

Productividad de las microalgas marinas *Chaetoceros* sp. LAEP-35 y *Chroomonas* sp. MOF-03 en cultivos semicontinuos de interés en acuicultura

Néstor Rosales-Loaiza¹, Hugo Zambrano¹, Miguel Guevara², César Lodeiros²
y Ever Morales^{1,*}

¹Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

²Laboratorio de Acuicultura, ext. Plancton, Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.

Recibido: 09-02-11 Aceptado: 18-04-12

Resumen

Las microalgas marinas *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp. fueron crecidas en cultivos semicontinuos para estudiar el efecto de la tasa de renovación (5, 10 y 20%) en la productividad celular y de metabolitos. Las máximas de densidad celular, masa seca, proteínas, clorofila α , β -caroteno y lípidos de $101,6 \pm 11,62 \times 10^6$ cel mL⁻¹; $1,3 \pm 0,10$ mg mL⁻¹; $402,4 \pm 6,56$; $30,9 \pm 1,83$; $11,3 \pm 0,54$ y $450,0 \pm 11,14$ μ g mL⁻¹, respectivamente se alcanzaron a la tasa de renovación más baja para *Chroomonas* sp. Para *Chaetoceros* sp., los mayores valores de densidad celular, masa seca, proteínas, clorofila α y β -caroteno fueron de $6,1 \pm 0,30$ 10^6 cel mL⁻¹; $0,9 \pm 0,10$ mg mL⁻¹; $306,5 \pm 6,37$; $12,19 \pm 0,4$ y $10,43 \pm 0,1$ μ g mL⁻¹ a la tasa del 10%. El contenido máximo de lípidos se halló a la tasa del 20% con $480,7 \pm 8,26$ μ g mL⁻¹. Los mayores valores de productividad celular, masa seca y metabolitos se hallaron a la tasa de renovación del 20%. Estas microalgas muestran un alto potencial para la producción diaria de biomasa enriquecida con metabolitos en función de la tasa de renovación en cultivos semicontinuos. Esta biomasa puede ser usada en acuicultura para la alimentación de crustáceos y bivalvos.

Palabras clave: microalgas marinas, productividad, proteínas, tasa de renovación, cultivos semicontinuos.

Marine microalgae *Chaetoceros* sp. LAEP-35 y *Chroomonas* sp. MOF-03 productivity in semicontinuous culture of interest in aquaculture

Abstract

The marine microalgae *Chroomonas* sp. and *Chaetoceros* sp. were grown in semicontinuous cultures in order to study the effect of renewal rate (5, 10 and 20%) on cell and metabolites productivity. Maximal steady-state cell density, dry weight, protein, chlorophyll α , β -carotene and lipid content of $101.6 \pm 11.62 \times 10^6$ cell mL⁻¹, 1.3 ± 0.10 mg mL⁻¹, 402.4 ± 6.56 , 30.9 ± 1.83 , 11.3 ± 0.54 and 450.0 ± 11.14 μ g mL⁻¹, respectively were achieved at lowest renewal rate for

* Autor para la correspondencia: evermster@gmail.com

Chroomonas sp. For *Chaetoceros* sp., highest values of cell density, dry weight, protein, chlorophyll *a* and β -carotene were $6.1 \pm 0.30 \cdot 10^6$ cell mL⁻¹, 0.9 ± 0.10 mg mL⁻¹, 306.5 ± 6.37 , 12.19 ± 0.4 and 10.43 ± 0.1 μ g mL⁻¹ at 10% renewal rate, and maximum lipid content were at 20% renewal rate, with 480.7 ± 8.26 μ g mL⁻¹. Highest values of cell, biomass and metabolite productivity were found at higher renewal rate of 20%. These microalgae, as biological source of commercially valuable compounds, show a high potential for biomass daily production enriched with metabolites in function of renewal rate in semicontinuous cultures. This biomass can be used in aquaculture for feeding for crustaceans and bivalves.

Keywords: *Chroomonas*, *Chaetoceros*, Productivity, Protein, Renewal rate, Semicontinuous culture.

Introducción

Las microalgas marinas pueden ser usadas como fuente de productos de alto valor agregado como pigmentos, exopolisacáridos, ácidos grasos y proteínas (1), y son usadas actualmente como fuente de proteínas y ácidos grasos para el cultivo de artemias y bivalvos (2). Sin embargo, cada cepa de microalga y tipo de producto requiere procesos diseñados para incrementar la producción de biomasa enriquecida (1).

El cultivo de microalgas es de gran importancia para las granjas comerciales que cultivan moluscos bivalvos marinos, debido a que ellas son la principal y más conveniente fuente de alimento (2). Por lo tanto, la composición de la dieta tiene una gran influencia en el crecimiento y sobrevivencia de las larvas, y la selección de la microalga apropiada es crucial para el éxito de estas granjas (3).

Trabajos previos han demostrado el potencial del uso de los cultivos semicontinuos en la producción de microalgas marinas debido a la simplicidad de operación del sistema y la posibilidad de manipular la productividad y la composición bioquímica de la biomasa microalgal, a través de cambios en los parámetros de cultivo como tasa de renovación, concentración de nutrientes e iluminación (3, 4).

La productividad de las microalgas en cultivos continuos y semicontinuos es considerablemente mayor que en los sistemas

convencionales discontinuos o batch; pero la mayor parte de los estudios disponibles se han realizado en estos tipos de cultivo, y pocos datos existen sobre la variabilidad bioquímica que puede ser generada a través de la manipulación de las tasas de renovación, concentración de nutrientes y otros parámetros de cultivo en cultivos semicontinuos (4). Además, los estudios sobre la respuesta del crecimiento y actividad metabólica de *Chroomonas* bajo sistemas semicontinuos son limitados (5), y sobre *Chaetoceros* existen algunos reportes (6).

Los cultivos discontinuos o *batch* han sido tradicionalmente considerados como los sistemas más apropiados para la producción de metabolitos secundarios; pero cuando la productividad de estos cultivos es calculada dividiendo la concentración de los metabolitos en fase estacionaria por el número de días necesarios para alcanzar dicha fase, la productividad obtenida en sistemas semicontinuos es mucho mayor, y en muchos casos mayor a la obtenida en fotobioreactores operados de forma continua (7).

En base a esto se hace necesario el aislamiento y caracterización de cepas de microalgas autóctonas de ambientes salinos para estudios fisiológicos, con el propósito de evaluar su potencial para la producción de compuestos de alto valor biotecnológico. En el presente trabajo, las microalgas marinas *Chroomonas* y *Chaetoceros* fueron evaluadas en cultivos semicontinuos para estudiar el efecto de la tasa de renovación sobre

la productividad de celular, de biomasa, proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos.

Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

La microalga flagelada marina carente de pared celular *Chroomonas* sp. MOF-03 (Cryptophyta), fue aislada de una laguna salada al norte de Maracaibo, Venezuela (10° 45' 05" N, 71° 39' 30" O). Por su parte, la diatomea marina *Chaetoceros* sp. LAEP-35 (Bacillariophyta) fue aislada del golfo de Cariaco, Venezuela (10° 29' 35" N, 62° 38' 56" O). Esta cepa de *Chaetoceros* posee buenas condiciones para la alimentación de larvas de bivalvos (8). *Chroomonas* ha sido usada en ensayos de alimentación de *Artemia*, con excelentes resultados en cuanto a valor nutricional (9).

Los cultivos por triplicado se crecieron en frascos de 350 mL con 200 mL de agua de mar estéril (salinidad 35‰) enriquecida con nutrientes a una concentración de 8 mmol (nitrato) N L⁻¹; con una relación N:P de 20:1 (10). Los frascos fueron inoculados a una densidad celular de 2 × 10⁶ cel mL⁻¹, y mantenidos a 29 ± 2°C, aireación constante, fotoperiodo 12:12 h y 156 μmol quanta m⁻² s⁻¹ de irradiancia con lámparas fluorescentes.

Cultivos semicontinuos

El régimen semicontinuo inició una vez que los cultivos alcanzaron el pico de crecimiento de la fase exponencial, renovando el 5, 10 y 20% del volumen de cultivo de forma diaria. La renovación se llevó a cabo durante las primeras horas del periodo de luz con agua de mar estéril enriquecida con nutrientes a la concentración inicial. Los cultivos se mantuvieron en el sistema semicontinuos durante 15 días, luego de alcanzar una densidad celular de estabilización sin variaciones significativas.

Medidas de crecimiento

La densidad celular se determinó por recuento al microscopio usando un hematocitómetro Neübauer. La biomasa se cosechó por centrifugación a 12 × 10³ g por 10 min. Se utilizaron muestras congeladas a -20°C para todos los análisis bioquímicos, excepto para pigmentos, que se realizaron con muestras frescas. La masa seca se determinó usando un sistema de filtración Millipore© con filtros de fibra de vidrio de 0,45 μm, de acuerdo con el método de Utting (11).

Análisis bioquímicos

El contenido de proteína fue determinado por el método Folin modificado por Herbert *et al.* (12). Los pigmentos fueron medidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando en método descrito por Vidussi *et al.* (13). Se utilizó para ello una columna Agilent Hypersil MOS (4,6 × 100 mm, 5 μm de tamaño de partícula), con estándares para la calibración y cuantificación de los pigmentos (clorofila *a* y β-caroteno de Sigma, zeaxantina de DHI Water & Environment).

Los carbohidratos fueron medidos por el método de fenol-ácido sulfúrico (14). El contenido de lípidos fue determinado por el método de carbonización simple (15).

La productividad celular y de metabolitos corresponde al número de células o la concentración obtenida del metabolito, por litro de cultivo, por día; y está relacionada con la tasa de renovación aplicada al cultivo (expresado como cel (o mg) L⁻¹ d⁻¹).

Análisis estadístico

Fueron llevados a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 10.0, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Sheffé para examinar las diferencias en densidad celular y composición bioquímica entre los tratamientos probados.

Resultados y discusión

La densidad celular de estabilización disminuyó con el aumento de las tasas de renovación en los cultivos de *Chroomonas* sp. Los mayores valores fueron alcanzados a la tasa del 5% con $101,6 \pm 11,65 \text{ cel mL}^{-1}$ con diferencia significativa ($p < 0,05$). Por otro lado, *Chaetoceros* sp. mostró un aumento de la densidad celular con la tasa de renovación entre 5 y 10%. La densidad celular más elevado de $6,1 \pm 0,28 \text{ cel mL}^{-1}$ se obtuvo a la tasa del 10% (figura 1).

Chroomonas sp. y *Chaetoceros* sp. demostraron su capacidad de mantener una producción de biomasa diaria en cultivos semicontinuos a tasas de renovación bajas e intermedias. Durante el régimen semicontinuo, el cultivo puede ser manipulado con ingreso diario de nutrientes, de acuerdo con la tasa de renovación. Con este proceso, las condiciones fisiológicas de las células se mantienen similares a las células que se encuentran en fase exponencial de crecimiento (16).

La tasa de renovación es una herramienta valiosa para el control de la productividad de biomasa y metabolitos en microal-

gas durante la densidad celular de estabilización en cultivos semicontinuos. Cada tasa de renovación modula la actividad metabólica de las células en relación a la disponibilidad de nutrientes y la intensidad luminosa efectiva (17). La alta eficiencia de la producción de biomasa de la microalga a las diferentes tasas de renovación le permite alcanzar una tasa de crecimiento suficientemente alta como para regenerar la población celular cada 24 h. Esta producción sostenida aplica de igual forma al resto de los metabolitos (18).

Un aumento en la densidad celular de estabilización con la tasa de renovación en cultivos semicontinuos ha sido previamente reportado en otras microalgas como *Dunaliella tertiolecta*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Porphyridium cruentum*, *Nannochloropsis* sp., y en otras cepas de *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp. (3, 5, 6, 16) y en la cianobacteria *Spirulina* (19).

La masa seca disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con la tasa de renovación en los cultivos de *Chroomonas* sp., con los mayores valores a una tasa de renovación del 10%, con $1,3 \pm 0,10 \text{ mg mL}^{-1}$. Los cultivos de *Chaetoceros* produjeron los máximos de

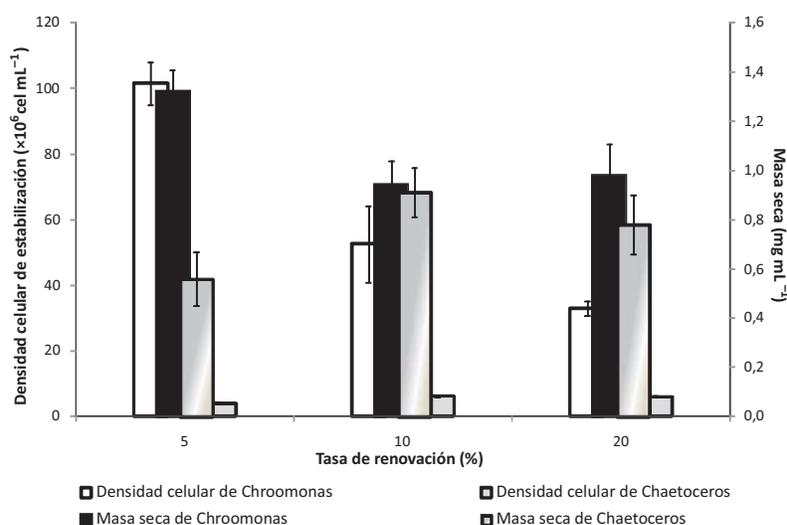


Figura 1. Densidad celular de estabilización y masa seca de *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp. en cultivos semicontinuos a diferentes tasas de renovación.

masa seca a 10% con $0,9 \pm 0,27 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,05$) (figura 1).

El contenido de clorofila *a*, β -caroteno y proteínas fue inversamente proporcional a la tasa de renovación para *Chroomonas*, con los mayores valores de clorofila *a* de $30,9 \pm 1,83$, carotenoides de $11,3 \pm 0,54$ y proteínas de $402,34 \pm 6,56 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; alcanzados a la tasa de renovación más baja (5%) (figu-

ra 2). La misma tendencia se observó con los lípidos y carbohidratos totales, de $450,0 \pm 11,14$ y $90,4 \pm 3,66 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente ($p < 0,05$). Estos valores fueron 2,3; 2,75; 1,9; 1,3 y 1,8 veces mayores que los obtenidos a la tasa de renovación más alta para clorofila *a*, β -caroteno, proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente (figuras 2 y 3).

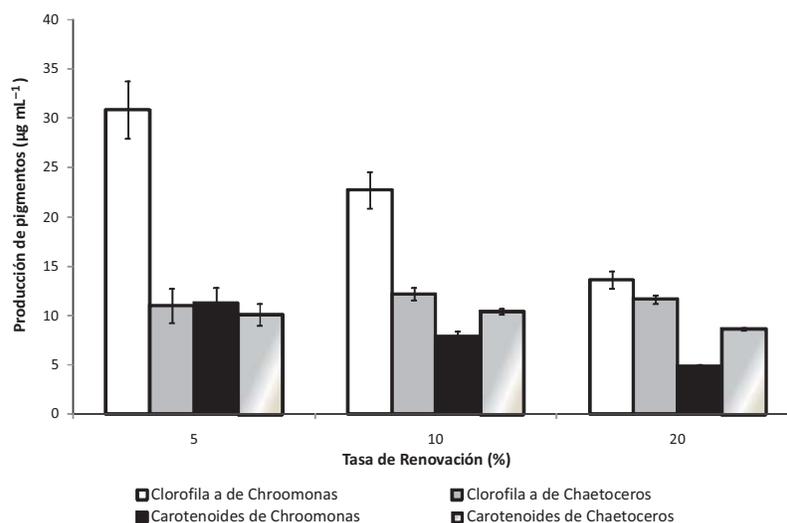


Figura 2. Producción de clorofila *a* y carotenoides de *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp. en cultivos semicontinuos a diferentes tasas de renovación.

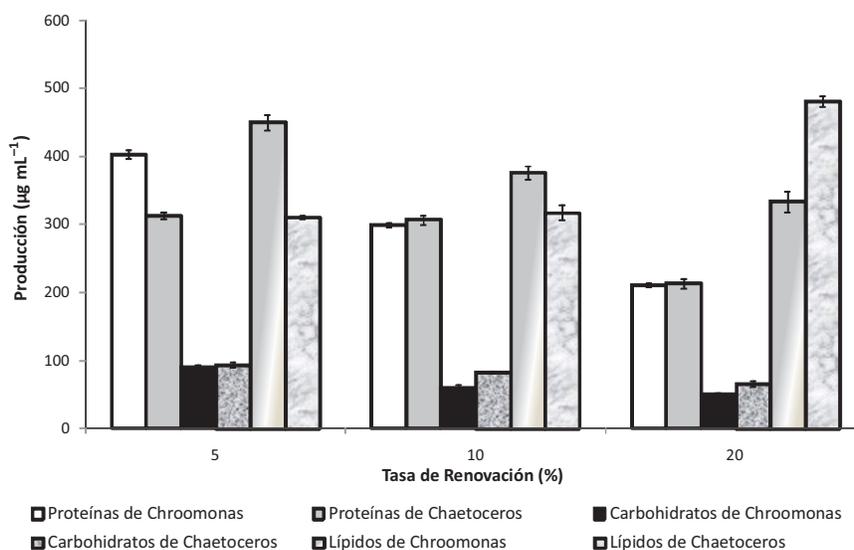


Figura 3. Producción de proteínas, lípidos y carbohidratos en cultivos semicontinuos a diferentes tasas de renovación de *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp.

Para *Chaetoceros* sp. los mayores valores de clorofila *a*, β -caroteno y proteínas se obtuvieron a tasas de renovación intermedias (10%) con $12,2 \pm 0,4$; $10,4 \pm 0,13$ y $306,5 \pm 6,37 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente y con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). El contenido de lípidos fue mayor a la tasa de renovación del 20% con $480,7 \pm 8,26 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que el de carbohidratos fue mayor a 5% con $93,5 \pm 4,52 \mu\text{g mL}^{-1}$ (figuras 2 y 3).

Una disminución en el contenido de pigmentos con el aumento de la tasa de renovación se observó en el presente estudio. La elevada síntesis de clorofila a bajas tasas de renovación es debida a la limitación por luz (7). A tasas de renovación altas, se dispone de mayor irradiancia debido al incremento del flujo de fotones. Así, la cantidad de pigmentos necesarios para optimizar la tasa de fotosíntesis es baja, lo que resulta en un contenido bajo de pigmentos (7).

La disponibilidad de nitrógeno podría ser otro factor que afecta la acumulación de carotenoides en microalgas. Las altas concentraciones de nutrientes mejoran la acumulación de luteína en la microalga *MurIELlopsis* sp., lo cual puede reflejar una necesidad de la síntesis continuada para el soporte de la acumulación de este carotenoide (20).

El contenido de proteínas por *Chroomonas* bajo el régimen semicontinuo depende de la densidad celular. A la tasa de renovación más baja, con las más bajas tasas de crecimiento y concentración de nutrientes, el contenido de proteínas es el más alto. En cambio, a la tasa del 50%, las células se duplican a tasas de crecimiento y concentración de nutrientes más altas, el contenido de proteínas es bajo. La disminución del contenido de proteínas con la tasa de renovación bajo condiciones saturadas de nitrógeno también ha sido observada en la microalga *Nannochloropsis gaditana* (4).

La disminución del contenido de carbohidratos con la tasa de renovación ha sido

descrita en la microalga *Phaeodactylum tri-cornutum* (1). En cultivos a bajas tasas de renovación las células comienzan la acumulación de sustancias de reserva en forma de azúcares, tal como ocurre en cultivos masivos a bajas concentraciones de nutrientes (20). La productividad de carbohidratos y la tasa de renovación son inversamente proporcionales, debido a su uso como fuente primaria de energía (1).

La productividad del sistema, medido como las células producidas por litro de Cultivo por día, fue mayor a la tasa de renovación más alta. Los mayores valores de $6,6 \pm 0,32$ y $1,2 \pm 0,32 \cdot 10^9 \text{ cel L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ se obtuvieron a la tasa del 20% para *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp., respectivamente (tabla 1). De la misma forma, la máxima productividad de masa seca de $196,0 \pm 16,00$ y $156,0 \pm 18,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, para estas microalgas, se alcanzó a la mayor tasa de renovación del 20% ($p > 0,05$, tabla 1).

Para estas microalgas, las máximas productividades de metabolitos se alcanzaron a la tasa del 20%, con valores de $2,7 \pm 0,16$ y $2,3 \pm 0,05$ para clorofila *a*; $1,0 \pm 0,06$ y $1,7 \pm 0,11$ para β -caroteno; $42,2 \pm 0,54$ y $42,7 \pm 1,55$ para proteínas; $10,0 \pm 0,56$ y $13,1 \pm 0,74$ para carbohidratos; y $66,7 \pm 2,96$ y $96,1 \pm 1,65 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para lípidos, en cultivos de *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp., respectivamente (tabla 1).

Las altas productividades de proteínas obtenidas a tasas intermedias de renovación podrían indicar que estas microalgas parecen optimizar la síntesis de proteínas a esta tasa de renovación, lo cual es el principal factor relacionado con los cambios en el contenido proteico en cultivos de microalgas (7).

El método semicontinuos es, por tanto, considerado como una herramienta útil en el cultivo de microalgas, rindiendo una calidad nutricional apropiada para el desarrollo normal de los organismos cultivados. Esto es respaldado por los resultados obtenidos

Tabla 1
Productividad celular ($\times 10^9$ cel L⁻¹ d⁻¹), masa seca, clorofila *a*, carotenoides, proteínas, carbohidratos y lípidos (mg L⁻¹ día⁻¹) en cultivos semicontinuos a diferentes tasas de renovación (%) de *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp.

	<i>Chroomonas</i> sp.			<i>Chaetoceros</i> sp.		
	5%	10%	20%	5%	10%	20%
Celular	5,1±0,58	5,3±0,23	6,6±0,32	0,2±0,02	0,6±0,03	1,2±0,32
Masa seca	66,0±5,00	94,0±13,00	196,0±16,00	28,0±5,00	91,0±12,00	156,0±18,00
Clorofila <i>a</i>	1,5±0,09	2,3±0,09	2,7±0,16	0,6±0,03	1,2±0,04	2,3±0,05
Carotenoides	0,6±0,03	0,8±0,02	1,0±0,06	0,5±0,02	1,0±0,01	1,7±0,11
Proteínas	20,1±0,33	29,9±0,31	42,2±0,54	15,6±0,26	30,7±0,64	42,7±1,55
Carbohidratos	4,5±0,18	6,0±0,48	10,0±0,56	4,7±0,23	8,3 ±0,11	13,1±0,74
Lípidos	22,5±0,56	37,6±0,98	66,7±1,96	15,5±0,14	31,7±1,12	96,1±1,65

por Núñez y col. (8), que *Chaetoceros* sp. es una fuente alimenticia apropiada para la alimentación de larvas de camarón (*Litopenaeus vannamei*) con una alta tasa de sobrevivencia (76%). Por otro lado, el uso de otras cepas de *Chroomonas* en ensayos de alimentación de juveniles de *Crassostrea gigas* produjo incrementos significativos en la biomasa (>50%) de estos bivalvos (21).

El uso de estas cepas de *Chaetoceros* y *Chroomonas* como fuente de alimento de larvas de bivalvos marinos es recomendado debido a la fácil ingestión, gracias a su pequeño tamaño (cerca de 5 y 7 μ m), el cual está dentro del rango sugerido por Doroudi y col. (21), aunque es necesario determinar la digestión y la asimilación de las mismas.

Los resultados sugieren que *Chroomonas* sp. y *Chaetoceros* sp. pueden ser usadas a tasas de renovación bajas e intermedias para la producción diaria de pigmentos, proteínas, carbohidratos y lípidos. Se demostró que las tasas de renovación ejercen control sobre la productividad y la composición bioquímica de la biomasa en cultivos semicontinuos. Además es de gran interés determinar el potencial de estas microalgas en el cultivo de crustáceos y bivalvos.

Referencias bibliográficas

- FÁBREGAS J., PATIÑO M., MORALES E., CORDERO B., OTERO A. *Appl Environ Microbiol* 62: 266-268. 1996.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ E., SOUTHGATE P. *Aquaculture* 263: 220-226. 2007.
- PERNET F., TREMBLAY R., DEMERS E., ROUSSY M. *Aquaculture* 221: 393-406. 2003.
- FÁBREGAS J., MASEDA A., DOMÍNGUEZ A., OTERO A. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 31-35. 2004.
- BERMÚDEZ J., ROSALES N., LORETO C., BRICEÑO B., MORALES E. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 179-183. 2004.
- LEMUS N., URBANO T., ARREDONDO-VEGA B., GUEVARA M., VÁSQUEZ A., CARREÓN-PALAU L., VALLEJO N. *Cien Mar* 32: 597-603. 2006.
- HERRERO C., ABALDE J. *Biotecnología y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentados*. Servicio de Publicacións, Universidade Da Coruña, España. p. 119-130. 1998.
- NÚÑEZ M., LODEIROS C., DE DONATO M., GRAZIANI C. *Aquacult Int* 10: 177-187. 2002.

9. BERMÚDEZ J. Producción de biomasa a partir de la microalga *Chroomonas sp.*, de interés en acuicultura. Para Obtener el título de Licenciado en Biología. Universidad del Zulia, 105 pp. 2000.
10. FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B., VEIGA M. **Aquaculture** 42: 207-215. 1984.
11. UTTING S. **Aquacul Engin** 4: 175-190. 1985.
12. HERBERT D., PHIPPS P., STRANGE R. **Chemical analysis of microbial cells, en: Methods in Microbiology**. Academic Press. Londres. p. 209-344. 1971.
13. VIDUSSI F., CLAUSTRÉ H., BUSTILLOS J., CAILLIAU C., MARTY J. **J Plankt Res** 18: 237-282. 1996.
14. KOCHERT G. Quantification of macromolecular components of microalgae, en: **Handbook of Phycological Methods**. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. p. 189-195. 1978.
15. MARSH J., WEINSTEIN D. **J. Lipid Res** 7: 574-576. 1966.
16. FÁBREGAS J., PATIÑO M., ARREDONDO B., TOBAR J., OTERO A. **Appl Microbiol Biotechnol** 44: 287-292. 1995.
17. PEDROSA BEZERRA R. ORTIZ E., SATO S., PEREGO P., MONTEIRO J., CONVERTI A. **Biores Technol** 102(3): 3215-3219. 2011.
18. ROSALES N., LORETO C., BERMÚDEZ J., MORALES E. **Cryptogamie Algal** 25: 207-216. 2004.
19. MORAIS M., RADMANN E., ANDRADE M., TEIXEIRA G., BRUSCH L., COSTA J. **Aquaculture** 294: 60-64. 2009.
20. DEL CAMPO J., MORENO J., RODRÍGUEZ H., VARGAS M., RIVAS J., GUERRERO M. **J Biotechnol** 76: 51-59. 2000.
21. DOROUDI M., SOUTHGATE P., LUCAS J. **Aquacult Nutr** 9: 11-16. 2003.