

MODIFICACIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE LAS MICROALGAS MARINAS EN CULTIVOS SEMICONTINUOS

Jaime Fábregas y Ana Otero.

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Farmacia,
Universidad de Santiago.

RESUMEN

Los cultivos semicontinuos constituyen un valioso y sencillo instrumento para la manipulación de la composición bioquímica de las microalgas marinas mediante la utilización de la tasa de renovación y la concentración de nutrientes como variables de cultivo. La obtención continua de biomasa microalgal de composición definida mediante el uso de técnicas de cultivo semicontinuo ha permitido la realización de estudios nutricionales en organismos filtradores como el rotífero *Brachionus plicatilis* o el microcrustáceo *Artemia* sp. que constituyen el primer eslabón de la cadena nutritiva en acuicultura. Los resultados obtenidos han revelado el potencial de esta estrategia de cultivo para la obtención de mayores supervivencias y repetibilidad de resultados en el campo de los cultivos marinos.

ANTECEDENTES

Las microalgas marinas son la base de la cadena nutritiva en el cultivo de moluscos, peces y crustáceos, siendo utilizadas bien

directamente para la alimentación de moluscos o en el caso de las fases larvianas de peces y crustáceos, a través de especies intermediarias que son utilizadas como presas vivas. La producción de microalgas ha sido considerada como el cuello de botella que limita el desarrollo de las instalaciones (Persoone y Claus, 1980), pudiendo representar hasta un 8% de los costes de explotación de larvas de peces y crustáceos y un 40% en el caso de la producción de semilla de moluscos (Laing y Helm, 1981). El objetivo prioritario de la investigación en acuicultura sigue siendo conseguir una elevada supervivencia y crecimiento de larvas y repetibilidad de los resultados. A pesar de que las microalgas son el primer eslabón en la cadena nutritiva y por lo tanto el éxito en los siguientes niveles tróficos dependerá de su óptima composición bioquímica, hasta el momento se ha prestado poca atención al efecto de la técnica de cultivo y formulación de nutrientes en los cultivos de microalgas sobre la supervivencia y crecimiento del siguiente eslabón de la cadena trófica.

La mayor parte de los estudios sobre requerimientos nutritivos de organismos filtradores se basan en la comparación del valor nutritivo de diferentes especies de microalgas (Johnson, 1980; Watanabe *et al.*, 1980). Las conclusiones que se derivan de tales estudios son limitadas, ya que la digestibilidad y muchos otros parámetros bioquímicos pueden afectar al valor nutritivo de diferentes especies microalgales. Sería por lo tanto necesario modificar la composición bioquímica de una sola especie microalgal para la realización de los estudios nutricionales. La composición de las microalgas puede ser manipulada en cultivos discontinuos mediante variables de cultivo como la concentración y composición de los nutrientes, salinidad, temperatura, intensidad luminosa, etc. (Fábregas *et al.*, 1985; Wikfors, 1986; Jiménez y Niell, 1991). Sin embargo, la composición de las células cambia con la edad del cultivo, por lo que resulta difícil aplicar estas técnicas para la obtención de biomasa microalgal de composición definida. La problemática de los sistemas tradicionales de cultivo de microalgas se centra no sólo en la imposibilidad de ejercer un control sobre la composición bioquímica de estos cultivos, sino también en las dificultades de mantener una producción estable y suficiente. Además, en fase estacionaria, momento

en el que se recogen para ser utilizados, los cultivos discontinuos de microalgas presentan una concentración bacteriana mayor como consecuencia de la muerte de subpoblaciones celulares.

Los cultivos continuos de microalgas ofrecen una vía alternativa para la realización de estudios nutricionales ya que producen biomasa microalgal de composición constante (Scott, 1980) y permiten generar un amplio rango de composiciones bioquímicas utilizando una sola especie microalgal (Taub, 1980), mediante la manipulación de variables como la tasa de dilución, la concentración de nutrientes o la intensidad luminosa (Goldman y Peavey, 1979; Molina Grima *et al.*, 1993; Sukenik *et al.*, 1993). La mayor parte de los estudios sobre cultivos continuos de microalgas ha sido realizada a pequeña escala en turbidostatos y quimiostatos, que resultan difíciles de operar y presentan una dificultad añadida en el escalado del proceso de producción. Los problemas de ingeniería inherentes al desarrollo de estos sistemas de cultivo intensivo a gran escala dificultan la realización de estudios completos sobre la respuesta de la composición bioquímica a un amplio rango de variables operacionales. Ante este problema era necesario diseñar un sistema de cultivo que resultase sencillo, que permitiese obtener de forma continuada biomasa microalgal de composición definida, y en el que el proceso de escalado permitiese una inversión mínima, facilidad de manejo y adaptación a las infraestructuras ya presentes en la mayoría de las instalaciones de producción de microalgas. Se propuso la utilización de cultivos semicontinuos sometidos a ciclos de luz/oscuridad, también denominados ciclostatos (Chisholm *et al.*, 1975), simulando las condiciones de producción con luz natural y en los que el ciclo de renovación coincide con el ciclo de división celular. Estos sistemas coinciden con los sistemas continuos en que la composición bioquímica de la biomasa es estable y controlada, pero representan una propuesta de manejo más sencillo.

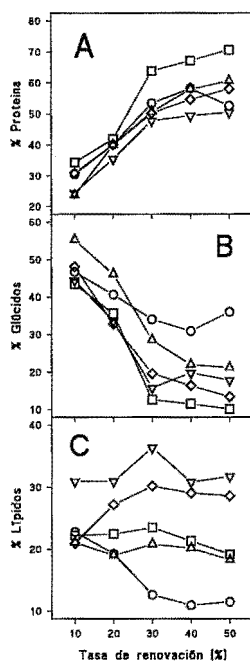


Figura 1. Efecto de la tasa de renovación sobre porcentaje de proteína (A), glúcidos (B) y lípidos (C) en la fracción orgánica de cultivos semicontinuos de las microalgas marinas *Dunaliella tertiolecta* (□), *Chlorella autotrophica* (O), *Phaeodactylum tricornutum* (Δ), *Tetraselmis suecica* (∇) e *Isochrysis galbana* (V). Todas las especies se cultivaron con una concentración de nutrientes equivalente a 4 mmol N l^{-1} .

LOS CULTIVOS SEMICONTINUOS COMO HERRAMIENTAS GENERADORAS DE VARIABILIDAD BIOQUÍMICA

La optimización del sistema experimental de cultivo para la realización de un máximo de experimentos simultáneos produciendo el mínimo de biomasa microalgal necesaria para realizar los análisis bioquímicos y los estudios nutricionales resultó en la utilización de minicultivos de 80 ml de volumen con aireación individual que permitían

la realización de hasta 70 cultivos de forma simultánea (Fábregas *et al.*, 1995a). A continuación se identificaron la tasa de renovación y la concentración de nutrientes como las variables de cultivo que podrían producir un mayor efecto sobre la productividad y composición bioquímica. Se ha realizado un estudio exhaustivo de la respuesta de diferentes especies de microalgas de interés comercial, bien por su utilización en acuicultura o por su elevado contenido de sustancias de valor biotecnológico a estos dos factores en cultivo semicontinuo. Entre las especies estudiadas se encuentran *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella autotrophica*, *Nannochloropsis* sp. y *Porphyridium* sp. (Fábregas *et al.*, 1995a,b; 1996c,d; 1997; 1998a; Otero y Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1997a, b; Otero *et al.*, 1998). Todas ellas presentan patrones de respuesta similares a los cambios en la tasa de renovación y concentración de nutrientes en los cultivos. Algunas de las características más importantes se resumen a continuación:

1. Descenso de la densidad celular de estabilización al incrementar la tasa de renovación. Se produce por lo tanto una evolución parabólica de la productividad celular, que alcanza un máximo con tasas de renovación intermedias.
2. Incremento del contenido celular de clorofilas y carotenoides con la tasa de renovación en condiciones limitantes de nitrógeno, que resulta en valores estables de concentración de clorofila por mililitro al incrementar la tasa de renovación en estas condiciones (Otero *et al.*, 1998).
3. Descenso del contenido orgánico celular al incrementar la tasa de renovación. Este descenso es independiente de la condición nutricional del cultivo (Fábregas *et al.*, 1996a).
4. En condiciones de limitación por nitrógeno se produce un incremento del porcentaje de proteína de la fracción orgánica (Figura 1A) a expensas del contenido de glúcidos y/o lípidos al incrementar la tasa de renovación y concentración de nutrientes. En todas las especies estudiadas se observa un descenso del porcentaje de glúcidos en la

fracción orgánica con el incremento de la tasa de renovación en estas condiciones (Figura 1B). La evolución del contenido de lípidos varía según la especie considerada (Figura 1C). Así, mientras en el caso de *Chlorella autotrophica* se produce un descenso del porcentaje de lípidos con la tasa de renovación (Fábregas *et al.*, 1996a), en *Tetraselmis suecica* se produce un incremento de este porcentaje en la fracción orgánica en condiciones de limitación por nitrógeno (Otero y Fábregas, 1997).

5. En condiciones de saturación de nitrógeno se produce una estabilización de la composición relativa de la fracción orgánica (Fábregas *et al.*, 1996c).
6. Descenso del contenido celular de proteína con la tasa de renovación en condiciones de saturación de nitrógeno. En estas condiciones, a pesar de que la composición relativa de las células permanece constante, el menor contenido orgánico celular resulta en un menor contenido celular de proteína y en un descenso del valor calórico celular (Otero y Fábregas, 1997; Otero *et al.* 1997).
7. En condiciones limitantes de nitrógeno se produce un incremento del grado de insaturación de los ácidos grasos al incrementar la tasa de renovación (Otero *et al.*, 1997). Esto es debido a la sustitución de lípidos de reserva que contienen en su mayoría ácidos grasos saturados, por lípidos estructurales ricos en ácidos grasos poliinsaturados al incrementar la tasa de crecimiento.
8. El contenido celular de esteroides decrece al incrementar la tasa de renovación independientemente de la condición nutricional del cultivo (Fábregas *et al.*, 1997).

LOS CULTIVOS SEMICONTINUOS DE MICROALGAS Y LA CADENA NUTRITIVA

La variabilidad bioquímica generada en la biomasa microalgal mediante las técnicas de cultivo semicontinuo se utilizó en estudios nutricionales de dos organismos filtradores de gran importancia en

acuicultura: *Brachionus plicatilis* y *Artemia*. Tanto la concentración de nutrientes como la tasa de renovación con la que se cultivaron las microalgas influyeron sobre los resultados de crecimiento obtenidos en ambas especies (Fábregas *et al.*, 1996b, Fábregas *et al.*, 1998b).

Cuando el rotífero *Brachionus plicatilis* se alimentó con una mezcla de las especies *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* que habían sido cultivadas en régimen semicontinuo con tasas de renovación en el rango 10-50%, se observó un incremento en la tasa de crecimiento del rotífero con la tasa de renovación, (Figura 2) y un descenso de la tasa de conversión de alimento, calculada como peso de microalga añadido por unidad de peso de rotífero obtenido (Food Conversion Rate, FCR). Cuando los rotíferos se alimentan con microalgas que han sido cultivadas con distintas tasas de renovación no sólo incrementan su tasa de crecimiento y cambian su composición bioquímica corporal, sino que actúan como vehículos transportadores de nutrientes al llevar en su aparato digestivo células microalgales enteras o parcialmente digeridas. El resultado final es un rotífero que es consumido por las larvas de peces con una composición bioquímica diferente en función del método de cultivo de la microalga de la que se ha alimentado.

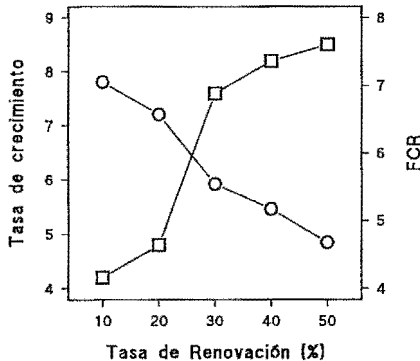


Figura 2. Tasa de crecimiento (individuos ml⁻¹ día⁻¹, □) y tasa de conversión de alimento (FCR, O) del rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con una dieta mixta de las microalgas marinas *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* cultivadas en régimen semicontinuo con distintas tasas de renovación.

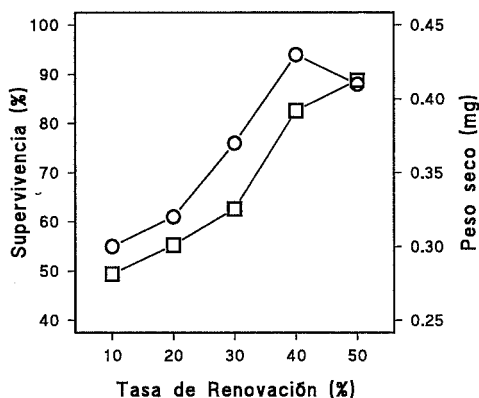


Figura 3. Supervivencia (□) y peso seco (O) de *Artemia* sp. alimentada con la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en régimen semicontinuo con distintas tasas de renovación.

El incremento de la tasa de renovación aplicada en cultivos semicontinuos de *Tetraselmis suecica* produjo un incremento de la supervivencia del cultivo de *Artemia* desde el 49% cuando se aplicó una tasa de renovación del 10%, hasta el 88% con una tasa de renovación del 50% (Figura 3), mientras que el peso medio de un individuo de *Artemia* después de 12 días de cultivo se incrementó desde 0.3 mg hasta 0.43 mg en las mismas condiciones (Figura 3). Cuando *Artemia* sp. se alimentó con 36 cultivos semicontinuos diferentes de la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* se generaron supervivencias en el rango 17-97%, longitudes desde 7 hasta 10 mm y de 3 a 97 nauplios por puesta, dependiendo de las condiciones de cultivo de la microalga (Fábregas *et al.*, 1998b). No ha sido posible establecer una relación clara entre los resultados de crecimiento, supervivencia y eficiencia reproductiva de *Artemia* y los índices que comúnmente se utilizan para evaluar el valor nutritivo de una especie microalgal, como contenido de proteína o las relaciones proteína/lípidos y proteína/glúcidos. Estos resultados demuestran que los cultivos semicontinuos son una herramienta óptima para la manipulación de la composición bioquímica de las microalgas y cuestionan la

metodología utilizada comúnmente para el estudio del valor nutritivo de las distintas especies microalgales.

Por lo tanto, los cultivos semicontinuos de microalgas se consolidan como una alternativa sencilla a los sistemas tradicionales de cultivo discontinuo y continuo, proporcionando una herramienta óptima para ser utilizada en estudios fisiológicos y nutricionales y como modelo experimental para el estudio de aplicaciones biotecnológicas a gran escala.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (XUGA-20317-B97).

REFERENCIAS

- Chisholm, S.W., Stross, R.G., Nobbs, P.A. 1975. Light/dark phased cell division in *Euglena gracilis* (Z) (Euglenophyceae) in PO₄ limited continuous cultures. *J. Phycol.* 11:367-373.
- Fábregas, J., Arán, J., Morales, E.D., Lamela, T., Otero, A. 1997. Modification of sterol concentration in marine microalgae. *Phytochemistry* 46:1189-1191.
- Fábregas, J., Cid, A., Morales, E., Cordero, B., Otero, A. 1996a. Discrepancies between cell volume and organic content in semi-continuous cultures of a marine microalga. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:206-208.
- Fábregas, J., García, D., Morales, E.D., Domínguez, A., Otero, A. 1998a. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Pophyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid production. *J. Ferm. Bioeng.* 86:477-481.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., Abalde, J. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica*

- Kylin (Butch.) with high nutrient concentrations. *Aquaculture* 49:231-244.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Arredondo-Vega, B.O., Patiño, M. 1998b. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricorutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. *Aquaculture*. En prensa.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B., Patiño, M. 1996b. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture* 143:197-204.
- Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo-Vega, B.O., Tobar, J.L., Otero, A. 1995a. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:287-292.
- Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E.D., Cordero, B., Otero, A. 1996c. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in semicontinuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:266-268.
- Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E.D., Domínguez, A., Otero, A. 1996d. Distinctive control of metabolic pathways by *Chlorella autotrophica* in semicontinuous culture. *Can. J. Microbiol.* 42:1087-1090.
- Fábregas, J., Patiño, M., Vecino, E., Cházaro, F., Otero, A. 1995b. Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:617-621.
- Goldman, J.C., Peavey, D.G. 1979. Steady state growth and chemical composition of the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* in nitrogen-limited continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:894-901.
- Jiménez, C., Niell, F.X. 1991. Influence of temperature and salinity on carbon and nitrogen content in *Dunaliella viridis* Teodoresco under nitrogen sufficiency. *Biores. Technol.* 38:91.94.

- Johnson, D.A. 1980. Evaluation of various diets for optimal growth and survival of selected life stages of *Artemia*. En "The Brine Shrimp *Artemia*, Vol. 3". Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, pp 185-192.
- Laing, I., Helm, M.M. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. In 200 l. vessels. *Aquaculture* 22:137-148.
- Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., García Sánchez, J.L., López Alonso, D. 1993. n-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:599-605.
- Otero, A., Fábregas, J. 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture* 159:111-123.
- Otero, A., Domínguez, A., Lamela, T., García, D., Fábregas, J. 1998. Steady-states of semicontinuous cultures of a marine diatom: Effect of saturating nutrient concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 227:23-34.
- Otero, A. García, D. Morales, E.D. Arán, J., Fábregas, J. 1997a. Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. *Biotech. Appl. Biochem.* 26:171-177.
- Otero, A., García, D., Fábregas, J. 1997b. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 9:465-469.
- Persoone, G., Claus, C. 1980. Mass culture of algae: the bottleneck in the nursery culturing of molluscs. En "Algae Biomass. Production and use". Shelef, G., Soeder, C.J. (Eds). Elsevier-North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 264-285.
- Scott, J.M. 1980. Effect of the growth rate of the food alga on the growth/ingestion efficiency of a marine herbivore. *J mar. Biol. Ass U.K.* 60:681-702.

- Sukenik, A., Zmora, O., Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II *Nannochloropsis sp.* Aquaculture 117:313-326.
- Taub, F.B., 1980. Use of continuous culture techniques to control nutritional quality. En "Algae Biomass. Production and use", Shelef, G., Soeder C.J. (Eds). Elsevier-North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, pp 707-721.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., Fujita, S. 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia salina* and their content of 3 highly unsaturated fatty acids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46:35-41.
- Wikfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. Aquaculture 59:1-14.