (18.52)
	B	20.93 ¹ (0.69)	36.18 ^a (3.87)	20.67 ¹ (1.03)	33.03 ^a (6.93)	19.94 ¹ (1.23)	31.73 ^a (6.70)
	C	19.90 ¹ (0.75)	31.85 ^a (3.06)	19.77 ¹ (0.62)	32.33 ^a (5.92)	19.81 ¹ (0.44)	33.74 ^a (11.67)
	\bar{x}	21.04	35.89	21.35	36.34	20.17	40.38
AGPI	A	45.30 ¹ (1.70)	80.76 ^a (5.60)	41.35 ¹ (5.32)	77.77 ^a (18.21)	46.86 ¹ (1.59)	99.80 ^a (53.26)
	B	47.39 ¹ (1.38)	82.29 ^a (12.68)	48.50 ¹ (3.46)	77.45 ^a (15.38)	47.78 ¹ (2.44)	75.66 ^a (12.77)
	C	49.06 ¹ (0.40)	78.50 ^a (6.36)	48.29 ¹ (0.83)	79.34 ^a (17.19)	48.81 ¹ (0.52)	83.7 ^a (30.57)
	\bar{x}	47.25	80.52	46.05	78.19	47.82	86.39

NOTA: Las comparaciones se hicieron entre factores de dilución y muestreos para cada grupo de ácidos grasos en particular.

Tabla IX. Contenido promedio de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) de la microalga *Isochrysis* sp. cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y analizada en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (Muestras A, B y C). PS=Peso seco. En paréntesis se indica la desviación estándar.

AG	Factor de dilución			Factor de dilución			Factor de dilución		
	0.11			0.15			0.21		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
14:00	31.31(0.12)	29.35(4.60)	25.75(3.14)	34.79(2.67)	27.33(6.92)	27.78(4.90)	38.84(20.71)	29.02(6.09)	29.84(11.21)
15:00	1.14(0.05)	0.99(0.13)	0.96(0.14)	1.11(0.11)	0.93(0.28)	0.97(0.22)	1.02(0.58)	0.92(0.22)	0.92(0.36)
16:00	24.48(0.13)	23.79(3.06)	22.20(1.87)	27.85(0.78)	20.43(4.41)	22.59(4.38)	27.45(14.82)	20.60(3.89)	22.43(8.13)
18:00	0.40(0.05)	0.31(0.06)	0.25(0.01)	0.39(0.09)	0.20(0.06)	0.30(0.04)	0.34(0.14)	0.29(0.11)	0.34(0.18)
20:00	0.20(0.10)	0.15(0.05)	0.18(0.12)	0.28(0.12)	0.15(0.02)	0.23(0.05)	0.46(0.57)	0.18(0.07)	0.14(0.07)
22:00	0.37(0.15)	0.30(0.13)	0.37(0.16)	0.37(0.14)	0.34(0.08)	0.40(0.13)	0.73(0.77)	0.33(0.07)	0.16(0.12)
14:01	0.44(0.04)	0.29(0.02)	0.26(0.03)	0.42(0.06)	0.32(0.07)	0.34(0.12)	0.38(0.18)	0.34(0.10)	0.26(0.12)
16:01	13.14(0.01)	14.18(1.76)	12.92(1.00)	13.81(0.77)	12.66(3.41)	12.92(2.89)	14.42(7.54)	12.12(2.87)	12.72(4.65)
18:1 n9c	21.20(0.78)	17.37(1.43)	14.52(1.47)	24.83(0.80)	15.73(2.90)	14.93(1.98)	24.81(13.76)	15.44(2.94)	16.77(5.33)
18:1 n7c	2.63(0.22)	2.59(0.37)	2.65(0.46)	2.80(0.27)	2.46(0.39)	2.49(0.49)	2.47(1.36)	1.99(0.42)	2.01(0.80)
20:1 n9	1.90(0.17)	1.45(0.41)	1.10(0.13)	1.37(1.05)	1.62(0.41)	1.34(0.38)	1.59(1.30)	1.63(0.31)	1.77(0.71)
22:1 n9	0.35(0.07)	0.29(0.07)	0.40(0.17)	0.42(0.05)	0.25(0.09)	0.30(0.11)	0.32(0.18)	0.21(0.06)	0.22(0.07)
16:2 n6	0.47(0.04)	0.57(0.12)	0.57(0.01)	0.46(0.06)	0.57(0.12)	0.59(0.12)	0.42(0.23)	0.53(0.09)	0.60(0.03)
16:2 n4	0.30(0.06)	0.20(0.05)	0.15(0.04)	0.23(0.05)	0.21(0.03)	0.16(0.03)	0.34(0.21)	0.26(0.07)	0.26(0.10)
18:2 n6c	16.59(0.72)	15.30(1.11)	15.18(1.88)	17.24(2.83)	11.96(1.10)	12.29(1.42)	19.18(9.28)	12.62(1.44)	12.83(3.83)
18:3 n6	1.72(0.14)	2.02(0.36)	1.66(0.12)	1.76(0.34)	1.58(0.04)	1.48(0.10)	2.76(1.25)	1.99(0.28)	2.56(0.70)
18:3 n3	15.37(2.47)	18.33(4.44)	19.34(3.47)	12.69(9.71)	15.24(3.90)	19.44(4.70)	18.34(9.73)	14.76(3.23)	15.78(5.55)
18:4 n3	19.70(1.05)	21.29(5.81)	17.39(2.86)	17.44(2.98)	22.07(5.8)	21.03(5.11)	27.15(15.54)	21.38(3.88)	25.72(10.74)
20:4 n6	0.57(0.08)	0.42(0.03)	0.49(0.03)	0.42(0.07)	0.37(0.03)	0.40(0.04)	0.65(0.39)	0.48(0.07)	0.53(0.11)
20:5 n3	0.92(0.14)	1.00(0.23)	0.91(0.07)	0.94(0.15)	1.01(0.20)	1.06(0.22)	1.22(0.60)	1.10(5.22)	1.36(0.40)
22:5 n3	2.5(0.19)	2.70(0.50)	2.68(0.38)	2.81(0.22)	2.56(0.52)	2.39(0.59)	2.83(1.46)	2.27(0.44)	2.30(0.90)
22:6 n3	22.5(1.22)	20.45(4.00)	20.13(1.70)	23.79(1.94)	21.89(5.20)	20.49(5.18)	26.92(15.19)	20.27(3.16)	21.76(8.25)
DHA/EPA	24.66	20.50	22.17	25.22	21.70	19.28	22.14	18.42	15.99
EPA/ARA	4.47	6.39	5.46	6.72	6.87	5.97	4.33	4.77	4.36

Al realizar una comparación entre los AGS producidos con las diferentes diluciones, para los tres puntos de muestreo (puntos A, B y C de la curva) no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) debidas al factor de dilución ($p=0.8699$), al punto de muestreo ($p=0.20000$), ni en la interacción de estas variables ($p=0.9389$).

Al comparar los AGMI producidos con las diferentes diluciones, para los tres puntos de muestreo no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) debidas al factor de dilución ($p=0.9908$), al punto de muestreo ($p=0.0904$) ni en la interacción entre estas variables ($p=0.9426$).

Finalmente, al comparar los AGPI producidos con las diferentes diluciones, en los diferentes puntos de muestreo tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos debidas al factor de dilución ($p=0.7523$), al punto de muestreo ($p=0.78200$) ni en la interacción entre estas variables ($p=0.8779$).

Respecto a los AGPI, específicamente para los ácidos grasos altamente insaturados (AGAI), el DHA constituyó del 11.48 al 13.41 % del total de ácidos grasos y no se encontraron diferencias significativas entre las tres diluciones ni entre los tres muestreos ($p>0.05$). Le siguió el EPA con porcentajes de entre 0.4 y 0.88% y tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los diferentes factores de dilución en ningún muestreo. El contenido de ARA fue el más bajo de esta clase, con porcentajes de 0.21 a 0.39 % y tampoco se encontraron diferencias entre los diferentes factores de dilución y puntos de muestreo (Figura 9 y Tabla IX).

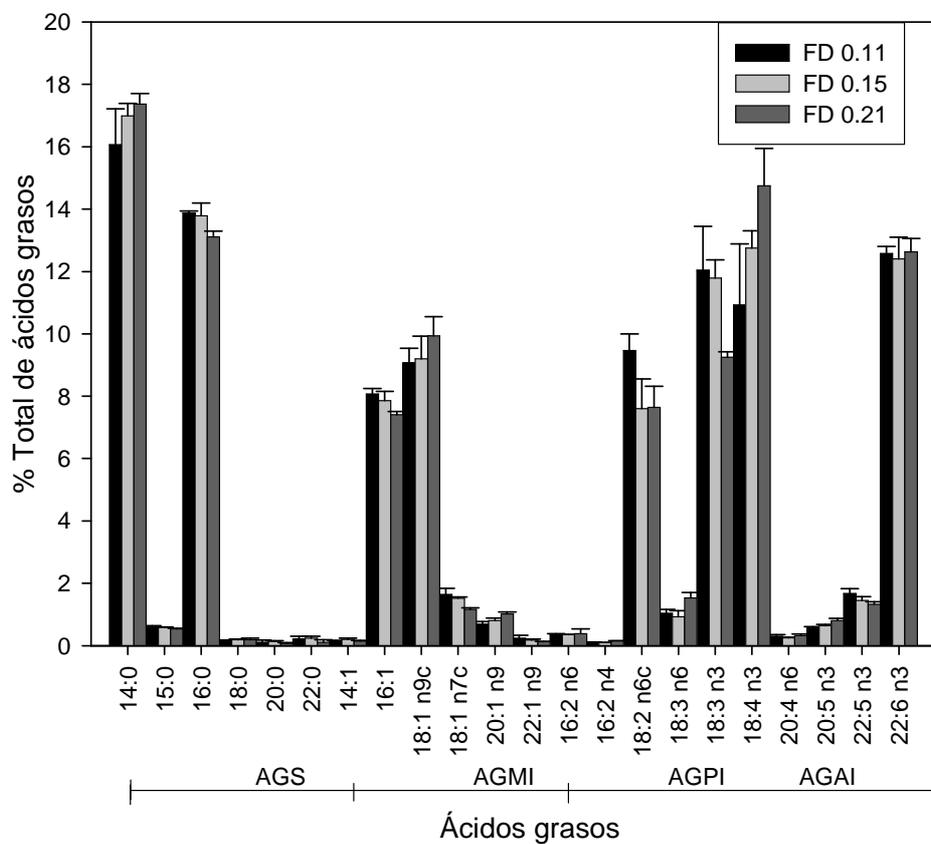


Figura 9. Porcentaje total promedio de los contenidos de ácidos grasos de *Isochrysis* sp. cultivada en forma continua en la fase estable de crecimiento. Las líneas horizontales indican la desviación estándar, FD: Factor de dilución, AGS: saturados, AGMI: monoinsaturados, AGPI: poliinsaturados, AGAI: altamente insaturados.

III.7. 2 *Nannochloropsis oculata*

La clase más abundante de ácidos grasos encontrados fue la de los AGPI con un contenido de 35.70 a 41.32% del total de los ácidos grasos, con concentraciones que variaron de 39.39 a 92.39 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS. La concentración promedio (de los diferentes muestreos), fue más alta con la dilución mayor (67.43 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS). Los AGPI más abundantes fueron el EPA y el ARA. Le siguió en abundancia la clase de los AGS con contenidos del 34.39 al 37.67%, con concentraciones que variaron de 35.25 a 90.27 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS, la concentración promedio fue más alta con la dilución mayor (66.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS). Finalmente la clase de ácidos grasos menos abundantes fue la de los AGMI con contenidos de 24.12 a 26.65%, la concentración promedio más alta fue con la dilución mayor (44.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS). (Tabla X)

Tabla X. Contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) de *Nannochloropsis oculata* cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (A, B, C). Los valores expresan el promedio de la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y el porcentaje (%). En paréntesis se indica la desviación estándar. Letras o números diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), FD: Factor de dilución.

AG	Muestreo	FD 0.11		FD 0.15		FD 0.21	
		%	μg	%	μg	%	μg
AGS	A	35.86 ¹ (1.65)	43.20 ^a (8.26)	37.49 ¹ (1.78)	42.40 ^a (5.08)	37.65 ¹ (1.29)	41.61 ^a (11.82)
	B	37.31 ¹ (0.57)	44.70 ^a (2.74)	34.39 ¹ (0.17)	35.35 ^a (2.85)	36.51 ¹ (1.23)	67.9 ^{ab} (31.43)
	C	37.04 ¹ (1.46)	83.63 ^b (17.85)	36.37 ¹ (3.03)	69.58 ^b (19.14)	37.67 ¹ (2.32)	90.27 ^b (18.56)
	\bar{x}	36.74	51.18	36.08	49.11	37.28	66.60
AGMI	A	25.39 ¹ (0.93)	30.57 ^a (5.70)	26.27 ¹ (0.07)	29.65 ^a (0.41)	26.65 ¹ (0.41)	29.32 ^a (7.60)
	B	23.81 ¹ (1.39)	28.55 ^a (3.15)	24.29 ¹ (0.54)	24.96 ^a (1.91)	25.02 ¹ (0.59)	46.25 ^a (20.09)
	C	24.72 ¹ (0.70)	55.75 ^b (11.24)	24.40 ¹ (0.73)	47.26 ^b (15.00)	24.12 ¹ (0.52)	58.22 ^b (14.19)
	\bar{x}	24.64	38.29	24.99	33.96	25.26	44.60
AGPI	A	38.75 ¹ (2.56)	47.08 ^a (12.35)	36.23 ¹ (1.70)	40.80 ^a (1.46)	35.70 ¹ (1.15)	39.39 ^a (11.06)
	B	38.89 ¹ (0.75)	46.61 ^a (3.33)	41.32 ¹ (0.37)	42.49 ^a (3.57)	38.47 ¹ (1.00)	70.52 ^{ab} (29.33)
	C	38.23 ¹ (2.13)	85.39 ^b (9.70)	39.23 ¹ (3.75)	77.98 ^b (31.46)	38.21 ¹ (1.81)	92.39 ^b (23.38)
	\bar{x}	38.62	59.69	38.93	53.76	37.46	67.43

NOTA: Las comparaciones se hicieron entre factores de dilución y muestreos para cada grupo de ácidos grasos en particular.

Al realizar una comparación entre los AGS producidos con las diferentes diluciones, para los tres puntos de muestreo (puntos A, B y C de la curva) no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) debidas al factor de dilución ($p=0.0916$), sin embargo para el punto de muestreo se encontraron diferencias significativas ($p=0.0001$), y para la interacción entre estos dos factores no se encontraron diferencias significativas ($p=0.4461$), obteniendo las mayores concentraciones con el factor de dilución de 0.21 y 0.11, ambos en el punto C de muestreo.

Respecto a los AGMI, al realizar una comparación entre los AGMI producidos con las diferentes diluciones, para los tres puntos de muestreo no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) debidas al factor de dilución ($p=0.1365$), sin embargo si se encontraron diferencias significativas debidas al punto de muestreo ($p=0.0003$), para la interacción entre estas variables no se encontraron diferencias significativas ($p=0.4494$).

Para los AGPI, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) debidas al factor de dilución. Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos debidas al punto de muestreo ($p=0.0001$) y no se encontraron diferencias significativas debidas a la interacción de estas dos variables ($p=0.5717$).

Finalmente, para los ácidos grasos altamente insaturados (AGAI), el EPA constituyó del 27.57 al 32.52 % del total de ácidos grasos y no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos debidos al factor de dilución ($p=0.2769$) pero si a los puntos de muestreos ($p=0.0002$), encontrando mayor cantidad en los puntos de muestreo C (para todos los factores de dilución). Le siguió el ARA con porcentajes de entre 4.66 y 5.4% y tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos debidas al factor de dilución ($p=0.3376$), pero si a los puntos de muestreo ($p=0.0004$) (Figura 10 y Tabla XI).

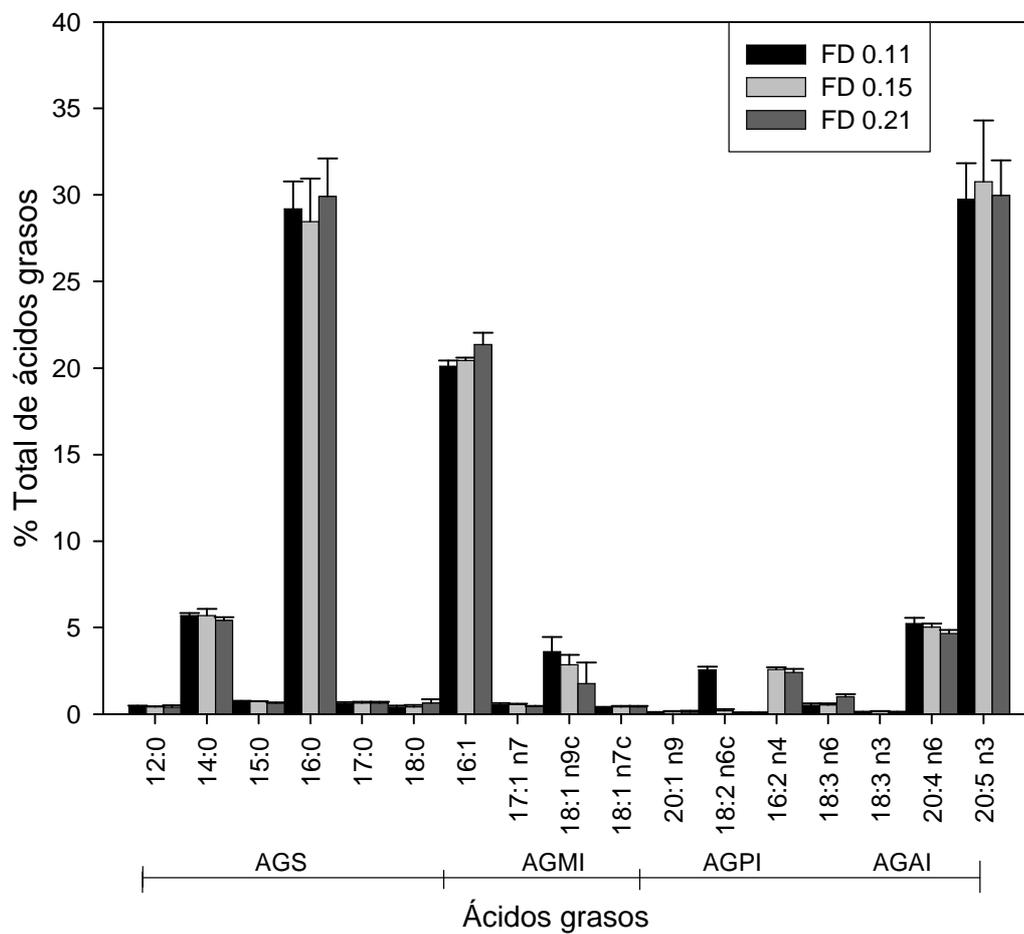


Figura 10. Porcentaje total promedio de los contenidos de ácidos grasos de *Nannochloropsis oculata* cultivada en forma continua en la fase estable de crecimiento. Las líneas horizontales indican la desviación estándar, FD: Factor de dilución, AGS: saturados, AGMI: monoinsaturados, AGPI: poliinsaturados, AGAI: altamente insaturados.

Tabla XI. Contenido promedio de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) de la microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores dilución y analizada en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (Muestras A, B y C). PS=Peso seco, en paréntesis se indica la desviación estándar.

AG	Factor de dilución 0.11			Factor de dilución 0.15			Factor de dilución 0.21		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
12:0	0.56(0.07)	0.44(0.03)	1.07(0.20)	0.52(0.06)	0.42(0.01)	0.82(0.29)	0.44(0.13)	0.76(0.32)	1.00(0.45)
14:0	7.23(1.51)	6.36(0.45)	12.77(2.17)	7.35(0.75)	5.80(0.53)	10.95(3.36)	6.72(1.67)	10.65(4.65)	13.05(3.20)
15:0	0.91(0.20)	0.82(0.11)	1.53(0.13)	0.92(0.11)	0.75(0.05)	1.44(0.47)	0.83(0.21)	1.39(0.61)	1.57(0.38)
16:0	33.15(6.18)	35.74(2.02)	66.02(15.08)	32.32(4.26)	27.24(2.38)	54.40(14.70)	32.33(9.37)	52.99(24.92)	71.58(14.15)
17:0	0.82(0.22)	0.70(0.07)	1.300(0.07)	0.82(0.07)	0.71(0.04)	1.21(0.28)	0.77(0.22)	1.28(0.54)	1.54(0.39)
18:0	0.54(0.09)	0.64(0.06)	0.94(0.37)	0.48(0.27)	0.42(0.04)	0.76(0.09)	0.52(0.24)	0.84(0.42)	1.53(0.33)
16:1	26.07(4.65)	23.69(2.44)	45.22(7.97)	25.06(1.48)	21.11(1.36)	39.72(13.10)	25.41(6.44)	39.58(16.95)	51.24(10.47)
17:1 n7	0.65(0.15)	0.58(0.09)	1.16(0.17)	0.69(0.06)	0.59(0.11)	1.10(0.39)	0.56(0.16)	0.95(0.43)	1.12(0.24)
18:1 n9c	3.25(0.82)	3.68(0.53)	8.33(3.43)	3.35(1.12)	2.75(0.60)	5.36(1.24)	2.76(0.83)	4.79(2.34)	4.58(3.51)
18:1 n7c	0.46(0.08)	0.45(0.06)	0.81(0.03)	0.42(0.04)	0.38(0.03)	0.81(0.28)	0.47(0.13)	0.74(0.34)	1.00(0.34)
20:1 n9	0.13(0.04)	0.15(0.02)	0.23(0.02)	0.13(0.02)	0.14(0.00)	0.28(0.13)	0.11(0.05)	0.19(0.08)	0.28(0.10)
16:2 n4	0.40(0.07)	0.29(0.04)	5.71(0.73)	0.36(0.03)	0.32(0.03)	0.37(0.23)	0.39(0.09)	0.15(0.05)	0.19(0.05)
18:2 n6c	2.84(0.83)	2.65(0.20)	0.19(0.002)	2.98(0.32)	2.49(0.42)	5.03(1.77)	2.62(0.81)	4.19(1.86)	5.75(1.26)
18:3 n6	0.61(0.11)	0.76(0.16)	1.10(0.13)	0.63(0.09)	0.52(0.05)	1.06(0.47)	0.60(0.08)	0.80(0.23)	2.45(0.66)
18:3 n3	0.18(0.03)	0.13(0.05)	0.25(0.04)	0.17(0.02)	0.17(0.03)	0.30(0.09)	0.16(0.02)	0.24(0.11)	0.25(0.15)
20:4 n6	6.31(1.61)	6.10(0.15)	11.79(2.59)	5.35(0.37)	5.57(0.77)	9.85(3.51)	5.25(1.70)	9.29(4.26)	11.22(2.67)
20:5 n3	36.74(9.78)	36.69(2.73)	66.36(6.61)	31.30(0.86)	33.42(2.49)	61.38(25.66)	30.38(8.37)	55.85(22.84)	72.54(18.96)
DHA/EPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPA/ARA	5.82	6.01	5.63	5.85	6.00	6.23	5.79	6.01	6.47

III.7. 3 *Chaetoceros muelleri*

Para esta especie, los contenidos de ácidos grasos se mantuvieron muy cercanos entre las clases. Para los AGMI, se encontraron contenidos de 30.79 a 34.86% del total de los ácidos grasos, con concentraciones que variaron de 37.77 a 65.51 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS. La concentración promedio fue más alta con la dilución mayor (62.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS). Para la clase de los AGS se encontraron contenidos de 29.52 a 37.38%, con concentraciones que variaron de 38.28 a 71.36 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS, la concentración promedio fue más alta con la dilución mayor (64.66 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS). Finalmente para la clase de los AGPI, se encontraron contenidos de 27.69 a 39.69%, en este caso las concentraciones obtenidas variaron de 35.83 a 65.51 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS, siendo la concentración promedio alrededor de 53 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS.

Tabla XII. Contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) de *Chaetoceros muelleri* cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores de dilución y en tres diferentes puntos de la curva de crecimiento (A, B, C). Los valores expresan el promedio de la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) y el porcentaje (%). En paréntesis se indica la desviación estándar. Letras y números diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

AG	Muestreo	FD 0.11		FD 0.15		FD 0.21	
		%	μg	%	μg	%	μg
AGS	A	35.39 ¹ (1.44)	69.84 ^a (28.20)	29.52 ¹ (1.49)	38.28 ^a (11.30)	33.40 ¹ (1.37)	57.95 ^a (20.46)
	B	34.54 ¹ (0.51)	43.61 ^a (21.06)	33.33 ¹ (2.45)	51.30 ^a (20.31)	37.38 ¹ (0.35)	71.36 ^a (5.24)
	\bar{x}	34.97	56.73	31.43	44.79	35.39	64.66
AGMI	A	31.86 ¹ (0.88)	63.24 ^a (26.93)	30.79 ¹ (0.37)	40.06 ^a (12.53)	34.86 ¹ (2.74)	59.99 ^a (19.35)
	B	47.39 ¹ (21.83)	37.77 ^a (1.30)	34.26 ¹ (0.79)	53.98 ^a (24.92)	34.25 ¹ (0.98)	65.51 ^a (7.34)
	\bar{x}	39.63	50.51	32.53	47.02	34.56	62.75
AGPI	A	32.75 ¹ (2.25)	65.51 ^a (30.18)	39.69 ¹ (1.71)	52.08 ^a (18.74)	31.73 ¹ (2.84)	56.59 ^a (26.74)
	B	27.69 ¹ (1.80)	35.83 ^a (20.29)	32.41 ¹ (1.88)	51.78 ^a (26.35)	28.38 ¹ (0.67)	54.12 ^a (3.17)
	\bar{x}	30.22	50.67	36.02	51.93	30.06	55.36

NOTA: Las comparaciones se hicieron entre factores de dilución y muestreos para cada grupo de ácidos grasos en particular.

Al realizar una comparación entre los AGS producidos con las diferentes diluciones, para los tres puntos de muestreo (puntos A, B y C de la curva) no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) debidas al factor de dilución ($p=0.3023$), al punto de muestreo ($p=0.0718$), ni a la interacción entre estas variables ($p=0.4437$).

Al comparar los AGMI producidos con las diferentes diluciones, para los tres puntos de muestreo no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) debidas al factor de dilución ($p=0.4096$), al punto de muestreo ($p=0.9196$) ni a la interacción entre estas variables ($p=0.4530$).

Finalmente, al comparar los AGPI producidos con las diferentes diluciones, en los diferentes puntos de muestreo tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos debidas al factor de dilución ($p=0.8918$), al punto de muestreo ($p=0.6066$) ni a la interacción entre estas variables ($p=0.1870$).

Para los AGPI tampoco hubo diferencias significativas entre los diferentes factores de dilución, ni entre los dos diferentes puntos de muestreo. Al comparar las concentraciones de los AGAI: ARA, DHA y EPA no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes factores de dilución ni entre los dos puntos de muestreos ($p>0.05$) (Figura 11).

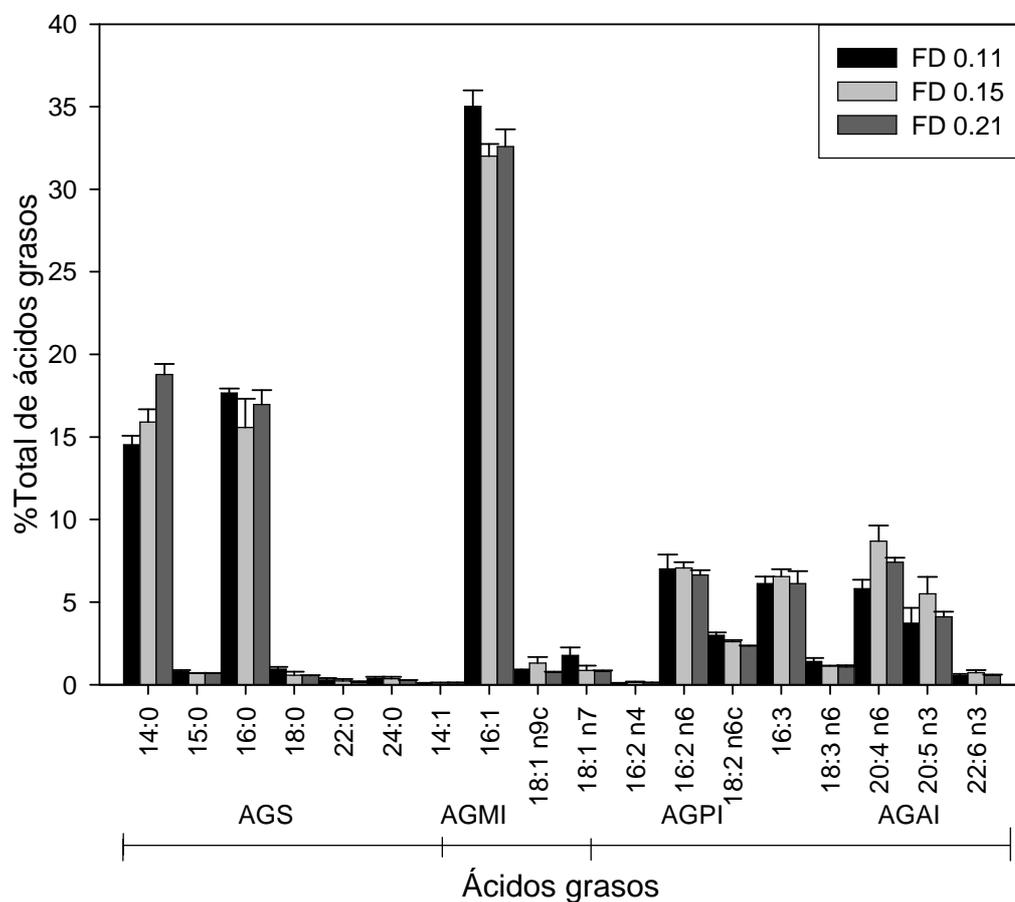


Figura 11. Porcentaje total promedio de los contenidos de ácidos grasos de *Chaetoceros muelleri* cultivada en forma continua en la fase estable de crecimiento. Las líneas horizontales indican la desviación estándar. FD: Factor de dilución, AGS: saturados, AGMI: monoinsaturados, AGPI: poliinsaturados, AGAI: altamente insaturados.

Tabla XIII. Contenido promedio de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PS) de la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en un sistema continuo con tres diferentes factores dilución y analizada en dos diferentes puntos de la curva de crecimiento (Muestras A, B y C). PS=Peso seco, en paréntesis se indica la desviación estándar.

AG	Factor de dilución 0.11		Factor de dilución 0.15		Factor de dilución 0.21	
	A	B	A	B	A	B
14:0	32.73(12.67)	18.24(8.53)	19.74(5.87)	24.65(10.07)	28.39(10.34)	35.91(3.90)
15:0	1.54(0.57)	0.97(0.41)	1.03(0.29)	1.10(0.51)	1.42(0.48)	1.33(0.11)
16:0	32.53(14.67)	22.50(11.51)	15.87(4.83)	23.86(9.41)	25.77(9.24)	32.36(1.83)
18:0	1.76(0.48)	1.14(0.45)	0.91(0.28)	0.86(0.42)	1.36(0.32)	1.04(0.04)
22:00	0.45(0.22)	0.32(0.14)	0.22(0.08)	0.29(0.04)	0.42(0.16)	0.23(0.15)
24:0	0.83(0.33)	0.45(0.15)	0.51(0.18)	0.54(0.11)	0.60(0.06)	0.48(0.02)
14:1	0.24(0.09)	0.11(0.08)	0.19(0.05)	0.17(0.08)	0.21(0.08)	0.23(0.05)
16:1	58.99(25.44)	44.02(20.58)	38.22(11.92)	50.57(23.92)	56.93(18.58)	62.35(7.19)
18:1 n9c	2.07(0.79)	1.12(0.57)	1.01(0.36)	2.05(0.97)	1.47(0.46)	1.41(0.08)
18:1 n7	1.93(0.66)	2.14(0.73)	0.64(0.23)	1.19(0.10)	1.38(0.26)	1.52(0.09)
16:2 n4	0.19(0.08)	0.12(0.05)	0.12(0.06)	0.21(0.10)	0.19(0.04)	0.23(0.04)
16:2 n6	14.54(6.09)	9.15(5.31)	10.63(3.45)	11.11(4.94)	14.80(5.14)	12.67(1.25)
18:2 n6c	5.71(3.00)	3.74(1.74)	3.22(1.04)	4.12(1.99)	4.22(1.54)	4.49(0.38)
16:03	12.04(5.65)	7.91(4.52)	10.97(4.24)	10.22(4.28)	13.11(6.08)	11.60(0.56)
18:3 n6	1.83(0.97)	1.70(0.57)	1.58(0.50)	1.78(0.80)	1.77(0.84)	2.05(0.35)
20:4 n6	16.88(9.14)	7.52(4.33)	13.51(5.05)	14.10(7.89)	12.96(7.60)	14.20(1.63)
20:5 n3	12.32(4.73)	5.03(3.69)	10.86(4.15)	9.06(5.81)	4.98(5.03)	7.80(0.46)
22:6 n3	2.00(0.68)	0.65(0.18)	1.19(0.44)	1.18(0.73)	0.56(0.65)	1.08(0.04)
DHA/EPA	0.16	0.13	0.11	0.13	0.13	0.14
EPA/ARA	0.73	0.67	0.80	0.64	0.67	0.55

V. DISCUSIÓN

El cultivo de las microalgas en un sistema estático sigue un patrón típico de crecimiento, con una fase de acondicionamiento, fase exponencial, fase de lento crecimiento, fase estacionaria y finalmente fase de muerte (Richmond, 1988). Teóricamente, en un cultivo continuo con las condiciones ambientales adecuadas, las microalgas pueden mantenerse en una fase exponencial por periodos ilimitados. En este trabajo, debido a que el inóculo se agregó cuando las bolsas aun no se llenaban (lo que no permitió la cosecha de las mismas), no se obtuvieron datos en los primeros días de cultivo que mostraran la fase de aclimatación de las microalgas, pero con base en los resultados obtenidos en los primeros días de muestreo, se puede suponer que esta fase fue muy breve, porque se trabajó con inóculos que estaban en fase exponencial y porque así se observan en la cinéticas de su crecimiento. Enseguida las microalgas entraron en una fase de crecimiento acelerado, presentando altas tasas de crecimiento y posteriormente estabilizándose, llegando así a una fase de equilibrio. Por lo tanto el cultivo de las microalgas presentó el patrón de crecimiento típico de un cultivo continuo.

Droop (1975) reporta que cuando las tasas de crecimiento son muy cercanas al factor de dilución, el cultivo llega a una fase de equilibrio (“steady-state”) y así permanecerá siempre y cuando las condiciones ambientales permanezcan sin grandes cambios. Eventualmente el crecimiento cesará si existe un factor limitante o debido a la acumulación de productos que inhiban el crecimiento de las microalgas. En este trabajo, durante los 60 días de cultivo, aparentemente no hubo factores limitantes que causaran un efecto inhibitor del crecimiento, por lo que se llegó a la fase de equilibrio, excepto para *Chaetoceros muelleri*.

Las diferencias observadas entre las tasas de crecimiento y los factores de dilución pueden ser principalmente debido a las variaciones en las condiciones ambientales, ya que, a pesar de que cuando el flujo en las bolsas disminuía, debido a la acumulación natural de “biofouling” en los capilares de vidrio, el cultivo podría haberse comportado como un

sistema estático, sin embargo esto no fue un problema mayor porque siempre se lavaban los capilares con vapor, lo que evitaba este problema.

En el cultivo de *Chaetoceros muelleri* no se observó la fase estable debido a que hubo problemas de contaminación y por lo tanto de muerte, llegando a tener tasas de crecimiento de cero. Las paredes celulares de las diatomeas están compuestas principalmente por sílice, y es necesario agregarlo al medio de cultivo, por lo que la pérdida de estos cultivos probablemente se debió a la forma en que se suministraron los silicatos, ya que eran agregados periódicamente en forma discontinua, de forma que siempre estuvieran disponibles, sin embargo se observó precipitación de los mismos en el fondo de las bolsas, lo que pudo haber causado aglomeración de microalgas y por ende proliferación de protozoarios y bacterias que afectaron significativamente el desarrollo de los cultivos.

Las diferencias entre las tasas de crecimiento observadas al emplear los mismos factores de dilución entre las distintas especies de microalgas estudiadas en este trabajo, se deben en parte a sus diferencias fisiológicas, ya que la tasa de crecimiento depende en parte del tamaño celular, así, las especies más pequeñas tienen tiempos de generación más cortos, además, la tasa de crecimiento aumenta bajo ciertas condiciones (Fogg y Thake, 1987). En este trabajo la especie más pequeña fue *Nannochloropsis oculata*, misma que tuvo las mayores tasas de crecimiento.

La similitud en la tasa de crecimiento de una especie en particular, expuesta a diferentes factores de dilución, indica la capacidad que tienen las microalgas para aclimatarse al medio. Desde un punto de vista teórico, en condiciones de crecimiento favorables, se podría incrementar el factor de dilución para aumentar la tasa de crecimiento. Por ejemplo, para *Nannochloropsis oculata* se han reportado tasas de crecimiento de 1.47 por día en la fase exponencial (Campa-Ávila, 2002), si se mantienen las condiciones óptimas y se prolonga esta fase del crecimiento de la microalga, se podría aumentar el factor de dilución del cultivo a 1.47 veces. En el experimento no sucedió así, si se aplicara aplicamos esa cantidad de dilución en un cultivo lo más probable es que el cultivo se

diluya. En un ensayo de calibración anterior de este mismo trabajo se evaluó un tiempo de residencia de 3 días (factor de dilución de 0.33), y no hubo crecimiento de las microalgas. No existen muchos antecedentes que describan la tasa de crecimiento de microalgas en cultivos continuos, la mayoría de los trabajos se han enfocado a cultivos estáticos y semicontinuos. Por otra parte, la producción de biomasa microalgal en un cultivo, está relacionada directamente con sus tasas de crecimiento.

Los cultivos continuos permiten tener productividades más altas que los cultivos estáticos debido a que sus parámetros como la tasa de crecimiento, densidad celular y productividad pueden mantenerse constantes. En los cultivos estáticos se alcanzan mayores densidades celulares que en los cultivos continuos, sin embargo, hablando de productividad, son los últimos los que tienen mayor producción. En un cultivo de *Pavlova lutheri*, donde se realizó una comparación entre dos métodos de cultivo, se obtuvieron biomásas de $0.540 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en un sistema batch y $0.385 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ con un sistema continuo (una vez que los dos se mantuvieron estables), en términos de densidad celular o biomasa, el cultivo batch fue el más denso, pero en términos de productividad, después de 18 días de cultivo, el sistema estático produjo $0.030 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que el sistema continuo produjo $0.114 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, esto es, 3.8 veces más. (Carvalho y Malcata, 2005). Por otra parte Brown *et al* (1993) señalan una productividad de $0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ para cultivos semicontinuos con la microalga *Nannochloropsis* sp en tanques, en contraste, con un cultivo continuo en fotobiorreactores, donde la productividad fue de 0.5 a $1.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. En este trabajo se logró una productividad máxima de $0.12 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ al emplear un factor de dilución de 0.21.

En un cultivo continuo de *Isochrysis* sp. en un fotobiorreactor, se obtuvo un rendimiento de $0.16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, para un tiempo de retención de 3.1 días, lo que equivale a un factor de dilución de 0.32 (Patil *et al.*, 2007). En este trabajo, el rendimiento para esta especie, cultivada con un factor de dilución de 0.21 fue de $0.062 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, por debajo de lo reportado por Patil *et al.* (2007), sin embargo, las condiciones de cultivo fueron muy diferentes, ya que estos autores trabajaron con volúmenes de 1.8 l (la producción fue de $0.28 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$), fáciles de controlar, ya que mantenían el pH entre 7.5 y 8, agregando CO_2

de forma automática cuando los valores de pH subían por encima del óptimo.

Para obtener altas productividades en el cultivo de microalgas, el suministro de CO_2 y HCO_3^- es sumamente importante, ya que contrario a las plantas, el CO_2 atmosférico no satisface los requerimientos necesarios para su crecimiento. Durante la fotosíntesis se utiliza el CO_2 del medio, lo que conduce a la acumulación de OH^- en el medio, ocasionando un aumento gradual del pH. En este trabajo el pH se mantuvo en el intervalo de 8.80 a 9.44 en todos los tratamientos, en parte debido a la forma y a la periodicidad con que se suministró el CO_2 . El pH más alto observado en el cultivo de *Nannochloropsis oculata* (que sobrepasa los límites óptimos), es consecuencia de la actividad metabólica (que se traduce en la producción de oxígeno y el consumo de CO_2) y de la gran concentración celular y de la mayor cantidad de biomasa en el cultivo que en *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*. Por otra parte no se encontraron diferencias en el pH entre diferentes factores de dilución para cada una de las microalgas cultivadas, por lo que la tasa de recambio de agua en las bolsas de cultivo no influyó en la cantidad de carbonatos disponibles en el medio de cultivo.

Por otra parte, se observaron al inicio del experimento valores de pH más bajos respecto a los valores promedio subsecuentes, esto se relaciona con el crecimiento de las microalgas, que fueron consumiendo los carbonatos presentes en el agua marina y por consiguiente un aumento en el pH. Posteriormente, el pH se mantuvo sin cambios significativos cuando las microalgas alcanzaron una fase de equilibrio. Es probable que los niveles de pH se hubiesen podido controlar con mayor eficacia en los cultivos, sin embargo, el agua que salía del intercambiador de calor, justamente en el sitio en donde se agregaba el CO_2 , tenía una temperatura aproximada de 45 °C, lo que ocasionó una disminución en la solubilidad del CO_2 . Un control más preciso de la temperatura del agua a la salida del pasteurizador podría haber aumentado la solubilidad del CO_2 y por lo tanto mejorado el control de pH en los cultivos.

Roncarati *et al.* (2004) señalan la importancia de suministrar el CO_2 a los cultivos en cantidades adecuadas, ya que es un donador potencial de átomos de carbono, necesarios

para la síntesis de compuestos orgánicos y que se refleja también en el perfil de ácidos grasos. La aplicación de altas concentraciones de CO₂ a los cultivos de microalgas, propician un incremento en la proporción de ácidos grasos de cadena larga (Roncarati *et al.*, 2004). Así mismo, Tzuzuki *et al.* (1990), reportan que en *Chlorella vulgaris* la desaturación de ácidos grasos es más baja cuando se cultiva bajo condiciones de altas concentraciones de CO₂. En *Pavlova lutheri* el incremento en las concentraciones de CO₂ favorecen al contenido total de lípidos, pero propician un decremento en las cantidades de AGPI (Carvalho y Malcata, 2005).

La concentración celular de las microalgas en un cultivo es trascendental para la acuicultura, debido a que una mayor concentración de microalgas reduce el volumen de agua necesario para su producción. En este trabajo se obtuvo la mayor productividad (biomasa microalgal g·día⁻¹) al emplear las tasas de dilución más elevadas, pero también se incrementó la cantidad de agua utilizada, lo que convierte en un problema este aspecto, porque realizar la extracción o cosecha de microalgas es muy caro, además de que se van perdiendo sus propiedades nutricionales (Richmond, 1988).

Hejazi y Wijffels (2004) proponen la reutilización de la biomasa microalgal en la producción continua como solución a un problema de este tipo, llamándole a esto “milking” u ordeñamiento de microalgas. Estos autores lo proponen como una alternativa para extraer compuestos de interés comercial y además para la extracción de AGPI y consiste básicamente en colectar una fracción de microalgas, exponerlas a hexano por corto tiempo y una vez que se extrajo el producto de interés, las microalgas son devueltas al fotobiorreactor.

Los estudios relacionados con la composición y el contenido de ácidos grasos en los cultivos de microalgas son contradictorios (Xu *et al.*, 2006; Zhi-You y Chen, 2003; Roncarati *et al.*, 2004). En *Pavlova viridis* el mayor contenido total de lípidos se registró durante la fase estacionaria de crecimiento, en contraste con la fase exponencial. El contenido de los AGPI, especialmente del EPA, cuyo contenido es mayor en la fase

exponencial disminuyó en relación directa con la duración del cultivo, mientras que el contenido de DHA no tuvo cambios significativos (Xu *et al.*, 2006). En este trabajo, aunque sin diferencias significativas se encontró una mayor cantidad de AGPI al cultivar las microalgas *Isochrysis* sp., y *Chaetoceros muelleri* con el factor dilución de 0.21, en comparación con los factores de dilución 0.11 y 0.15. Respecto a las cantidades de EPA y DHA no se encontraron diferencias significativas con ninguno de los tres factores de dilución en *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*, en *Nannochloropsis oculata* se encontró la mayor cantidad de EPA en los puntos de muestreo C.

En cultivos continuos de *Pavlova lutheri* se ha observado que al aumentar el factor de dilución, hay una disminución en los porcentajes de EPA pero un aumento en el contenido de ácido oleico y linolénico (Carvalho y Malcata, 2005). Por otro lado existen estudios que señalan que el contenido de AGPI se incrementa conforme los cultivos pasan a de las etapas avanzadas de la fase exponencial hasta llegar a la fase de lento crecimiento y disminuye gradualmente con la fase estacionaria hasta llegar a la fase de muerte (Yongmanitchai y Ward, 1991). En un estudio del cultivo de la diatomea *Nitzschia laevis*, el contenido celular de EPA se incrementó conforme el cultivo atravesaba por las diferentes fases de crecimiento, pero la proporción de EPA (% total de ácidos grasos) se mantuvo estable (Wen y Chen, 2001). En el presente trabajo se observaron incrementos en los AGPI conforme se aumentó el factor de dilución, aunque sin diferencias significativas.

Las microalgas contienen porcentajes más altos de AGPI durante la fase logarítmica de crecimiento, comparada con la fase estacionaria, cuando las proporciones de ácidos grasos de cadena corta se incrementan. Los altos niveles de CO₂ en el medio de cultivo, generalmente incrementan el contenido ácidos grasos de cadena larga, de igual forma, la razón n-3 /n6 es más alta cuando se usa una mayor concentración de CO₂ (Roncarati *et al.*, 2004).

En este trabajo, para *Isochrysis* sp se obtuvo una proporción DHA:EPA de alrededor de 21, esto es consecuencia de que esta especie contiene altos niveles de DHA respecto a

EPA. Para *Nannochloropsis oculata* la proporción fue de cero, debido a que no se encontró el DHA en esta especie. La proporción de DHA:EPA para *Chaetoceros muelleri* fue muy baja (alrededor de 0.14), debido a que se encontró mayor cantidad de EPA que de DHA. El suministro de alimentos con proporciones incorrectas de ácidos grasos esenciales es un error típico que se comete en el cultivo larval de especies marinas, ya que las funciones de DHA y EPA durante el desarrollo larvario de los organismos son diferentes.

El papel específico del DHA se centra en el desarrollo de tejidos del cerebro, así como en el de la retina, por consiguiente un alto contenido de DHA en el desarrollo larvario es necesario tomando en cuenta que el cerebro y el tejido nervioso en general constituyen una fracción significativa de la masa corporal. Por otra parte, el EPA tiene un papel importante en la precursión de eicosanoides, que son cruciales en la regulación de los procesos metabólicos.

La proporción de DHA:EPA óptima para larvas de peces marinos parece ser de dos, las proporciones iguales o menores a uno son subóptimas (Sargent *et al.*, 1997). Un exceso relativo de EPA comparado con DHA puede ser peligroso en larvas de peces, ya que el primero puede inhibir la producción de eicosanoides provenientes del ARA, además se tienen reportes de que afecta la pigmentación de peces marinos, atrofia la membrana fosfolipídica y se obtienen larvas poco viables (Rainuzzo *et al.*, 1997). Otro ácido graso esencial que no puede ser sintetizado y que se ha comprobado su importancia en la nutrición larval de especies marinas es el ácido araquidónico (ARA), cuyas funciones son esenciales en la producción de eicosanoides, por lo tanto también deben ser suministrados en la dieta y en proporciones adecuadas (alrededor del 1% del total de los ácidos grasos), sin embargo no hay suficientes evidencias que expliquen si esta es la cantidad adecuada o no. Se ha establecido que la mejor proporción de EPA:ARA es de alrededor de 5:1. En este trabajo se tuvieron proporciones reportadas como adecuadas para *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis oculata*, que oscilaron entre los 5.48 y 5.97 respectivamente, para *Chaetoceros muelleri* la proporción fue baja ya que se cuantificó mayor cantidad de ARA que de DHA. Cabe destacar que las proporciones óptimas de DHA:EPA y EPA:ARA para

el cultivo larvario son discrepantes y aún siguen en investigación.

El efecto de la temperatura en las reacciones bioquímicas hacen de este parámetro el factor ambiental que más influencia tiene en la composición bioquímica de las microalgas, temperaturas por debajo de los niveles óptimos incrementan los grados de insaturación de los lípidos (Richmond, 1988), lo que puede producir altos contenidos de AGPI, debido a que las células intentan mantener la fluidez en sus membranas celulares, y esto lo logran produciendo más AGPI. Los altos niveles de oxígeno pueden ser otra razón por la que aumentan los AGPI a temperaturas bajas, debido a que las enzimas responsables de la desaturación y elongación de los AGPI dependen de la disponibilidad de oxígeno en las células. En este estudio, la temperatura promedio semanal de los cultivos varió de 24.88 °C a 25.61 °C y fue determinada principalmente por el grado y duración de la radiación solar, debido a que el experimento se realizó al exterior. La variación de poco menos de 1°C a lo largo del experimento, fue producto del incremento estacional hacia el final del experimento, sin embargo las temperaturas se mantuvieron en el intervalo adecuado para el cultivo de estas especies (Ryu y Tokuda, 1984; Abu-Resq *et al.*, 1999).

La intensidad luminosa tiene un papel trascendental en el desarrollo de las microalgas cultivadas, debido a que en presencia de luz convierten el carbono inorgánico (C) en moléculas orgánicas a través de la fotosíntesis. La limitación de la energía radiante restringe el transporte de carbono inorgánico, por lo que las células que crecen bajo condiciones de luz limitadas presentan una capacidad reducida para asimilar el C del CO₂ (Beardall *et al.*, 1998). En este trabajo la luz promedio se mantuvo en los intervalos recomendados (Dubinsky y Wyman, 1985), se tuvo una intensidad luminosa continua pero con una intensidad variable, por ser un cultivo al exterior e iluminado con lámparas. Toro (1989), reporta que no hay diferencias en el crecimiento de las microalgas cuando se cultivan con fotoperiodos de 12:12 y luz continua. La producción de HUFA n-3 en las microalgas está influenciado por la cantidad de fotones disponibles por día, de forma similar al crecimiento, por lo tanto un fotoperiodo con pocas horas de luz traerá como resultado una fotolimitación.

CONCLUSIONES

El sistema de cultivo continuo masivo produce rendimientos aceptables para las tres especies de microalgas estudiadas.

La mayor producción de biomasa en peso seco total de las microalgas *Isochrysis* sp. *Nannochloropsis oculata* y *Chaetoceros muelleri* se obtuvo al cultivarlas con el factor de dilución de 0.21 (4.82 días de residencia).

En *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis oculata*, la densidad celular fue inversamente proporcional al factor de dilución.

El valor de correlación del número de células de microalgas contra la absorbencia fue alto en las tres especies de microalgas, lo que indica que el método por densidad óptica puede emplearse para evaluar el crecimiento celular.

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos, la mayor producción de AGPI en *Isochrysis* sp., y *Chaetoceros muelleri* se obtuvo al cultivarlas con el factor de dilución de 0.21. En *Nannochloropsis oculata* la mayor producción de AGPI se obtuvo en el punto de muestreo C (factores de dilución 0.21 y 0.11).

Las concentraciones de AGAI fueron similares para los tres diferentes factores de dilución y puntos de muestreo para *Isochrysis* y *Chaetoceros muelleri*. En *Nannochloropsis oculata* se encontró una mayor concentración en el punto de muestreo C (para todos los factores de dilución).

RECOMENDACIONES

Analizar la remoción de nutrientes por las diferentes especies de microalgas para determinar si existe limitación de estos en los cultivos.

Ensayar otros factores de dilución para observar su efecto en el crecimiento y la calidad bioquímica de las microalgas.

Realizar un análisis de costo-beneficio del sistema.

LITERATURA CITADA

- Abalde, J., P. Hidalgo y E. Torres. 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de Coruña, España. 210 p.
- Abu-Rezq, T.S., L. Al-Musalam, J. Al-Shimmari, y P. Dias. 1999. Optimum production conditions for different high-quality marine algae. *Hydrobiología*, 403:97-107.
- Baynes, S.M., L. Emerson y A.P. Scout. 1979. Production of algae for use in the rearing of larval fish. *Fisheries Research Technical Report*. 53:13-18.
- Beardall J., A. Johnston y J. Raven. 1998. Environmental regulation of CO₂-concentrating mechanism in microalgae. En: Carvalho, A.P. y F.X. Malcata, 2005. Optimization of w-3 Fatty Acid Production by Microalgae: Crossover Effects of CO₂ and Light Intensity Under Batch and Continuous Cultivation Modes. *Marine Biotechnology*. 7:381-388.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University. 293 p.
- Bligh, G.E., y J.W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(3):911-917.
- Brown, M.R., C.D. Garland, S.W. Jeffrey, I.D. Jameson y J.M. Leroi. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5:285-296.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, y G.A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151:315-331.
- Campa-Ávila, M.A. 2002. Evaluación del efecto de la dieta en el valor nutricional del rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con una microalga y una cianobacteria. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). División de Oceanología. Departamento de Acuicultura. Ensenada, Baja California, México. 97 p.
- Carreón-Palau, L., J.A. Rodríguez, y M.A. Arjona-López. 2007. Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas. En: Arredondo-Vega B.O y D. Voltolina, 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz,

Baja California Sur, México. 97 p.

- Carvalho, A.P. y F.X. Malcata. 2005. Optimization of w-3 Fatty Acid Production by Microalgae: Crossover Effects of CO₂ and Light Intensity Under Batch and Continuous Cultivation Modes. *Marine Biotechnology*. 7:381-388.
- Cerón-Ortíz, A.N. 2006. Efecto Interactivo de la Temperatura y la Calidad Nutricional de Microalgas Sobre Algunas Variables Fisiológicas en Semillas de Mano de León *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). División de Oceanología. Departamento de Acuicultura. Ensenada, Baja California, México. 97 p.
- Dhert, P., G. Rombaut, G. Suantika y P. Sorgeloos. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200:129-146.
- Drevon C.A., I. Baksaas, y H.E. Krokan, 1993. Omega-3 fatty acids: metabolism and biological effects *En: Patil, V., T. Kallqvist, E. Olsen., G.Vogt, y H.R. Gislerod, 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquaculture International*. 15: 1-9.
- Droop. M.R. 1975. The Chemostat in mariculture. *En: G.P. Persoone y E.Jaspers (Eds.), proc. 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium. Universa Press, Wetteren*. 71:93.
- Duerr, E., A. Molnar y V. Sato. 1998. Culture microalgae as aquaculture feeds. *Journal Marine Biotechnology*, 7:65-70.
- Fogg, G.E. y B. Thake. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. Third Edition
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detanula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology*. 8:229-239.
- Hejazi, M.A. y R.H. Wijffels. 2004. Milking of microalgae. *Trends in Biotechnology*. 22(4):189-194.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. *En: J.R. Stein (Ed.). Handbook of phycolgical methods*. Cambridge University Press. London, 448 p.
- Lim, L.C., P. Dhert y P. Sorgeloos. 2003. Recent developments on the application of live

- feeds in the freshwater ornamental fish culture. *Aquaculture*, 227: 319-331.
- López-Elías, J.A., D.Voltolina., F. Enríquez-Ocaña y G. Gallegos-Simental. 2005. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican commercial hatchery, 2005. *Aquacultural Engineering* 33:181-191.
- Lubián, L.M. y J.P. Cañavete. 2002. Obtención de biomasa concentrada de microalgas marinas para su utilización como alimento larvario de especies marinas. *Consejería de Agricultura y Pesca*, 49 p.
- Martínez-Fernández, E., H. Acosta-Salmón y P.C. Southgate. 2006. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip perla oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture*, 257: 491-503.
- Muller-Feuga A, J. Moal y R. Kaas. 2003. The Microalgae of Aquaculture. En: *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Josianne G. Stottrup y Lesley A. McEvoy. Blackwill Science Ltd. 2003 USA. 518 p.
- Palleroni, N.J. 1970. *Principios Generales de Microbiología*. Departamento de Bacteriología e Inmunología. Universidad de California. Berkeley, California, Estados Unidos. 124 p.
- Patil, V., T. Kallqvist, E. Olsen, G.Vogt y H.R. Gislerod. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*. 15: 1-9.
- Pernet, F., R.Tremblay, E. Demers. y M. Roussy. 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochysis* sp. Grown in a semicontinuos system. *Aquaculture*, 221: 393:406.
- Rainuzzo, J.R., K.I. Reitan y Y. Olsen. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155: 103-115.
- Reitan, K.I., J.R. Rainuzzo, G. Øie, y Y. Olsen. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155:207-221.
- Renaud, S.M., T. Luong-Van, G. Lambrinidis y D.L. Parry. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211: 195-214.
- Richmond, A., 1988. *Handbook of Microalgal Culture*. Biotechnology and Applied

- Phycology. Blackwell Science. 566 p.
- Ricica, J. 1966. Continuous Systems. En: Málek, I. y F. Zdenek (Eds). Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms. Academic Press New York and London. 665 p.
- Roncarati, A., A. Meluzzi., S. Acciarri, N. Tallarico, y P. Melotti. 2004. Fatty Acid of Different Microalgae Strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloropsis atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) According to the culture Phase and the Carbon Dioxide Concentration, Journal of the World Aquaculture Society, 35 (3):401-411.
- Ryu, H.Y. y H. Tokuda, 1984. The effects of Light and temperature on the growth of phytoplanktonic food organism, *Isochrysis galbana* (Parke). 1. Variations in division rate and pigment content. En: Live Feeds in Marine Aquaculture. G. Stottrup y L.A. McEvoy. Blackwell Science Ltd. 2003 USA. 518 p.
- Saracco-Álvarez, M.R., 2007. Compuestos con Actividad Antibacterial Producidos por las Microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) División de Oceanología. Departamento de Acuicultura. 54 p.
- Sargent, J.R., L.A McEvoy y J.G. Bell. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. Aquaculture, 155:117-127.
- Sato, N. y N. Murata. 1988. Membrane lipids. Methods in Enzymology.167:251-259.
- Simopoulos A.P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. American Journal Clinical Nutrition, 70(3):560-569.
- Sukenik, A y R. Wahnnon. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. Aquaculture, 97(1)61:72
- Trotta, P. 1980. A Simple and inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae. Aquaculture, 22:383-387.
- Tsuzuki, M., E. Ohnuma, N. Sato, T. Tatakú y A. Kawaguchi. 1990. Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. Plant Physiology. 93:851-856.

- Wen, Z.Y. y F. Chen. 2001. A perfusion-cell bleeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentaenoic acid by *Nitzchia laevis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 57:316-322.
- Xu, X.Q. y J. Beardall. 1997. Effect of salinity on the fatty acid composition of a green microalgae from an Antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry*, 45:665-668.
- Yongmanitchai, W. y O.P. Ward. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornotum* under different culture conditions. *Application Enviromental Microbiology*, 2:419-425.
- Zhi-You, W. y F. Chen. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21:273-294.

