

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS



CULTIVO Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LA MICROALGA  
*Nannochloropsis oculata* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE  
TEMPERATURA E INTENSIDAD DE LUZ

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE  
TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciada en Biología

PRESENTA  
MARCELA DEL ROSARIO SARACCO ALVAREZ  
Las Agujas, Zapopan, Jal., Diciembre de 2003

---



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. MARCELA DEL ROSARIO SARACCO ALVAREZ  
**PRESENTE.**

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis con el título: "**CULTIVO Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA E INTENSIDAD DE LUZ**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **MARCELA DEL ROSARIO SARACCO ALVAREZ** y Asesor el/la **M.C. MARÍA DEL REFUGIO MORA NAVARRO**.

**A T E N T A M E N T E**

**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 29 de Octubre del 2003

**DRA. MÓNICA ELIZABETH RÍOS LÓPEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LOPEZ**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DRA. BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL**.-Director del Trabajo.  
c.c.p. **M.C. MARÍA DEL REFUGIO MORA NAVARRO**.-Asesor del Trabajo.  
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

**C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACIÓN DE LA**  
**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**  
**P R E S E N T E.**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación que realizó el (la) pasante **Marcela del Rosario Saracco Alvarez** con el título: **“Cultivo y composición proximal de la microalga *Nannochloropsis oculata* bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz”**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de presentación y defensa del mismo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal.,

Diciembre de 2003.

Director(a) del Trabajo

Asesor(a)

  
Dra. Beatriz Cordero Esquivel



  
M.C. Maria del Refugio Mora Navarra

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**SINODALES**

1. Rios Jara Eduardo
2. Robles Jarero Elva Guadalupe
3. Ruiz López Mario Alberto
4. Supl. Mora Navarro Maria del Refugio





Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de  
Ensenada

**Directora de tesis: Dra. Beatriz Cordero Esquivel**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por regalarme la vida y la oportunidad de descubrir nuevos horizontes.

A mi Alma Mater, La Universidad de Guadalajara, particularmente al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, por las bases académicas que me ha dado para mi formación profesional y en especial al Laboratorio de Ficología, donde realicé mi servicio social y se me encamine al mundo de las microalgas.

Al CICESE por aceptarme para la realización de mis prácticas profesionales, tesis de licenciatura y maestría.

A mi directora de tesis, la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por sus observaciones, sugerencias, paciencia, apoyo y amistad durante la realización de esta tesis.

A mis revisores de tesis Cuquita, Lupita, Eduardo y Mario Alberto por sus excelentes observaciones y su paciencia.

A la M.C. María del Refugio Mora Navarro por todo su apoyo, comprensión y cariño durante mi servicio social. Gracias por iniciarme en el mundo de las microalgas. También a mis compañeros de servicio Erika, Pilar y Malik

A Norberto Flores, Paty Ascensio y Nallely Cerón por ayudarme en esos problemitas que surgen en el laboratorio y por hacerme sentir como en casa.

A mis compañeros de laboratorio Pili, Shashenka, Carmen, Bily, Carlos, Jorge, Manuel y Elena por su amistad y apoyo. A mis compañeros de penas Ruth y Jaime

A todos aquellos que me preguntaron por mi tesis.

Y a los "cinco malditos" y "anexos" por no olvidarme.

## DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a aquellas dos "personitas" que me enseñaron todo lo necesario para seguir adelante y para conducirme por el buen camino.

Por su confianza, apoyo y esfuerzos que me brindaron durante los buenos y los malos momentos.

A mis padres:

María del Rosario Álvarez Rubio

Y

Mario Jorge Saracco Torres

A mis hermanos por estar siempre conmigo, por su apoyo, por sus regaños, golpes y principalmente por su amor.

Por compartir nuestras vidas.

David, Carlos, Ricardo y Mario

A mis abuelitas que aunque no entiendan bien mis estudios siempre me apoyaron: María del Refugio Rubio y Mercedes Torres.

A la memoria de mis abuelitos que extraño y que tengo en mi corazón: Juan Álvarez y Valerio Saracco.

Gracias a toda mi familia por soportarme y apoyarme en todo momento.

## RESUMEN

Se estudió el crecimiento y la composición proximal de *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) con diferentes temperaturas (22 y 25 °C) e intensidades de luz (140, 210 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) utilizando el medio "F" formulado por Guillard y Ryther (1962). Para cada tratamiento se tuvieron tres repeticiones. El crecimiento en sistema estático presentó diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ( $p < 0.001$ ), obteniendo una biomasa mayor para la temperatura de 25 °C y la intensidad mayor (300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de  $36560 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ . En general la fase exponencial inició un día después del inóculo y con una duración aproximada de tres días. Las diluciones ensayadas para los diferentes tratamientos presentaron un comportamiento común, la del 20% mostró un incremento en la biomasa celular, por el contrario la dilución el 30% presentó un decremento en la biomasa. La biomasa obtenida con base al peso seco total y orgánico mostró diferencias significativas entre las temperaturas ensayadas ( $p = 0.046$ ), sin embargo no existieron diferencias significativas entre las intensidades utilizadas ( $p > 0.05$ ). Se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.023$ ) entre las temperaturas ensayadas en los valores de proteínas, pero no hubo diferencias significativas entre las intensidades ( $p = 0.943$ ). El contenido de carbohidratos no presentó diferencias entre los tratamientos ensayados. Existen diferencias significativas ( $p = 0.005$ ) entre las concentraciones obtenidas para las tres intensidades de luz, por el contrario se observaron diferencias significativas ( $p = 0.144$ ) entre las temperaturas ensayadas. Se observó un mayor crecimiento y composición proximal con la temperatura mayor (25 °C) y la intensidad de luz más alta (300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).



**CONTENIDO**

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	7
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. HIPÓTESIS	14
V. OBJETIVO GENERAL	15
V.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	16
VI.1 <i>Selección de cepa</i>	16
VI.2 <i>Técnica de cultivo</i>	16
VI.3 <i>Análisis de biomasa</i>	18
VI.3.1 <i>Conteos celulares y densidad óptica</i>	18
VI.3.2 <i>Peso seco total y orgánico</i>	19
VI.3.3 <i>Composición proximal</i>	20
VI.4 <i>Análisis de resultados</i>	21
VII. RESULTADOS	22
VII.1 <i>Análisis de biomasa</i>	22
VII.1.1 <i>Cultivo estático</i>	22
VII.1.2 <i>Cultivo semicontinuo</i>	30
VII.2 <i>Peso seco total y orgánico</i>	37
VII.3 <i>Composición proximal</i>	40
VIII. DISCUSIONES	45
IX. CONCLUSIONES	52
LITERATURA CITADA	54

## LISTADO DE CUADROS

	Página
I. Biomasa de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada a 22 °C en sistema estático y con tres intensidades de luz (140, 210 y 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). A: Densidad Óptica, B: $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ ( $\times 10^3$ ), $\mu$ : tasa de crecimiento.	23
II. Biomasa de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada a 25 °C en sistema estático y con tres intensidades de luz (140, 210 y 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). A: Densidad Óptica, B: $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ ( $\times 10^3$ ), $\mu$ : tasa de crecimiento.	24
III. Biomasa ( $\times 10^3$ $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada a 22 °C en cultivo semicontinuo con tres diferentes intensidades de luz. El cultivo semicontinuo inició a partir del día seis de cultivo.	31
IV. Biomasa ( $\times 10^3$ $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada a 25 °C en cultivo semicontinuo con tres diferentes intensidades de luz. El cultivo semicontinuo inició a partir del día cinco.	35
V. Peso seco total (PST) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), peso seco orgánico (PSO) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y porcentaje de cenizas de <i>Nannochloropsis oculata</i> a 22 °C (desviación estándar entre paréntesis), mantenida en cultivo estático y semicontinuo con diferentes intensidades de luz. A; 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y C; 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .	39
VI. Peso seco total (PST) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), peso seco orgánico (PSO) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y porcentaje de cenizas de <i>Nannochloropsis oculata</i> a 25 °C (desviación estándar entre paréntesis), mantenida en cultivo semicontinuo con diferentes intensidades de luz. A; 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y C; 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .	40

## LISTADO DE FIGURAS

	Página
1. Curva de crecimiento patrón de una microalga unicelular en un cultivo estático: 1) fase lag, 2) fase exponencia, 3) fase de crecimiento lento, 4) fase estacionaria, 5) fase de muerte. (Tomado de Fogg, 1975).	6
2. Crecimiento de <i>Nannochloropsis oculata</i> en cultivo estático, a una temperatura de 22 °C y con tres intensidades de luz. (◊) 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , (◻) 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y ( $\Delta$ ) 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .	25
3. Crecimiento de <i>Nannochloropsis oculata</i> en cultivo estático, a una temperatura de 25 °C y con tres intensidades de luz. (◊) 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , (◻) 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y ( $\Delta$ ) 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .	25
4. Relación entre el número de células y densidad óptica (unidades de absorbancia) de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada a 22 °C y con diferentes intensidades de luz. A; 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y C; 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en sistema estático. (◊) representa las unidades de absorbancia (D.O.) y (◻) $\text{cél}\cdot\text{m}^{-1}$ ( $\times 10^3$ ).	28
5. Análisis de regresión ( $\text{cél}\cdot\text{m}^{-1}$ vs D.O.) de <i>Nannochloropsis oculata</i> en cultivo estático. A; 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y C; 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .	29
6. Cultivo semicontinuo de <i>Nannochloropsis oculata</i> a 22 °C, con diferentes intensidades de luz. A; 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y C; 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . D.O.: unidades de absorbancia.	32
7. Cultivo semicontinuo de <i>Nannochloropsis oculata</i> a 25 °C, con diferentes intensidades de luz. A; 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y C; 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . D.O.: unidades de absorbancia.	36
8. Composición proximal de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada a 22 °C y con diferentes intensidades de luz. (◻) 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , (■) 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y (◻) 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A) proteínas, B) carbohidratos y C) lípidos.	43
9. Composición proximal de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada en sistema estático y semicontinuo a una temperatura de 25 °C y con diferentes intensidades de luz. (◻) 140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , (■) 210 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y (◻) 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A) proteínas, B) carbohidratos y C) lípidos.	44

## **CULTIVO Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA E INTENSIDAD DE LUZ**

### **I. INTRODUCCIÓN**

El crecimiento de la población humana se acentúa más a nivel mundial, por lo que se están manifestando exigencias siempre mayores de niveles más elevados de bienestar (Tacon, 2000). Es por estos motivos que la demanda de alimento crecerá de tal manera que no podrá ser satisfecha en todo el mundo por la agricultura, la ganadería y la pesca, por lo cual la acuicultura parece ser una solución viable para ello (Ayala, 1999).

La acuicultura es una de las actividades de mayor potencial por lo grande de sus perspectivas y condiciones, que tiene por objeto el cultivo y la producción de los recursos hidrobiológicos y conforme la población aumente y la escasez de alimento se haga más aguda, la acuicultura tendrá un papel cada vez más importante ya que ha demostrado ser un método práctico y rentable para abastecer al mundo de recursos acuáticos vivientes que se pueden utilizar como alimentos, fibras y materiales para diversos fines (Wheaton, 1977).

Dentro de la acuicultura se requiere un alto nivel de investigación que sustente el valor comercial de especies de importancia comercial, y que nos ayude a resolver problemas y a conocer la biología de las especies

(Ayala, 1999) debido a que es todavía posible satisfacer las demandas de alimento, por lo menos en lo que se refiere a la disponibilidad de proteínas de origen animal, cuyo consumo promedio individual se ha mantenido aproximadamente constante en el transcurso de las dos últimas décadas, gracias a las aportaciones cada vez mayores de la acuicultura y a los desembarques de las flotas pesqueras internacionales. (De Silva, 2000).

Dentro de la acuicultura existe un área muy importante que es la producción de alimento vivo (fitoplancton y zooplancton).

El fitoplancton está constituido principalmente por algas unicelulares, cuya importante función en el ecosistema marino, es la de captar energía radiante solar para transformarla en energía química, la cual es utilizada para sintetizar y almacenar como nueva biomasa algal varios compuestos químicos de alto contenido energético (lípidos, proteínas y carbohidratos), a partir de sustancias inorgánicas sencillas disueltas en el agua como  $\text{CO}_2$  y compuestos nitrogenados y fosfatados.

De esta manera las microalgas son el primer eslabón de las principales cadenas tróficas acuáticas, ya que aparte de ser la fuente dietética más importante de varios organismos filtradores del bentos, constituyen el alimento único o principal de los consumidores primarios del zooplancton, entre los cuales se encuentran los estadios larvarios

meroplanctónicos de la mayoría de los organismos de interés pesquero y comercial (Margalef y Vives, 1967).

Las microalgas no solamente son utilizadas en la acuicultura como fuente alimenticia, también pueden auxiliar en el mantenimiento de la calidad de agua, pues presentan un papel fundamental en el balance de oxígeno, dióxido de carbono y de compuestos nitrogenados, en especial el amonio (Derner *et al.*, 1994).

En los últimos años el desarrollo de cultivos de microalgas, para uso en la acuicultura, ha establecido su potencial en la producción de compuestos de alto valor económico como son: polisacáridos, lípidos, proteínas, carotenoides, vitaminas, enzimas, antibióticos, farmacéuticos y muchos otros compuestos químicos como: hidrógeno, hidrocarburos y otros biocombustibles como el metano (Becker, 1995).

La manera de cultivar microalgas varía dependiendo de la especie, del tipo de cultivo que se requiere y lo que se busque de éste.

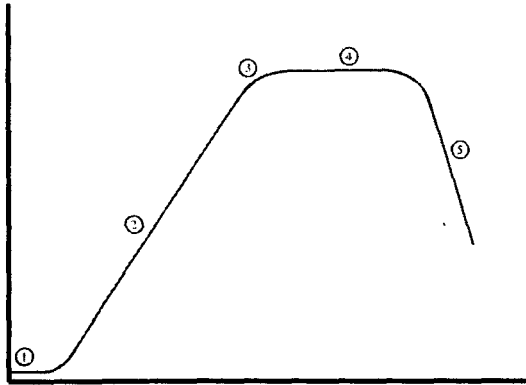
En la mayoría de los casos el tipo de cultivo a utilizar depende de lo que el investigador quiera obtener o del uso final de las microalgas, existen varios tipos de cultivos entre los más comúnmente utilizados se encuentran el cultivo estático, continuo y semicontinuo.

En el primer caso, nada es removido o adicionado después de la inoculación (que debe de ser viable para el volumen a cultivar). Este tipo de cultivo puede soportar el crecimiento celular hasta que se llegue a su densidad mayor o hasta que la composición del medio empiece a ser limitante para éste. En el cultivo continuo se tiene una renovación continua de nutrientes, también constantemente se está cosechando por lo cual el volumen del cultivo se mantiene constante, esto nos permite mantener el cultivo en la fase exponencial, lo cual indica una biomasa constante. Por último, en el sistema semicontinuo, una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial se inicia con una frecuencia de dilución constante (a un tiempo predeterminado), lo cual permite la remoción de nutrientes, dando como resultado una biomasa constante a la fecha de dilución.

En un cultivo estático existen varias fases (Fig. 1) dentro del ciclo de crecimiento de las microalgas: a) la fase lag (bajo incremento de la biomasa) representa un periodo de acondicionamiento a las nuevas condiciones ambientales, la siguiente fase es la exponencial (b) debido

al rápido incremento en la biomasa producido por existir condiciones adecuadas de nutrientes y disponibilidad de luz, principalmente (crecimiento exponencial), la siguiente fase es de crecimiento lento (c) en donde se puede observar un decremento en el crecimiento del cultivo, por limitación de algún nutriente o por limitación de luz (producido por autosombreado debido al aumento de la biomasa) y la fase estacionaria (d) en donde las células empiezan a almacenar substancias de reserva producido principalmente por deficiencia de nitratos y/o silicatos (en el caso de las diatomeas), y la tasa de divisiones disminuye considerablemente hasta dejar de hacerlo. Por último tenemos la fase de muerte (e) en donde la biomasa disminuye drásticamente debido al efecto interactivo de los factores antes mencionados (Fogg, 1975).





Edad del cultivo

Figura. 1 Curva de crecimiento patrón de una microalga unicelular en un cultivo estático: 1) fase lag, 2) fase exponencial, 3) fase de crecimiento lento, 4) fase estacionaria, 5) fase de muerte. (Tomado de Fogg, 1975).

## II. ANTECEDENTES

Las microalgas que se usan en maricultura proveen de nutrimentos esenciales para el crecimiento y desarrollo de animales marinos por lo tanto es muy importante contar con microalgas que tengan una composición bioquímica que satisfagan las diferentes necesidades nutricias de los organismos marinos cultivados en la actualidad (Bustillos *et al.*, 1994).

La diferencia en la digestibilidad, tamaño y particularmente en el valor nutricional de las microalgas utilizadas en acuicultura, dependen de los requerimientos nutricios de los organismos alimentados. El valor nutricional depende directamente de la composición bioquímica y ésta puede ser alterada por medio de la manipulación de las condiciones de cultivo. La composición bioquímica depende de la concentración de nutrientes, de la temperatura, la intensidad lumínica, del fotoperiodo y de la etapa de crecimiento a la hora de cosechar (Brown, 1989).

La determinación de los componentes proximales de diversas especies de microalgas ayuda por un lado a conocer cómo se encuentra la microalga y por el otro es un buen indicativo en la dieta de los organismos marinos (Bustillos, *et al.*, 1994).

Las tasas de crecimiento algal son reguladas por los parámetros ambientales, presentan una respuesta directa a factores como: la intensidad luminosa, la temperatura, la concentración de nutrientes, el pH, etc.

Dicha respuesta es específica para el organismo que se cultive y determina la productividad del sistema, debido a la rápida proliferación de las microalgas (Lanza-Espino y Arredondo, 1990).

La luz es indispensable para la activación de la maquinaria fotosintética, por lo cual cuando la célula no tiene un abastecimiento adecuado de luz, crecerá lentamente, debido a un insuficiente suministro de energía para la fotosíntesis y para la activación de sus unidades fotorreceptoras y cromoreceptoras, las cuales tienen funciones diversas relacionadas con la incorporación de carbono y de nutrientes (Lips y Avissar, 1986), hasta la regulación de sus rutas metabólicas más importantes (Sánchez, 1994; Sánchez y Voltolina 1994).

También la temperatura es una variable importante ya que, al igual que la luz, afecta el metabolismo de las microalgas. En este caso de acuerdo a la ley de Arrhenius y a sus equivalentes (ley de Van Hof del  $Q_{10}$ ) que se establecieron para fines biológicos, su efecto consiste en modificar la velocidad de todas las reacciones enzimáticas que regulan las rutas anabólicas y catabólicas, modificando de esta manera los

requerimientos nutricios y la composición bioquímica de las microalgas (Parsons *et al.*, 1984; Darley, 1987).

Algunas de las microalgas marinas son seleccionadas como productoras potenciales de compuestos bioquímicos, dentro de las cuales se encuentran *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp., *Chlorella minutissima*, *Monodus subterraneus* y *Phaeodactylum tricomutum* (Borowitzka, 1988; Roessler, 1990; Yongmanitachai y Ward, 1991; Bajpai y Bajpai, 1993).

Las especies de *Nannochloropsis* se encuentra entre las microalgas más utilizadas actualmente en el cultivo de rotíferos por su pequeño tamaño (< 2 micras de diámetro), poco tiempo de cultivo y por su alta producción de ácidos grasos polinsaturados, requeridos para la producción de larvas de peces (Hernández *et al.*, 1996).

Las microalgas del género *Nannochloropsis* pertenecen al grupo de las Eustigmatophyceae que se encuentran en arreglos unicelulares coccoides y la mayoría presentan pirenoides y zoosporas aunque existen algunas especies que carecen de estas estructuras. Son microalgas marinas representativas del picoplancton, son unicelulares, sin flagelos y con un solo cloroplasto (Van Den Hoek *et al.*, 1995).

Los principales estudios del género *Nannochloropsis* están encaminados a la determinación de los ácidos grasos (20:5 n-3), principalmente de mayor importancia el ecosapentaenóico debido a su alto contenido y por su utilización dentro de la acuicultura (Sukenik *et al.*, 1989; Sukenik *et al.*, 1990; Brown, 1993).

*Nannochloropsis oculata* se ha cultivado a diferentes temperaturas; dentro de las más elevadas que se han registrado está la de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (promedio durante el día), y dentro de las temperaturas mínimas entre  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  en invierno a  $14\text{ }^{\circ}\text{C}$  en verano (promedio durante la noche), alcanzando una biomasa microalgal al quinto día de  $670 \pm 4.2 \cdot 10^6\text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ , para invierno y de  $876 \pm 5.0 \cdot 10^6\text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  para verano (Cheng-Wu *et al.*, 2001)

Debido a que la composición bioquímica depende directamente de los factores ambientales, la variación de estos últimos conlleva a la variación en la composición de la microalga.

Cuando se cultiva a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  iniciando con un cultivo continuo y después con uno semicontinuo la biomasa microalgal según Brown (1993), llega a ser de aproximadamente  $14 \cdot 10^6\text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Existen diversos estudios acerca de diferentes especies de *Nannochloropsis*, por ejemplo en *Nannochloropsis gaditana* se

encontró una densidad celular de  $49.8 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ , con una temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  en donde se observan las células muy vacuolizadas y con el cloroplasto fragmentado (Hernández *et al.*, 1996).

Para *Nannochloropsis salina* cultivada a una temperatura de  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  se reportó la siguiente composición bioquímica 23.3 % de proteína, 24.4 % de carbohidratos y 14.5 % de lípidos.

*Nannochloropsis oculata* es una microalga que contiene menos porcentaje de proteínas (29-33%), comparándola con otras especies como *Isochrysis* sp. y *Pavlova lutheri*, con porcentajes de lípidos de 15-16% y 12% para carbohidratos (Brown, 1993).

Renaud *et al.* (1991) encontró en *Nannochloropsis oculata* cultivada bajo una temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y una intensidad de  $243 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , que la composición proximal promedio de:  $2.4 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de proteínas,  $0.2 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de carbohidratos y  $1.2 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de lípidos, para la intensidad de 340 reportó  $2.7 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de proteínas,  $0.3 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de carbohidratos y  $1.5 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de lípidos. Y para la intensidad de  $100\text{-}107 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  encontró  $2.4 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de proteína,  $0.1 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de carbohidratos y  $2.1 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  de lípidos.

Tanto la fotoinhibición como la saturación de luz en *Nannochloropsis oculata* crea una disminución en el crecimiento, esto quiere decir que esta microalga es sensible a la luz alta (Sukenik *et al.*, 1989).

El contenido lipídico varía de acuerdo a la intensidad lumínica, Sukenik *et al.* (1989) reportaron para *Nannochloropsis* sp. una concentración de  $2.62 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$  a  $35 \text{ } \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $290 \text{ } \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  encontró  $3.25 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$  y para  $550 \text{ } \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$   $3.04 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ .

### III. JUSTIFICACIÓN

Los recursos pesqueros se están agotando debido al incremento en la pesca y por lo tanto el surgimiento de técnicas en acuicultura pueden ser una alternativa para solucionar algunos problemas alimenticios. Siendo las microalgas la base en la acuicultura; ya que éstas son las productoras primarias y por lo tanto el primer eslabón en la cadena alimenticia, es primordial el optimizar el cultivo de microalgas que tengan un rápido crecimiento y que además posean una adecuada composición bioquímica que cumpla con los requerimientos nutricios de los organismos en cultivo. La microalga *Nannochloropsis oculata* es una candidata ideal, por su uso potencial para la alimentación de rotíferos, los cuales son utilizados posteriormente para la alimentación de peces de importancia económica.

Por lo anterior es necesario elegir las mejores condiciones para su cultivo, que aseguren un suministro continuo de éstas y con una calidad ideal para la producción de organismos, además de su actual uso en el mejoramiento de la calidad de agua (estabiliza la calidad del agua en sistemas estáticos, remueve metabolitos y produce CO<sub>2</sub>), para el cultivo de otras especies como la langosta.



#### IV. HIPÓTESIS

Las diferentes temperaturas e intensidades de luz repercuten directamente en el crecimiento y la composición proximal de *Nannochloropsis oculata*.

## V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento y la composición proximal de *Nannochloropsis oculata* en diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz.

### V.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar el efecto de tres diferentes intensidades de luz sobre el crecimiento de *Nannochloropsis oculata*.

Evaluar el efecto de dos temperaturas sobre la velocidad de crecimiento de *Nannochloropsis oculata*.

Determinar la tasa de dilución óptima para *Nannochloropsis oculata*.

Determinar la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) de *Nannochloropsis oculata*, cultivada a diferentes temperaturas e intensidades de luz.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI. 1 Selección y obtención de la cepa

La microalga marina que se utilizó en el presente trabajo es *Nannochloropsis oculata* (clave NN-O1), la cual se obtuvo de la Colección de Microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

### VI. 2 Técnica de cultivo

Para el cultivo de *Nannochloropsis oculata* se utilizó el medio "F" formulado por Guillard y Ryther (1962).

El cultivo de las microalgas se inició con inóculos sucesivos (escalamientos) partiendo de la cepa de 10 ml de cultivo continuando con 100 ml, 2 y 15 L. El agua de mar que se utilizó se filtró a través de cartuchos de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ , posteriormente se pasó por luz UV. Para el caso de volúmenes pequeños, el agua de mar se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 PSI durante 15 minutos. Para los cultivos de mayor volumen (15 L), la esterilización fue química, agregando 3 ml de cloro comercial por cada litro de agua de mar y se dejó reposar durante 24 horas, posteriormente se le agregó tiosulfato de sodio (150  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de agua de mar), para neutralizar el cloro residual, acelerando este

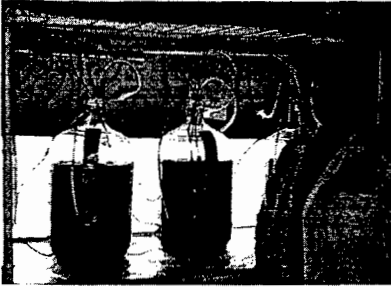
proceso con aireación continua; el aire circuló por filtros de carbón activado para evitar contaminación.

Una vez esterilizada el agua de mar se le agregaron las soluciones secundarias del medio "F" ( $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$  por litro de agua de mar)



#### Escalamiento de cultivos de *Nannochloropsis oculata*

Se ensayaron 2 diferentes temperaturas  $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente del laboratorio húmedo) y  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (temperatura controlada por calentadores de  $25\text{W}$  y moderadas por un regulador LCT-1500W) y tres intensidades de luz:  $140$ ,  $210$  y  $300 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (proporcionadas con lámparas fluorescentes de luz blanca fría), además se mantuvieron en las siguientes condiciones: salinidad de  $35\text{‰}$  y un pH  $7.5\text{-}8.5$  (el cual se controló con inyección de  $\text{CO}_2$ ). En cada tratamiento se tuvieron, tres repeticiones, cada una representada por botellones de  $20 \text{ L}$  (de vidrio transparente) con un volumen útil de  $15 \text{ L}$ .



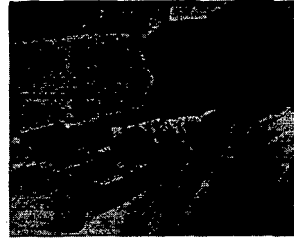
Cultivo de *Nannochloropsis oculata* con diferentes temperaturas e intensidades de luz

### VI.3 Análisis de biomasa

Los cultivos se iniciaron con un inóculo de  $1 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup> para cada tratamiento, con monitoreos diarios de pH, número de células y lectura de absorbancia a 550 nm.

#### VI.3.1 Conteos celulares y densidad óptica

El conteo celular se realizó con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, adaptado con una reglilla y la densidad óptica (absorbancia) se midió en un espectrofotómetro Hach DR 2000. Posteriormente se realizó un análisis de regresión, para explorar la posibilidad de utilizar solo el método de densidad óptica, para evaluar la biomasa producida por la dificultad que representa el conteo celular, debido al pequeño tamaño de *Nannochloropsis oculata*.



Evaluación de la biomasa de *Nannochloropsis oculata*. Conteo celular y medición de la densidad óptica

Inicialmente los cultivos se mantuvieron en sistema estático (sin remoción de microalgas) y una vez que se alcanzó la fase de máximo crecimiento exponencial se inició el cultivo semicontinuo aplicando dos diferentes tasas de dilución (20 y 30%), para obtener la dilución óptima para *Nannochloropsis oculata*. La renovación se hizo con agua de mar estéril y enriquecida con medio "F".

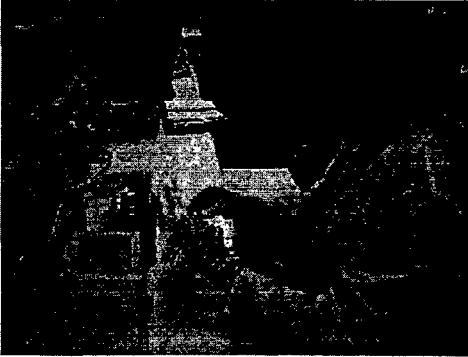
### VI.3.2 Peso seco total y orgánico

Para la determinación de la biomasa con base al peso seco total y orgánico se tomaron volúmenes conocidos de los cultivos durante la fase exponencial cada tres o cuatro días. Estos se filtraron a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio, de 47 mm de diámetro, previamente incinerados en una estufa y pesados. Al filtrar, las muestras se lavaron con formiato de amonio al 3% para la eliminación de sales. Los filtros con la muestra se colocaron en una estufa a 60°C

hasta obtener el peso seco constante, posteriormente se calcinaron en una mufla por 4 h a 490°C para la determinación de cenizas y por diferencia entre el peso seco total y las cenizas se obtuvo el peso seco orgánico (Sorokin, 1973).

### VI.3.3 Composición proximal

Para la realización de los análisis proximales (proteínas, carbohidratos y lípidos), de las microalgas producidas, cada tres o cuatro días se cosecharon volúmenes conocidos y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio (GF/C) de 2.5 cm de diámetro. Las técnicas utilizadas fueron: proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951) previa extracción con NaOH 0.1N, los carbohidratos se analizaron según el método colorimétrico del fenol-ác. sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), los lípidos se determinaron por el método de Pande *et al.* (1963), previa extracción con el método de Bligh y Dyer (1959). Para las curvas de calibración se utilizaron como estándares, albúmina de bovino en el caso de las proteínas, glucosa anhidra para carbohidratos y tripalmitina para lípidos.



Análisis de la composición proximal de *Nannochloropsis oculata* por medio de métodos colorimétricos.

#### VI.4 Análisis de Resultados

Los resultados del crecimiento, peso seco (total y orgánico) y composición proximal de los cultivos de *Nannochloropsis oculata* se sometieron a un análisis de normalidad de datos y de homogeneidad de varianzas, posteriormente para los que cumplieron los supuestos de normalidad se aplicó un análisis de varianza de tres vías y pruebas a posteriori para encontrar las posibles diferencias entre tratamientos.



## VII. RESULTADOS

### VII.1 Análisis de la biomasa

#### VII.1.1 Cultivo estático

En la biomasa obtenida en *Nannochloropsis oculata* mantenida en sistema estático se observaron diferencias significativas entre las dos temperaturas (22 y 25 °C) y las tres intensidades de luz (140, 210 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), así como en la interacción entre ambas ( $p<0.001$ ), así mismo se observaron diferencias en la biomasa registrada en los diferentes días ( $p<0.001$ ), en que se mantuvo el cultivo (Cuadros I y II y Fig. 2 y 3).

No se observaron diferencias significativas entre las dos temperaturas con los diferentes días ( $p=0.549$ ), sin embargo, sí se registraron diferencias entre las intensidades de luz y los días de cultivo ( $p<0.001$ ).

Con ninguno de los tratamientos se registraron diferencias significativas en la biomasa obtenida en los tres primeros días, sin embargo, en los días cuatro y cinco, se obtuvieron biomásas menores en los cultivos mantenidos con la intensidad de luz más baja (140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), registrando en promedio (por las dos temperaturas),  $8593 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  para el día 4 y  $11440 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  para el día 5.

En la temperatura de 22 °C no se observaron diferencias significativas en las biomásas obtenidas en las intensidades de luz de 210 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $p>0.05$ ), sin embargo, en 25 °C sí se observaron diferencias entre estas dos intensidades de luz ( $p<0.001$ ).

Cuadro I. Biomasa de *Nannochloropsis oculata* cultivada a 22 °C en sistema estático y con tres intensidades de luz (140, 210 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). A: Densidad Óptica, B:  $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $\times 10^3$ ),  $\mu$ : tasa de crecimiento.

Día	$\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$								
	140			210			300		
	A	B	$\mu$	A	B	$\mu$	A	B	$\mu$
0	0.007	1000		0.007	1000		0.007	1000	
1	0.028	1604	0.68	0.042	2204	1.14	0.038	2937	1.55
2	0.052	2237	0.48	0.072	4950	1.17	0.074	6900	1.23
3	0.072	7894	1.81	0.124	10613	1.10	0.131	10021	0.54
4	0.113	8206	0.60	0.199	15300	0.53	0.211	16922	0.76
5	0.150	11100	0.43	0.299	26183	0.78	0.296	29538	0.80
6	0.191	16780	0.60	0.391	32670	0.32	0.372	34360	0.22

Cuadro II. Biomasa de *Nannochloropsis oculata* cultivada a 25 °C en sistema estático y con tres intensidades de luz (140, 210 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). A: Densidad Óptica, B:  $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $\times 10^3$ ),  $\mu$ : tasa de crecimiento.

Día	$\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$								
	140			210			300		
	A	B	$\mu$	A	B	$\mu$	A	B	$\mu$
0	0.007	1000		0.007	1000		0.007	1000	
1	0.030	2580	1.37	0.052	4070	2.03	0.050	3860	1.95
2	0.044	3980	0.80	0.093	8170	1.01	0.095	8360	1.11
3	0.071	6690	0.68	0.146	13470	0.72	0.178	16660	0.99
4	0.094	8980	0.35	0.217	20570	0.61	0.281	26960	0.69
5	0.122	11780	0.40	0.275	26370	0.46	0.377	36560	0.44

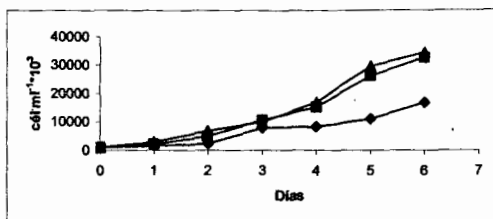


Figura 2. Crecimiento de *Nannochloropsis oculata* en cultivo estático, a una temperatura de 22 °C y con tres intensidades de luz. (◇) 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , (□) 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y (Δ) 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

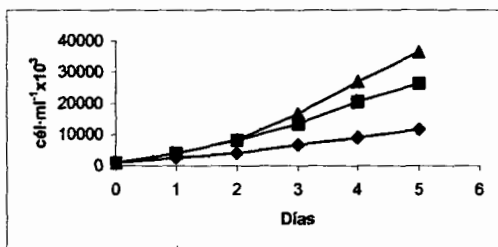


Figura 3. Crecimiento de *Nannochloropsis oculata* en cultivo estático, a una temperatura de 25 °C y con tres intensidades de luz. (◇) 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , (□) 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y (Δ) 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Con la temperatura de 25 °C se registraron biomásas mayores para las intensidades de luz de 210 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), en el día 4 se obtuvieron 20570 y 26960  $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  respectivamente y para el día 5 obtuvieron 26370 y 36560, ambos días en fase de crecimiento lento.

*Nannochloropsis oculata* cultivada a una temperatura de 22 °C presentó un crecimiento estable, las mayores tasas de crecimiento ( $\mu$ ) se

obtuvieron el día 2 (1.17 divisiones por día para  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), y para el día 1 (1.55 divisiones por día para  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

En la intensidad más baja ( $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se observó un crecimiento más lento iniciándose la fase exponencial hasta el día tres, con una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de 1.81 divisiones por día.

Para el caso de  $25^\circ\text{C}$  el crecimiento exponencial fue evidente al día siguiente después del inóculo con 1.99 divisiones por día (promedio en las intensidades de  $210$  y  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), para el segundo día las tasas de crecimiento fueron de 1.06 divisiones por día y el tercer día (después del inóculo) disminuyeron a 0.86 divisiones por día.

Por otro lado se puede observar que con la intensidad de  $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  se inició la fase exponencial de crecimiento rápido un día después del inóculo, pero con una  $\mu$  menor (1.37 divisiones por día). Las tasas de crecimiento con la intensidad de luz menor, fueron más bajas que las obtenidas en las intensidades intermedia y alta (Cuadro II).

Las máximas biomásas alcanzadas durante la fase de crecimiento exponencial temprano (día 3), a  $25^\circ\text{C}$  fue bajo la intensidad de  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con  $16660 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  y con 0.178 unidades de absorbancia, para  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  se obtuvo  $13470 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  y con 0.146 unidades de absorbancia, siendo el valor más bajo para la

intensidad menor, con  $6680 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  y con 0.071 unidades de absorbancia (en el mismo día) (Cuadro II y Fig. 3).

Se observó una relación lineal entre el número de células y la densidad óptica, registrada en *Nannochloropsis oculata*, el análisis de regresión dió como resultado para una  $r^2$  de 0.8883 con la intensidad de luz de  $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , para la intensidad de luz de  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  la  $r^2$  fue de 0.9858 y por último el valor de la  $r^2$  para  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fue de 0.9708. (Fig. 4 y 5). Por lo mencionado anteriormente, los resultados de crecimiento obtenidos en cultivo semicontinuo, serán graficados considerando la densidad óptica (unidades de absorbancia).

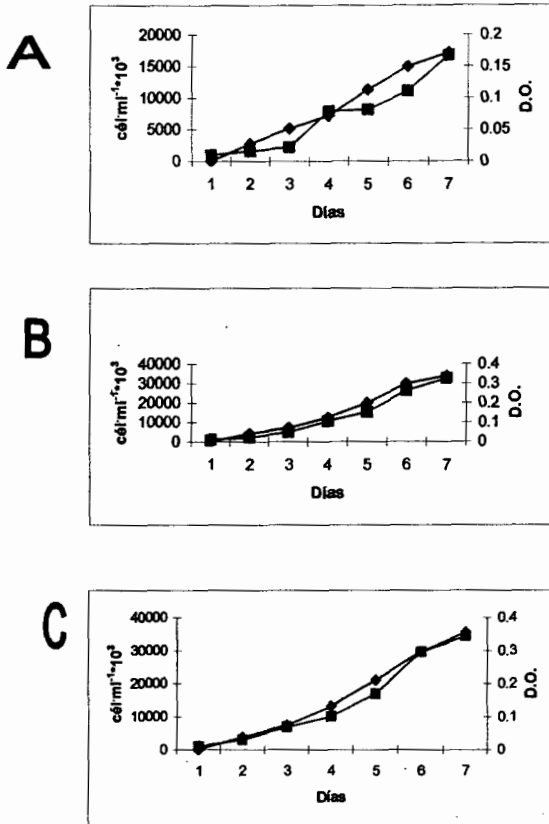


Figura 4. Relación entre el número de células y densidad óptica (unidades de absorbancia) de *Nannochloropsis oculata* cultivada a 22 °C y con diferentes intensidades de luz. A; 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y C; 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en sistema estático. (○) representa las unidades de absorbancia (D.O.) y (□)  $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $\times 10^3$ ).

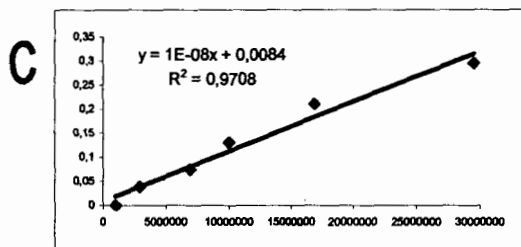
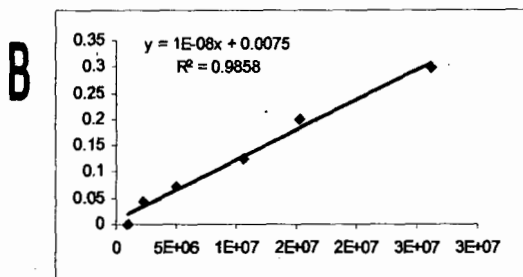
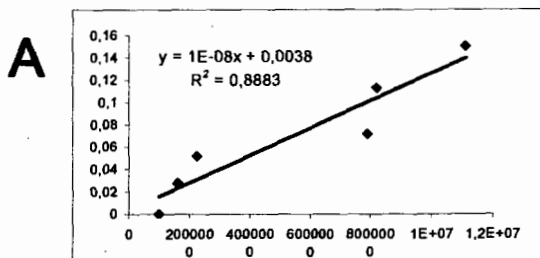


Figura 5. Análisis de regresión (cél·ml<sup>-1</sup> vs D.O.) de *Nannochloropsis oculata* en cultivo estático. A; 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y C; 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



### VII.1.2 Cultivo semicontinuo

En cultivo semicontinuo de *Nannochloropsis oculata* se observaron diferencias significativas entre temperaturas, entre las dos diluciones ensayadas y entre las tres intensidades de luz, así como en la interacción entre las tres variables ( $p < 0.001$ ) (Cuadro III y IV y Fig. 6 y 7).

Los cultivos con el tratamiento de  $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (en las dos temperaturas, 22 y 25 °C), mostraron un crecimiento significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que el presentado en los otros tratamientos.

Con la temperatura de 22 °C, con la dilución del 20%, la biomasa se mantuvo casi constante los primeros cuatro días de dilución, con valores cercanos a  $16000 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  (y con un promedio de 0.173 unidades de absorbancia), sin embargo, el día cinco la biomasa aumentó hasta  $19180 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  (con 0.196 de absorbancia). Por otro lado, con la dilución del 30% (con la misma temperatura e intensidad de luz), la biomasa en general tendió a decrecer paulatinamente a través del tiempo, terminando con una densidad de  $13380 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  y una densidad de 0.138 (unidades de absorbancia) a los nueve días mantenido con esta dilución (Cuadro III y Fig. 6).

Cuadro III. Biomasa ( $\times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis oculata* cultivada a 22 °C en cultivo semicontinuo con tres diferentes intensidades de luz. El cultivo semicontinuo inició a partir del día seis de cultivo.

Día	Dilución (%)	$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		
		140	210	300
0		1000	1000	1000
1		1604	2204	2938
2		2238	4950	6900
3		7894	10613	10021
4		8206	15300	16922
5		11100	26183	29538
6	20	16780	32670	34360
6		14380	23070	24160
7		16080	29570	30760
7		13480	26170	23860
8		15580	32470	33260
8		13180	27570	25760
9		16780	37170	37960
9		14480	31970	28660
10		19180	41470	38060
10		14480	31370	29160
11	30	17680	39270	37860
11		12580	28670	27360
12		18080	39670	46260
12		14080	32270	33260
13		17480	43970	44560
13		14780	36570	34760
14		19280	44570	49160
14		14780	35270	33260
15		17280	46270	45460
15		12780	34770	30460
16		17280	43170	42760
16		11580	30470	28360
17		15780	40770	44260
17		10680	28570	28660
18		14480	40770	41760
18		10480	25370	27460
19		13780	37070	39560
19		9380	24870	27260
20		13380	34470	38860

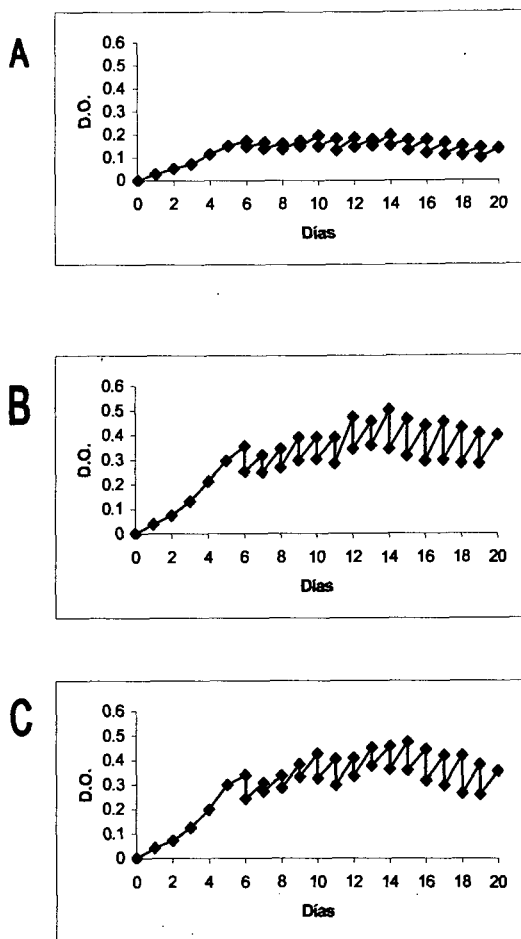


Figura 6. Cultivo semicontinuo de *Nannochloropsis oculata* a 22 °C, con diferentes intensidades de luz. A;  $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B;  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y C;  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . D.O.: unidades de absorbancia.

La densidad microalgal registrada con los tratamientos de 22 °C y las intensidades media y superior ( $210$  y  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (con la dilución del 20%) denota aparentes incrementos en biomasa durante los cinco días con esta dilución, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas durante este tiempo con estos tratamientos ( $p>0.05$ ), el número de células registrado fue en promedio de  $36650 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  y con  $0.365$  unidades de absorbancia (para  $210$  y  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

La misma tendencia se observó cuando se aplicó la dilución del 30%, registrándose densidades de alrededor de  $42000 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $0.431$  unidades de absorbancia) (Cuadro III y Fig. 6).

En la biomasa obtenida con el tratamiento de 25 °C y la menor intensidad de luz ( $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), con la dilución del 20%, se observaron ligeros incrementos, con densidades de  $11700$  a  $14800 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Por otro lado, con la dilución del 30% se registraron decrementos de hasta el 45% al final de aplicada la dilución, terminando con un número de células de  $8200 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  y con  $0.065$  unidades de absorbancia.

Las densidades obtenidas con 25 °C y las intensidades de luz media ( $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y alta ( $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) mostraron diferencias significativas entre ellas ( $p<0.05$ ). Con la dilución del 20% (a  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), el intervalo de biomasa fue de  $25900$  a  $39500 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,

mientras que a  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  el número de células fue de 34400 a  $45500 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Por otro lado, se observó una tendencia contraria con la dilución del 30%, con decrementos de un 14.0% para la intensidad de luz de  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y un 23.0% de decremento para la intensidad más alta ( $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Cuadro IV y Fig. 7).

Cuadro IV. Biomasa ( $\times 10^3$  cél·ml<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis oculata* cultivada a 25 °C en cultivo semicontinuo con tres diferentes intensidades de luz. El cultivo semicontinuo inició a partir del día cinco.

Día	Dilución (%)	$\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
		140	210	300
0		1000	1000	1000
1		2580	4070	3860
2		3980	8170	8360
3		6680	13470	16660
4		8980	20570	26960
5	20	11780	26370	36560
5		9180	18370	29460
6		13680	25870	34360
6		11080	19770	26460
7		14980	30370	39360
7		12080	25370	31560
8		13680	34070	41760
8		11080	28170	28360
9		13380	34170	42360
9		11180	25970	30360
10		13880	34170	42960
10		10180	25970	34160
11		13680	37270	45060
11		11980	31170	34560
12	30	14880	39470	45460
12		9880	27470	31560
13		11780	34170	41960
13		9580	26470	30860
14		11280	31870	41760
14		9280	24370	30060
15		11380	30170	37960
15		9180	26270	29160
16		9980	29870	36160
16		7580	24470	28860
17		8680	29570	35560
17		6680	22370	27160
18		8180	29470	32460
18		6080	21570	22660

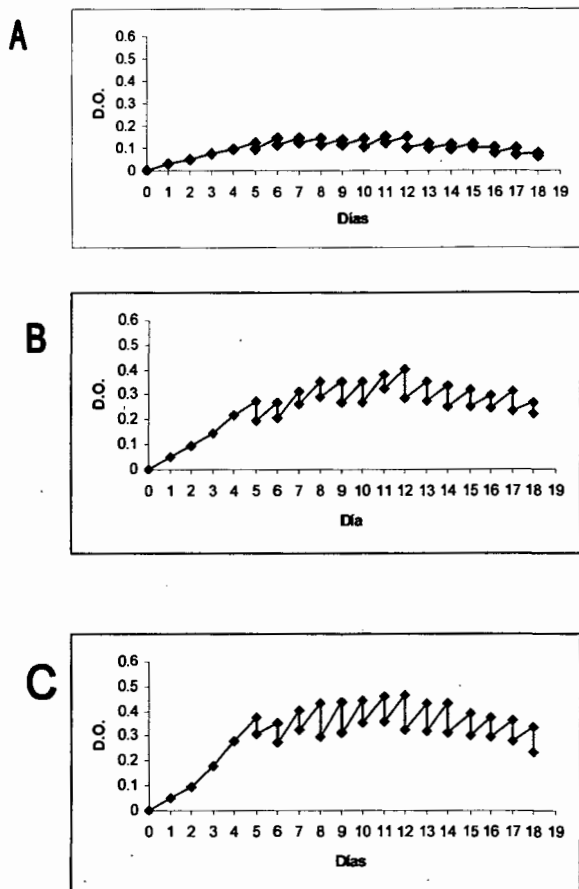


Figura 7. Cultivo semicontinuo de *Nannochloropsis oculata* a 25 °C, con diferentes intensidades de luz. A;  $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B;  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y C;  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . D.O.: unidades de absorbancia.

## VII.2 Peso seco total y orgánico

La biomasa representada con base en peso seco total (PST) muestra diferencias significativas entre las temperaturas ensayadas (22 y 25 °C) ( $p=0.046$ ), sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las tres intensidades de luz ( $p>0.05$ ).

Para la temperatura de 22 °C existe un intervalo entre las tres intensidades que va desde 268.42 a 338.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , en la temperatura de 25 °C el intervalo es más reducido de 451.00 a 471.00  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . (Cuadro V y VI).

El menor promedio global obtenido (en las tres intensidades de luz) fue con la temperatura menor (313.8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y el mayor promedio se obtuvo con la temperatura de 25 °C (468.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

En el caso del peso seco orgánico (PSO) también se reportaron diferencias significativas entre las temperaturas ensayadas ( $p<0.001$ ), así como diferencias entre algunas intensidades de luz ( $p<0.05$ ).

Las mayores biomásas se obtuvieron en la temperatura de 25 °C, con valores promedios (de las tres intensidades), de 219 a 312  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , mientras que, a la temperatura de 22 °C, el intervalo promedio entre las tres intensidades fue de 124 a 133  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , siendo el promedio más bajo



para el tratamiento con la intensidad menor. En esta temperatura (22 °C), fue notorio un PSO menor al primer día de muestreo (en el caso de la intensidad de  $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y para los dos primeros días en la intensidad de  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con incrementos posteriores de alrededor del 50%. Estos resultados denotan una diferencia entre las fases de crecimiento en cultivo estático de *Nannochloropsis oculata*.

Los porcentajes de cenizas obtenidos en los diferentes tratamientos ensayados fueron en general elevados, con un porcentaje aproximado del 50% (Cuadro V y VI), por esta razón, con la intención de no subestimar los contenidos orgánicos (proteínas, carbohidratos y lípidos), obtenidos de las microalgas, estos resultados se expresan más adelante con base a peso seco orgánico.

Cuadro V. Peso seco total (PST) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), peso seco orgánico (PSO) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y porcentaje de cenizas de *Nannochloropsis oculata* a 22 °C (desviación estándar entre paréntesis), mantenida en cultivo estático y semicontinuo con diferentes intensidades de luz. A; 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y C; 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

	Día	Dilución (%)	PST ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	PSO ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Cenizas (%)
A	3		137.0 (2.5)	84.0 (3.2)	61.4
	5		222.8 (9.5)	130.0 (0.7)	58.4
	8	20	285.5 (22.6)	142.8 (17.0)	49.9
	10	20	235.0 (17.0)	103.8 (6.7)	44.1
	12	30	461.8 (11.0)	159.3 (4.6)	34.5
	14	30	458.0 (4.9)	290.0 (13.4)	63.3
	17	30	387.0 (12.0)	238.0 (2.1)	61.4
B	3		168.0 (4.6)	95.0 (1.8)	56.5
	5		235.8 (9.5)	82.2 (8.8)	34.9
	8	20	442.2 (27.9)	178.8 (31.5)	40.4
	10	20	426.8 (20.2)	140.5 (24.7)	32.9
	12	30	417.8 (13.8)	168.8 (2.8)	40.2
	14	30	671.0 (9.9)	347.0 (24.7)	51.6
	17	30	540.0 (19.1)	284.0 (14.1)	52.6
C	3		227.8 (43.8)	143.8 (20.9)	63.2
	5		252.0 (1.8)	106.0 (2.1)	41.8
	8	20	374.8 (56.9)	138.8 (58.3)	37.0
	10	20	400.5 (11.3)	139.5 (19.1)	34.7
	12	30	419.0 (44.5)	130.0 (33.9)	31.0
	14	30	677.0 (46.0)	334.0 (14.1)	49.4
	17	30	444.0 (10.6)	137.0 (17.7)	30.8

Cuadro VI. Peso seco total (PST) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), peso seco orgánico (PSO) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y porcentaje de cenizas de *Nannochloropsis oculata* a 25 °C (desviación estándar entre paréntesis), mantenida en cultivo semicontinuo con diferentes intensidades de luz. A; 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , B; 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y C; 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

	Día	Dilución (%)	PST $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	PSO $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Cenizas (%)
A	5		394.0 (4.2)	274.0 (9.9)	69.5
	8	20	407.0 (48.1)	266.0 (40.3)	65.2
	11	20	538.0 (45.3)	371.0 (34.6)	68.9
	15	30	523.0 (64.3)	344.0 (54.4)	65.7
	17	30	493.0 (87.7)	307.0 (70.0)	62.2
B	5		513.0 (7.8)	308.0 (6.0)	60.1
	8	20	436.0 (28.3)	236.0 (7.1)	54.1
	11	20	442.0 (22.6)	223.0 (4.2)	50.5
	15	30	556.0 (11.3)	308.0 (19.8)	55.4
	17	30	433.0 (38.2)	223.0 (18.4)	51.5
C	5		479.0 (26.2)	267.0 (25.2)	55.8
	8	20	519.0 (54.4)	257.0 (8.5)	49.6
	11	20	386.0 (4.9)	161.0 (14.5)	41.7
	15	30	526.0 (36.1)	264.0 (30.4)	50.3
	17	30	345.0 (9.2)	146.0 (16.3)	42.1

### VII.3 Composición proximal

El análisis estadístico de tres vías (temperatura, intensidad de luz y días), nos indicó que en el caso del contenido de proteínas, solamente existen diferencias significativas entre las temperaturas ensayadas (22 y 25 °C) ( $p=0.023$ ), pero no se observaron diferencias significativas entre intensidades de luz ( $p=0.943$ ).

Las menores concentraciones de proteínas se encontraron a 22 °C (Fig. 8a) fueron de 1.18 a 1.78  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ . Las mayores concentraciones de proteínas se obtuvieron en la temperatura de 25 °C (Fig. 9a), con valores de 1.75 a 1.92  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ .

En general, no se observó ninguna tendencia referente a los diferentes días de muestreo de *Nannochloropsis oculata*, a excepción de la intensidad de 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con la temperatura de 22 °C, donde se observa una disminución aparente en la concentración de proteínas a través del tiempo.

En el caso de los carbohidratos no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en los diferentes tratamientos, los valores fueron en promedio de 0.22 a 0.45  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  (Figs. 8b y 9b).

Por otro lado, para los lípidos de *Nannochloropsis oculata*, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en las tres intensidades de luz ( $p=0.005$ ) (Fig. 8c y 9c), mientras que en el caso de las temperaturas, no se observaron diferencias significativas ( $p=0.144$ ). Las mayores concentraciones fueron observadas con la intensidad de luz de 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con un promedio de 1.48  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ , a pesar de que en el tratamiento de 25 °C, con la misma intensidad encontramos una concentración mayor (3.14

pg·cél<sup>-1</sup>), el análisis de comparaciones múltiples no mostró diferencias significativas ( $p=0.057$ ).

Para los demás tratamientos, las concentraciones fueron en promedio de 1.1 pg·cél<sup>-1</sup>.

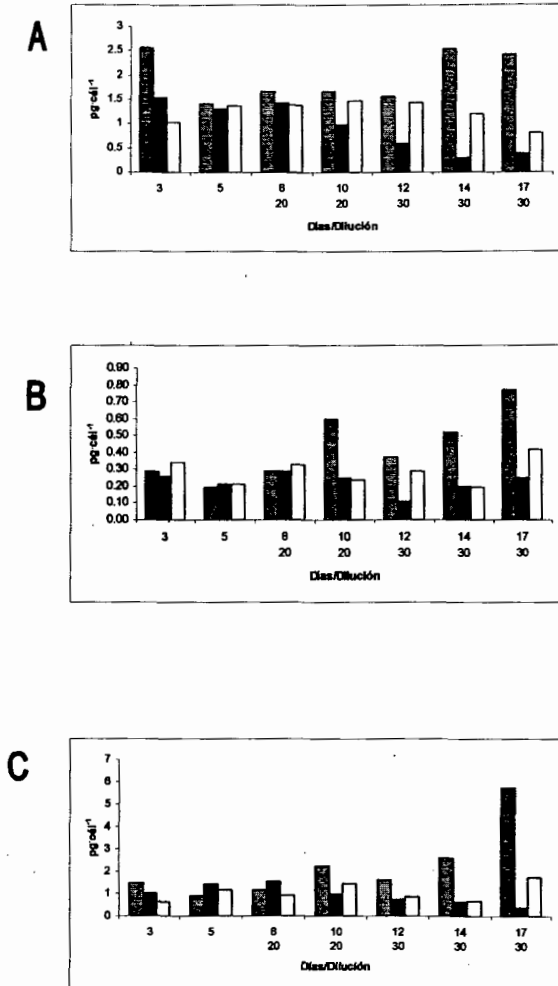


Figura 8. Composición proximal de *Nannochloropsis oculata* cultivada a 22 °C y con diferentes intensidades de luz. (▨) 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , (■) 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y (□) 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A) proteínas, B) carbohidratos y C) lípidos.

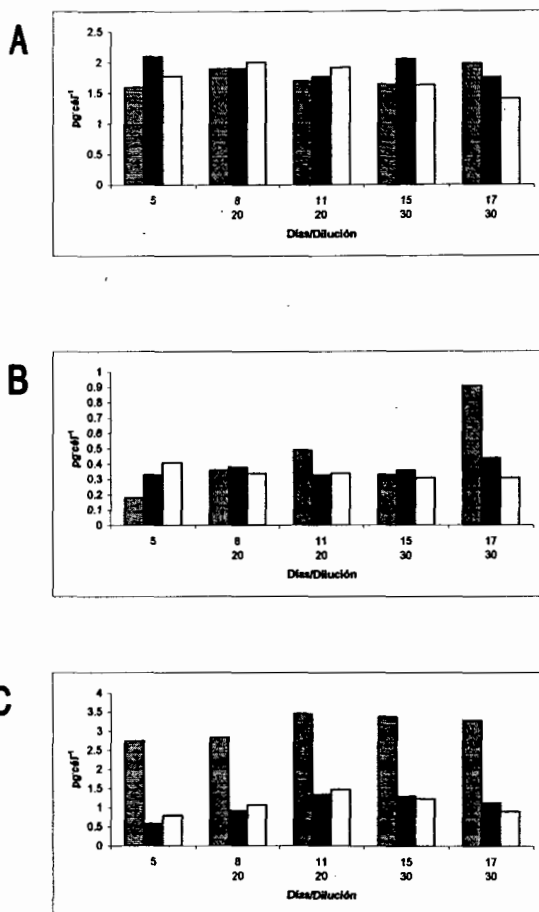


Figura 9. Composición proximal de *Nannochloropsis oculata* cultivada en sistema estático y semicontinuo a una temperatura de 25 °C y con diferentes intensidades de luz. (▨) 140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , (■) 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y (□) 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A) proteínas, B) carbohidratos y C) lípidos.

## DISCUSIONES

Entre los parámetros importantes en la regulación del crecimiento de microalgas están, la temperatura, la iluminación los nutrientes, el pH y el sistema de cultivo. La luz y la temperatura pueden afectar las rutas metabólicas modificando el crecimiento y la composición bioquímica de las mismas, lo que repercute directamente en la nutrición de los organismos que las ingieren (Parsons *et al.*, 1984; Darley, 1987; Sánchez y Voltolina, 1994).

Cuando se requiere obtener una gran cantidad biomasa microalgal, se emplea el cultivo estático ó el semicontínuo. En el cultivo semicontínuo la población crece hasta que alcanza la densidad celular deseada, entonces es parcialmente cosechada y se agrega medio nuevo, diariamente se puede realizar la dilución seleccionada, la cual dependerá de la tasa de crecimiento de cada microalga en particular. En el caso del cultivo estático, la biomasa microalgal es cosechada totalmente una vez que alcanza su máxima densidad celular.

El crecimiento de *Nannochloropsis oculata* en sistema estático en las dos temperaturas (22 y 25 °C) presentó diferencias entre las tres intensidades de luz (140, 210 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), obteniendo tasas de crecimiento menores en la intensidad más baja, las tasas de crecimiento se mantuvieron similares para 210 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las tasas de crecimiento máximo fueron evidentes entre los días uno y dos



lo cual indica la fase máxima de crecimiento exponencial. Brown *et al.* (1993), reportaron biomásas menores ( $2.0 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup>) en cultivo estático a 22 °C y una intensidad de  $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a los resultados obtenidos en este trabajo. Renaud (1991), reporta resultados menores para esta especie a 25 °C y con intensidades similares a las de este trabajo; a  $107 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  encontró  $9.16 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup>, para  $243 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  reporta  $5.61 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup> y para  $340 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  obtuvo  $8.45 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup>.

La tolerancia a la temperatura puede variar con respecto a las especies y a las cepas cultivadas, ya que cada especie puede tener intervalos máximos, mínimos y óptimos de temperatura para su crecimiento.

En resultados obtenidos con otra especie (*N. gaditana*) a 30 °C y con 12,000 lux, Hernández *et al.* (1996) reportaron  $49.8 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup> y para 25 °C obtuvieron una biomasa de  $30 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup>. En otro estudio, Sukenik *et al.* (1990) reportaron una biomasa de  $32.5 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup> (a una temperatura de 25 °C con medio f/2 y con  $290 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), superior a las obtenidas en este trabajo. Por otro lado, Cheng-Wu *et al.* (2001) obtuvieron una biomasa de  $1.1 \times 10^9$  cél·ml<sup>-1</sup> para el verano y  $0.8 \times 10^9$  cél·ml<sup>-1</sup> en invierno en cultivo estático con una intensidad de  $250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Otros autores reportan biomásas de hasta  $70 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Chebil y Yamasaki, 1998), en trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se han llegado a obtener biomásas de hasta  $120 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ , en cultivos estáticos y con tiempos de cultivo más prolongados (16 días) (Cordero, com. per.).

El sistema semicontinuo de las microalgas nos permite en principio obtener biomásas similares a través del tiempo, a la vez que nos ayuda mantener una composición bioquímica estable, sin embargo es necesario la selección de la tasa de dilución adecuada para cada especie, la cual va a estar en función de la tasa de crecimiento.

En este estudio con la dilución menor (20%) se obtuvieron incrementos continuos, por el contrario, con la tasa de dilución mayor (30%), se presentó decremento en la biomasa en la mayoría de los tratamientos, lo cual indica que la tasa de dilución óptima puede ser una intermedio entre estas (25%).

Brown *et al.* (1993) iniciaron el sistema semicontinuo para *Nannochloropsis oculata* con una dilución del 15% (cada dos días), posteriormente tuvieron que elevar el porcentaje de dilución, debido al incremento celular, obteniendo una biomasa máxima de  $25.0 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Por lo cual recomienda diluciones mayores.

La decisión de usar un sistema estático o semicontinuo depende de muchos factores, entre ellos, la experiencia, el nivel de calidad y consistencia de la biomasa requerida, la disponibilidad de espacios, las especies en cultivo y las características del sitio (temperatura, intensidad de luz calidad del agua, entre otras).

Las mediciones cuantitativas de cambios en la abundancia de la biomasa microalgal con el tiempo, en relación a factores ambientales, son uno de los métodos más directos de estudiar el crecimiento de las microalgas (Lewin, 1962).

La biomasa expresada en peso seco total y peso orgánico fueron igualmente indicativos de las fases de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* (exponencial temprana, exponencial tardía y estacionaria). Los valores obtenidos en la fase estacionaria fueron tres veces superiores a los encontrados en la fase exponencial temprana (en el caso de la intensidad menor y la intermedia).

Brown *et al.* (1993) reportaron  $10.0 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$  para peso seco en fase logarítmica y en la fase estacionaria  $238 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones de cultivo utilizadas en cada caso y, en gran medida al tamaño de inóculo utilizado al inicio del experimento.

La dependencia de la biomasa microalgal a la temperatura muestra un incremento exponencial de producción hasta que la temperatura óptima es alcanzada. Esta también tiene una influencia significativa sobre la composición bioquímica, Sato y Murata (1980), concluyeron que la temperatura fue uno de los factores medioambientales más importantes que influenciaron la composición de ácidos grasos de las microalgas.

En la actualidad se ha despertado un continuo interés en encontrar formas de variar la composición bioquímica de las microalgas, sobre todo, optimizando las condiciones ambientales de cultivo, esto es debido a su gran potencial como fuente proteica o como complemento de una dieta, al igual que una fuente de vitaminas y minerales.

Primeramente es importante conocer como puede diferir la composición bioquímica de las microalgas en sus diferentes fases de crecimiento, ó como puede variar debido a limitaciones por algún factor, esto es de crucial importancia si se desea contar con microalgas de composición bioquímica adecuada y que ésta sea mantenida constante durante el tiempo que se use como alimento de larvas y de moluscos bivalvos, o para uso biotecnológico (en medicina y/o en farmacia) (Herrero *et al.*, 1985, Cordero y Voltolina, 1994).

En este trabajo la composición proximal presentó comportamientos diferentes dependiendo de los diferentes tratamientos. En general, la

temperatura mostró tener un efecto más significativo que la intensidad de luz, sobre todo en la composición de lípidos. Ackman *et al.* (1968), mencionan que la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen los tipos de ácidos grasos producidos por las microalgas. A pesar de que en este trabajo solo se evaluaron los lípidos totales, es de esperarse que esta variable sí haya afectado la composición de los ácidos grasos de *Nannochloropsis oculata*, ya que ha sido reportado por otros autores que algunas microalgas tienden a incrementar sus ácidos grasos polinsaturados debido a decremento en las temperaturas, esto por lo tanto propicia la fluidez de las membranas de las microalgas.

Debido a que *Nannochloropsis oculata* es productora de ácidos grasos polinsaturados, principalmente del eicosapentaenoico (20:5n-3) y el araquidónico (20:4n-6), ha sido investigada ampliamente, ensayando diferentes condiciones de cultivo y por lo tanto la mayoría de los estudios van encaminados a la composición bioquímica de ácidos grasos. Sin embargo, dada su alta producción de estos ácidos grasos, los cuales son esenciales para los organismos en cultivo, las especies de *Nannochloropsis* también son altamente utilizadas en la alimentación de rotíferos y artemia, que después son utilizados para alimentar algunos estadios de peces y crustáceos, por este motivo, este trabajo ha marcado la pauta para seleccionar las mejores condiciones de cultivo de *Nannochloropsis oculata*, con la intención de ser usada

posteriormente como intermediario para peces y crustáceos de interés regional.

Actualmente un procedimiento común durante el cultivo peces y crustáceos es agregar microalgas ("agua verde") a los sistemas de cultivo intensivo junto con las presas vivas (zooplancton). La adición de microalgas a los tanques de larvas puede mejorar su producción, los mecanismos como se da esto no están aún del todo claros. Existen algunas teorías para tratar de explicarlo, las cuales incluyen: a) atenuación de luz (efectos de sombreado), los cuales pueden tener un efecto benéfico a las larvas, b) mantenimiento de la calidad nutricia del zooplancton, c) una excreción de vitaminas y otras sustancias promotoras del crecimiento por parte de las microalgas y d) un efecto probiótico de las microalgas. Además, se menciona que puede ser una combinación de estas posibilidades. También se ha propuesto un efecto en el mantenimiento del balance de amonio y oxígeno.

## CONCLUSIONES

- *Nannochloropsis oculata* cultivada en sistema estático presentó un mayor crecimiento con la temperatura mayor (25 °C) y la intensidad de luz más alta (300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), alcanzando una biomasa de  $36560 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el día cinco de cultivo y con una tasa de división de 1.95 para el día siguiente después del inóculo.
- En el sistema semicontinuo de *Nannochloropsis oculata*, la dilución del 20% presenta ligeros incrementos en la biomasa celular a través del tiempo, por el contrario con la dilución del 30% la biomasa fue decreciendo paulatinamente, esto parece indicar que una dilución del 25 % sería la adecuada para *N. oculata*.
- La biomasa obtenida con base en peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) fue mayor con la temperatura de 25 °C. En general los diferentes valores de PST y PSO indican las diferentes fases de crecimiento en cultivo estático de *N. oculata*.
- La composición de proteínas de *Nannochloropsis oculata* mostró diferencias entre las temperaturas ensayadas (22 y 25 °C), no

así entre las diferentes intensidades de luz. Los mayores valores se presentaron con la temperatura menor (22 °C).

- En el contenido de carbohidratos de *Nannochloropsis oculata* no se presentaron diferencias significativas, obteniendo un intervalo de valores de 0.22 a 0.45 pg·cél·ml<sup>-1</sup> entre los diferentes tratamientos ensayados.
  
- El contenido de lípidos de *Nannochloropsis oculata* mostró un comportamiento de incremento a través del tiempo, presentando valores máximos para la temperatura mayor (25 °C) y la intensidad menor (140  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) con un promedio aproximado de 3.0 pg·cél·ml<sup>-1</sup>.
  
- En general, los mejores resultados de biomasa de *Nannochloropsis oculata* en sus diferentes parámetros de medición se obtuvieron con la temperatura mayor (25 °C) y con la intensidad mayor (300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ),



## LITERATURA CITADA

- Ackman, R.G., C.S. Tocher y J. Mc.Lachlan. 1968. Marine phytoplankter fatty acids. J. of Fisheries Research Board of Canada. 25:1603-1620.
- Ayala V.G. 1999. La acuicultura y la biotecnología marina como generadoras de desarrollo alternativo. Ciencia y Desarrollo 148.
- Bajpai, P. y Bajpai. 1993. Ecosapentaenoic acid (EPA) production from microorganism: a review. J. Biotechnol., 30 (2): 161-183.
- Becker, E.W. 1995. Microalgae, biotechnology and microbiology. Cambridge University Press. Great Britain.
- Bligh, E.G. y Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- Borowitzka, L.J. 1988. Development of western biotechnology's algal BETA-carotene plant. Bioresource technology, 38: 251-252.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey y C.D. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a Literature review. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Marine Laboratories, Report. 205.
- Brown, M.R., C.D. Garland, S.W. Jeffrey, I.D. Jameson y J.M. Leroi. 1993. The gross and aminoacid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (Clone T\_Iso), *Pavlova lutheri* and *N. Oculata*. Journal of Applied Phycology, Bélgica. 5:285-296 p.

- Bustillos, H. C. y López E.J. 1994. Composición química de dos especies de microalgas en dos fases de crecimiento, cultivadas en medios simplificados. *Oceanología*, 2: 133-148.
- Cordero, E. B. y D. Voltolina. 1994. Growth of *Mytilus galloprovincialis* fed with four microalgae and two feeding regimes. *J. World Aquaculture Soc.* 25 (3):471-474 p.
- Chebil, L., S. Yamasaki. 1998. Improvement of a rotifers ecosystem culture to promote recyclin marine microalga, *Nannochloropsis* sp. *Aquacultural Engineering* 17, 1-10.
- Cheng-Wu, Z., O. Zmora, R. Kopel, A. Richmond. 2001. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 195, 35-49 p.
- Darley, M.W. 1987. *Biología de las algas: Enfoque fisiológico*. Ed., Limusa S.A. de C.V., México, D.F. 236 pp.
- De Silva, S.S. 2000. A global perspective of aquaculture in the new millennium. 197-221. En: Conference on aquaculture in the third millennium, network of aquaculture for Asia-Pacific y food and agriculture organization, Bangkok, Thailand.
- Demer, R., A. Olivera, E., Buitrago, K., Pinasco. 1994. Crecimiento de *Chaetoceros calcitrans* en ambiente cerrado y abierto bajo diferentes fotoperiodos y medios nutritivos. Estación de Investigaciones Marinas de Nargarita. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. 142: 3-8

- Dubois, M., Grilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Fogg, G. E. 1975. *Algal Cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press. USA.
- Guillard, R.L. y J.H. Rhyter. 1962. Studies on marine planctonic diatoms I.- *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Grand. *Cán. J. Micro.* 8:229-239.
- Hernández, Molejón, O.G., L. Álvarez-Lajonchère, A., González y V. Martínez. 1996. Efectos de la temperatura y de la iluminación sobre el crecimiento de dos microalgas: *Nannochloropsis gaditana* Lubian 1982 y *Tetraselmis tetrathele* (West) Butcher, 1959. *Hidrobiológica*. 6 (1-2): 43-47.
- Herrero, C., B. Cabezas, J Abalde y J. Fabregas. 1985. Avances en tecnología de microalgas para nutrición animal. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago. 100 p.
- Lanza-Espino, G., J.L. Arredondo. 1990. La acuicultura en México: de los conceptos a la producción. Instituto de Biología. Universidad nacional Autónoma de México. México D.F. 315 pp.
- Lewin, R.A. 1962. *Physiology and biochemistry of algae*. Academic Press. New York. 929 p
- Lips, S.H. y Y.J. Avissar. 1986. Photosynthesis and ultraestructure in microalgae. 43-67. En Richmond, A. (ed). *Handbook of microalgae mass culture*. CRC Press Inc., Boca Ratón.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265-275.
- Margalef, R. y Vives, F. 1967. La vida suspendida en las aguas. 493:562. En: Hno. Ginés y Margalef, R. (eds). *Ecología marina*. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Caracas, Venezuela.
- Pande, S., Khan, R y Venkitasubramanian, T. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Anal. Biochem.* 6: 415-423.
- Parsons, T.R., M. Takahashi y B. Hargrave. 1984. *Biological oceanographic processes*. 3<sup>rd</sup>, Ed., Pergamon Press, Oxford. 330 pp.
- Renaud, S.M., D.L. Parry, V.T. Luong, C. Kuo, Padoran y N. Sammy. 1991. Effect of light intensity on proximate, biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Applied Phycol.* 3:45-53 p.
- Roessler, P.G. 1990. Environment control of glycerolipid metabolisms in microalgae, commercial implications and future research direction. *J. Phycol.*, 26:393-399.
- Sánchez Saavedra, M.P. 1994. Efecto de la luz sobre el crecimiento, la composición bioquímica y el valor alimenticio de *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C., México. 99 pp.

- Sánchez Saavedra, M.P. y D. Voltolina. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B: 39-44.
- Sato N. & Murata N. (1988) Membrane lipids. *Methods in Enzymology* 167, 251-259.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J.R. (ed.): *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sukenik, A., Y. Carmeli y T. Berner. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycology*, 25: 686-692 p
- Sukenik, A. y Y. Carmeli. 1990. Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *Journal Phycology*, 26: 463-469 p.
- Tacon, A.G.J. 2000. Increasing the contribution of aquaculture for food security and poverty alleviation. 101-106. En: *Conference on aquaculture in the third millennium, network of aquaculture for Asia-Pacific y food and agriculture organization*, Bangkok, Thailand.
- Van Den Hoek, C., D. G., Mann, H.M., Jahns, 1995, *Algae –An introduction to phycology-*, Cambridge University Press, Great Britain, 623 pp.

Wheaton, F.W: 1997. *Acuacultura. Diseño y construcción de sistemas*.  
A. G. T. Editor S. A. México. 704 pp.

Yongmanitchai, W. y O.P. Ward. 1991. Growth and omega-3 fatty acid  
production by *Phaeodactylum tricomutum* under different culture  
condition. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (2): 419-  
425.