



**Facultade de Bioloxía**  
**Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía**

**Optimización do valor nutritivo de microalgas mariñas  
para o enriquecemento e cultivo do rotífero  
*Brachionus plicatilis***

Memoria que para optar  
ao Grao de Doutor en Bioloxía presenta  
Martíña Ferreira Novio

Santiago de Compostela, Decembro de 2006





**Facultade de Bioloxía**  
**Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía**

Ana María Otero Casal, Profesora Titular e Jaime Fábregas Casal, Catedrático, ambos os dous do Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía da Universidade de Santiago de Compostela

FAN CONSTAR

Que a memoria titulada “Optimización do valor nutritivo de microalgas mariñas para o enriquecemento e cultivo do rotífero *Brachionus plicatilis*” que presenta Martiña Ferreira Novio para optar ao Grao de Doutor en Bioloxía, foi realizada baixo a nosa dirección no Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía, e autorizamos a súa presentación.

E para que así conste, asinamos a presente en Santiago de Compostela a 20 de decembro de 2006.

Asdo. Ana Otero Casal

Asdo. Jaime Fábregas Casal



*Aos meus pais.*



## **Índice**

---





<b>Introdución</b>	<b>1</b>
Requerimentos nutricionais das larvas	6
Producción e utilización de rotíferos en acuicultura	9
O papel das microalgas na acuicultura: valor nutritivo e técnicas de produción	13
<b>Obxectivos</b>	<b>21</b>
Obxectivos xerais	23
Obxectivos particulares	23
<b>Materiais e métodos</b>	<b>25</b>
Sistemas de cultivo de microalgas e rotíferos	27
Reconto celular e obtención de biomasa seca de microalgas e rotíferos	30
Cálculo da taxa de crecemento	30
Determinación da concentración de nitrato no medio de cultivo de microalgas	31
Determinación do peso seco	31
Análise elemental (C-H-N)	32
Determinación do contido de proteínas	33
Determinación do contido de lípidos	34
Determinación do contido de glúcidos en biomasa e sobrenadante	36
Cálculo do valor calórico da biomasa	37
Determinación do contido de pigmentos	37
Análise de ácidos graxos	38
Determinación do contido de oligoelementos	40
Tratamento estatístico das mostras	41
<b>Descrición das especies utilizadas</b>	<b>43</b>
<i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clon T-ISO)	45
<i>Nannochloropsis gaditana</i> Lubián	47
<i>Brachionus plicatilis</i> O. F. Müller	50
<b>Capítulo 1. Cultivo discontinuo de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clon T-ISO). Efecto da suplementación con CO<sub>2</sub> e da intensidade luminosa</b>	<b>57</b>
Introdución	59
Deseño experimental	60
Resultados e discusión	61
<b>Capítulo 2. Cultivo semicontinuo de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clon T-ISO) con intensidade luminosa elevada</b>	<b>75</b>
Introdución	77
Deseño experimental	77
Resultados e discusión	78
<b>Capítulo 3. Cultivo semicontinuo de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clon T-ISO) con intensidade luminosa moderada</b>	<b>93</b>
Introdución	95
Deseño experimental	95
Resultados e discusión	96

<b>Capítulo 4. Cultivo semicontinuo de <i>Nannochloropsis gaditana</i> con intensidade luminosa elevada</b>	<b>109</b>
Introdución	111
Deseño experimental	111
Resultados e discusión	112
<b>Capítulo 5. Enriquecemento de <i>Brachionus plicatilis</i> durante 24 h con <i>Isochrysis aff. galbana</i> (Clon T-ISO) cultivada en sistema semicontinuo con intensidade luminosa elevada</b>	<b>129</b>
Introdución	131
Deseño experimental	131
Resultados e discusión	132
<b>Capítulo 6. Enriquecemento de <i>Brachionus plicatilis</i> durante 24 h con <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivada en sistema semicontinuo con intensidade luminosa elevada</b>	<b>147</b>
Introdución	149
Deseño experimental	149
Resultados e discusión	150
<b>Capítulo 7. Cultivo de <i>Brachionus plicatilis</i> con <i>Isochrysis aff. galbana</i> (Clon T-ISO) cultivada oen sistema semicontinuo con intensidade luminosa moderada</b>	<b>165</b>
Introdución	167
Deseño experimental	167
Resultados e discusión	168
<b>Capítulo 8. Enriquecemento de <i>Brachionus plicatilis</i> durante 24 h con distintas racións de <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivada en sistema semicontinuo</b>	<b>185</b>
Introdución	187
Deseño experimental	187
Resultados e discusión	188
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	188
<i>Brachionus plicatilis</i>	193
<b>Capítulo 9. Enriquecemento de <i>Brachionus plicatilis</i> durante 2 h ou 24 h con <i>Isochrysis aff. galbana</i> (Clon T-ISO) e <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivadas en sistema semicontinuo</b>	<b>207</b>
Introdución	209
Deseño experimental	209
Resultados e discusión	210
<i>Nannochloropsis gaditana</i> e T-ISO	210
Enriquecemento 2 h	214
Enriquecemento 24 h	217
<b>Capítulo 10. Efecto das condicións de cultivo semicontinuo sobre o contido de oligoelementos de <i>Isochrysis aff. galbana</i> (Clon T-ISO) e <i>Nannochloropsis gaditana</i>. Efecto da dieta sobre o contido de oligoelementos de <i>Brachionus plicatilis</i> en experimentos de enriquecemento e cultivo</b>	<b>225</b>
Introdución	227

Resultados e discusión	227
<i>Nannochloropsis gaditana</i> e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clon T-ISO)	227
<i>Brachionus plicatilis</i>	232
<b>Conclusiones</b>	<b>239</b>
<b>Referencias</b>	<b>243</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>265</b>



## **Introducción**

---



Segundo o último informe da FAO dispoñible sobre o estado mundial da pesca e acuicultura, o consumo mundial de peixe, crustáceos e moluscos tanto mariños como de augas continentais, alcanzou no ano 2002 un total de 133 millóns de toneladas. Desda cantidade, 39,8 millóns de toneladas, o 29,9% do total, procedían da acuicultura (FAO, 2004). O esgotamento dos caladoiros obriga a adoptar políticas de redución das capturas para permitir a recuperación das poboacións e satisfacer a demanda de peixe só é posible grazas ao incremento da produción da acuicultura, que pasou de representar o 3,9% do total do peixe, crustáceos e moluscos consumidos en 1979 a case o 30% no ano 2000.

A acuicultura practícase desde hai séculos. O cultivo da ostra xa se coñecía en Europa na época dos romanos, e o engorde de certas especies de peixes tamén se realizaba hai séculos en Asia e noutras partes do mundo. Porén, este tipo de acuicultura consistía basicamente en capturar xuvenís que despois eran alimentados ata que alcanzaban o tamaño apropiado, ou no caso dos moluscos, simplemente mantidos en substratos apropiados no mar. A mediados do século XIX xa se reproducían en cautividade salmónidos e outros peixes de auga dóce. Os éxitos alcanzados e o coñecemento do que se dispoñía sobre o cultivo destes peixes estimulou unha serie de intentos a finais do XIX de reproducir especies mariñas co obxectivo de recuperar as poboacións naturais. O procedemento consistía en capturar adultos fértiles, obter os gametos, levar a cabo a fertilización e liberar as larvas eclosionadas no océano. A falta dun alimento vivo apropiado impedía proseguir co cultivo larvario, e o fracaso destas tentativas de repoboación fixo que se abandonaran a principios do século XX (Bengtson, 2003).

A fase larvaria é a etapa máis complicada do cultivo de peixes mariños, a que determina en maior medida a produción e a que supón as maiores dificultades para completar o ciclo biolóxico das especies obxecto de cultivo e poñer en marcha a súa produción comercial (Blair *et al.*, 2003; Vaz-Pires *et al.*, 2004). A maioría dos peixes mariños producen ovos peláxicos de pequeno tamaño e as larvas eclosionan nunha fase moi temperá do desenvolvemento. No momento da eclosión o sistema dixestivo non é funcional, igual que algúns outros órganos,. A larva nútrese durante os primeiros días de vida das súas relativamente escasas

reservas de vitelo, e transcorrido este periodo comeza a capturar pequenos zooplanctontes.

O descoñecemento dos requerimentos nutritivos das larvas de peixe impediu completar os ciclos biolóxicos en cautividade ata que arredor de 1930 se descubriu a idoneidade dos nauplios de *Artemia* para a alimentación das larvas dalgúns peixes e crustáceos (Seale, 1933; Gross, 1937; Rollefson, 1939). O descubrimento de que os nauplios de *Artemia* podían servir de alimento para as larvas de certas especies que presentaban unha boca o suficientemente grande para inxerilos supuxo un paso fundamental para o cultivo larvario (Van Stappen, 1996). Outro gran avance tivo lugar cando se observou que o rotífero *Brachionus plicatilis* podía ser tamén utilizado como alimento vivo para larvas de peixes mariños e de auga dóce. Este organismo constituía unha grave plaga nos cultivos de anguías en Xapón. Proliferaba rapidamente nos tanques de cultivo e consumía grandes cantidades de osíxeno, causando a morte dos peixes. Para combater o rotífero, nos anos 50 e 60 do século pasado leváronse a cabo estudos sobre a súa bioloxía, que paradoxalmente resultaron útiles para cultivo de forma masiva (Fukusho, 1989). Os rotíferos demostraron ser especialmente indicados para ser utilizados como alimento das larvas polas súas características de rápido crecemento, tamaño, velocidade de natación e dixestibilidade, e permitiron ampliar o rango de especies de peixes cultivables.

En menor medida tamén se utilizan como alimento vivo outros organismos como *Daphnia*, o nematodo *Panagrellus redivivus*, as larvas trocóforas de varios bivalvos e diversas especies de copépodos (Delbare e Dhert, 1996; Delbare *et al.*, 1996). Entre todos os diferentes organismos ensaiados como alimento vivo para o cultivo larvario, os copépodos dan lugar aos mellores resultados. Os copépodos son os constituíntes maioritarios do zooplancton mariño e polo tanto as presas habituais das larvas de peixe no medio natural, e considérase que a súa composición bioquímica satisfai todos os requerimentos nutricionais das larvas debido principalmente a unha elevada relación proteína:lípido, a unha gran proporción de lípidos polares e á súa riqueza nos ácidos graxos esenciais EPA (20:5 $\omega$ -3, ácido eicosapentaenoico) e sobre todo DHA (22:6 $\omega$ -3, ácido docosahexaenoico, DHA). Estas cualidades fan dos copépodos un alimento de maior valor nutritivo que os rotíferos ou *Artemia* (Evjemo e Olsen,



1997; McEvoy *et al.*, 1998; Støttrup, 2001, 2003; Evjemo *et al.*, 2003). Porén, os copépodos son difíciles de producir de forma intensiva e aínda que poden colleitarse do medio natural a súa abundancia está restrinxida aos meses de primavera e verán, polo que na actualidade aínda non poden ser utilizados para o cultivo larvario a gran escala. Para este propósito é necesario dispoñer dun alimento vivo que poida ser cultivado facilmente en grandes cantidades durante todo o ano de xeito económico. *Artemia* e os rotíferos do xénero *Brachionus*, (principalmente *B. plicatilis*, a especie máis utilizada) cumpren estes requisitos, e a produción de peixes e crustáceos baséase nestes dous organismos. Ademais de ser fáciles de cultivar, os organismos empregados como alimento vivo deben reunir unha serie de características que os fagan aceptables para as larvas: satisfacer os seus requerimentos nutricionais, ter un tamaño apropiado e ser facilmente capturables.

Un dos obxectivos máis perseguidos no cultivo larvario de peixes mariños na actualidade é a substitución do alimento vivo por microdietas artificiais, pero ata o momento soamente se conseguiu un éxito total no caso do peixe lobo *Anarhinchas* spp., que pode alimentarse con dietas formuladas desde a eclosión. As larvas de todas as demais especies estudadas unicamente son capaces de manterse con dietas artificiais cando estas se complementan con rotíferos ou *Artemia*. Estes organismos poderían ter un efecto indirecto, como estímulo visual ou químico da captura e inxestión das presas tanto vivas como inertes, ou actuar directamente ao ser consumidos, contribuíndo coas súas propias enzimas dixestivas aos procesos de dixestión e asimilación (Kolkovski *et al.*, 1997). Aínda que existe controversia respecto a estas hipóteses (Cahu e Zambonino Infante, 2001), o certo é que a actividade das enzimas dixestivas nas larvas é baixa e dificulta a dixestión de micropartículas que conteñen entre un 60% e un 90% de materia seca, fronte ao 10% do zooplancton (Kolkovski, 2001). Os resultados obtidos ata o de agora permiten pensar que o alimento vivo seguirá sendo imprescindible para o cultivo larvario de practicamente todas as especies de peixes mariños, sendo o principai obxectivo a mellora da produción, tanto en cantidade como en calidade.

## **Requerimentos nutricionais das larvas**

A nutrición larvaria ten sido obxecto de numerosísimos estudos durante as últimas décadas, e o aspecto máis investigado é o requerimento de ácidos graxos poliinsaturados de cadea longa. Os ácidos graxos 22:6 $\omega$ -3, 20:5 $\omega$ -3 e 20:4 $\omega$ -6 (ácido araquidónico, ARA) son nutrientes esenciais para os peixes mariños, que carecen das enzimas necesarias para producilos a partir doutros ácidos graxos de cadea máis curta e deben polo tanto recibilos a través da dieta. Cada un destes ácidos graxos ten funcións ben definidas nos procesos fisiolóxicos dos peixes e non poden ser substituídos uns por outros, así que o alimento debe aportar cantidades suficientes dos tres. O contido destes ácidos graxos nos tecidos dos peixes é proporcional ao contido presente na dieta (Mourente *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1994; Estévez *et al.*, 1999). O DHA concéntrase especialmente nos fosfolípidos das membranas neuronais do cerebro (Mourente *et al.*, 1991) e da retina (Navarro *et al.*, 1997). Unha dieta deficitaria en DHA ocasiona problemas de visión nos alevíns de arenque, aínda que non se coñece o papel concreto do DHA nos procesos visuais (Bell *et al.*, 1995). É probable que a malpigmentación, frecuente nos peixes cultivados cunha dieta con baixo contido de DHA (Reitan *et al.*, 1994a) estea relacionada cun mal procesamento dos sinais visuais no ollo ou no cerebro, ou por unha produción anormal da hormona estimulante de melanocitos, tamén segregada polo cerebro (Sargent *et al.*, 1999). O ARA e o EPA son precursores dos eicosanoides, moléculas que median en multitude de procesos metabólicos. Estes dous ácidos graxos compiten polos enzimas responsables da síntese de eicosanoides, sendo os producidos a partir do EPA menos activos que os sintetizados a partir do ARA. Os contidos de EPA e ARA na dieta deben estar en equilibrio para regular a produción de eicosanoides e en consecuencia a súa acción no organismo dos peixes. Aínda que un aporte suficiente de ARA aumenta a resistencia das larvas de dourada ao estrés producido pola manipulación e os cambios de salinidade, unha cantidade excesiva pode afectar negativamente á supervivencia e ao crecemento (Koven *et al.*, 2003), e nos peixes planos o exceso de ARA na dieta pode dar lugar a defectos de pigmentación (Estévez *et al.*, 1999).

Considérase que a composición lipídica ideal da dieta debe ser similar á das propias larvas, á do viltelo dos ovos da especie en cuestión e á das súas

presas naturais, contendo un 10% de fosfolípidos ricos en ácidos graxos  $\omega$ -3 e menos dun 5% de triacilgliceróis (Sargent *et al.*, 1999). As proporcións óptimas entre os ácidos graxos esenciais varían entre as distintas especies. A relación DHA:EPA óptima para a robaliza (*Dicentrarchus labrax*), o rodaballo (*Scophthalmus maximus*) e o fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) sitúase arredor de 2:1, pero a relación óptima EPA:ARA é maior nos peixes planos, 10:1, que na robaliza, 2:1 (Sargent *et al.*, 1999). Na práctica, a principal dificultade no aporte de ácidos graxos radica en subministrar unha cantidade suficiente de DHA, especialmente cando se utilizan nauplios de *Artemia* como alimento, xa que son capaces de retroconverter o DHA en EPA (Navarro *et al.*, 1999). A cantidade de ARA presente no alimento vivo é normalmente baixa pero suficiente para cubrir as necesidades das larvas, e se o contido de DHA é o apropiado, os requerimentos de EPA están determinados polo contido de ARA e non polo de DHA (Estévez *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 1999).

Os aminoácidos constitúen outro grupo de nutrientes moi estudado na nutrición larvaria. O rápido crecemento das larvas demanda unha gran inxesta de aminoácidos, que tamén constitúen unha fonte de enerxía durante as primeiras etapas da vida dos peixes. Os requerimentos varían segundo as especies e a fase de desenvolvemento, e un desequilibrio entre os requerimentos larvarios e o perfil de aminoácidos da dieta pode dar lugar a que ata o 40% dos aminoácidos subministrados polo alimento non sexan asimilados (Conceicao *et al.*, 2003). Durante os seus primeiros días de vida as larvas carecen dun verdadeiro estómago polo que son incapaces de segregar o HCl e as enzimas responsables de iniciar a desnaturalización e a dixestión das proteínas, de maneira que a asimilación das proteínas pode resultar ineficiente. Os péptidos de pequeno tamaño e sobre todo os aminoácidos libres son asimilados con maior facilidade que as proteínas intactas e polo tanto son nutrientes moi valiosos para as larvas (Rønnestad *et al.*, 2003).

As vitaminas liposolubles e os carotenoides xogan un papel importante no correcto desenvolvemento da pigmentación dorsal das larvas dos peixes planos. A vitamina A é necesaria para a síntese da rodopsina e postúlase que un déficit nutricional desta substancia dá lugar a deficiencias na transmisión dos sinais visuais cara o cerebro afectando ao correcto establecemento do patrón de

pigmentación (Rønnestad *et al.*, 1993). Por outra banda, un exceso de vitamina A na dieta pode producir problemas de hiperpigmentación na cara inferior do peixe e deformidades das vértebras (Tarui *et al.*, 2006). A cantaxantina e a astaxantina poden ser transformadas en vitamina A polos peixes e probablemente xogan un papel importante na pigmentación (Olson, 1989). O  $\beta$ -caroteno exerce unha acción distinta á dos carotenoides antes citados: induce a proliferación linfocitaria e está probablemente relacionado cun incremento da resistencia ás enfermidades infecciosas (Tachibana *et al.*, 1997). A suplementación do alimento vivo con vitamina C tamén reforza o sistema inmunitario reducindo a mortalidade por infeccións e asimesmo mellora a resistencia das larvas ao estrés e ten efectos positivos sobre o seu crecemento (Merchie *et al.*, 1995, 1997).

Os traballos realizados sobre os requerimentos de oligoelementos dos peixes céntranse sobre todo en alevíns alimentados con dietas artificiais e non en larvas que consumen alimento vivo. Nos peixes, estes elementos forman parte de estruturas esqueléticas, manteñen os sistemas coloidais, regulan o equilibrio ácido-base e ademais son compoñentes de hormonas e enzimas ou cofactores enzimáticos, pero unicamente se coñecen ben as funcións dalgúns deles, incluíndo o ferro, cobre, manganeso, cinc, selenio, iodo, cobalto, cromo, potasio, magnesio, fósforo ou calcio (Lall, 1989; Watanabe *et al.*, 1997). A carencia de selenio durante 28 semanas provoca descensos dos niveis de vitamina E en sangue e alteracións nas células pancreáticas, ademais de reducir a actividade dalgunhas enzimas e incrementar a fragilidade dos eritrocitos nos salmóns (Bell *et al.*, 1987). A deficiencia de iodo reduce a síntese de hormonas tiroideas nas larvas de halibut, o que podería estar relacionado con problemas de pigmentación e da migración do ollo (Solbakken *et al.*, 2002).

Os nucleótidos son un grupo de nutrimentos tradicionalmente considerados non esenciais, aínda que eran incluídos na formulación dalgunhas dietas polas súas propiedades como atraentes químicos e estimulantes da alimentación. Porén, investigacións máis recentes concluíron que os nucleótidos poderían tamén actuar como inmunoestimulantes, incrementando a resposta do sistema inmunitario e a resistencia ás infeccións. Nalgúns casos os nucleótidos poderían actuar tamén positivamente sobre o crecemento (Li e Gatlin, 2006).

## Produción e utilización de rotíferos en acuicultura

O tamaño de *Brachionus plicatilis*, que oscila entre os 100 e os 340  $\mu\text{m}$ , fai que habitualmente se utilice no inicio da alimentación esóxena, sendo substituído por nauplios de *Artemia* cando as larvas alcanzan unha determinada talla que lles permite inxerir presas de maior tamaño.

Nas instalacións dedicadas á produción de rotíferos é unha práctica habitual manter unha serie de cultivos en tubos ou matraces Erlenmeyer de 50 ou 100 ml con auga de mar previamente esterilizada e alimentados con microalgas. Estes cultivos empréganse para o estudo da bioloxía e a fisioloxía do rotífero e para conservar especies ou cepas. A partir deles poden realizarse cultivos a gran escala para a produción masiva de rotíferos, para o que se inoculan progresivamente unha serie de matraces de maior capacidade que finalmente son utilizados para iniciar cultivos en grandes tanques (Dhert, 1996).

Os cultivos destinados á produción de grandes cantidades de rotíferos clasifícanse en discontinuos, continuos ou semicontínuos. Dado que *Brachionus plicatilis* é un filtrador non selectivo e consume calquera tipo de partícula de tamaño apropiado (Rothhaupt, 1990) poden utilizarse distintos tipos de alimento: microalgas frescas, conxeladas ou liofilizadas, levadura ou diversas formulacións de alimento seco.

*Cultivos discontinuos.* Lubzens (2003) describe catro tipos de cultivos discontinuos de rotíferos. Nos cultivos de tipo I os rotíferos inocúlanse a moi baixa densidade en tanques de fitoplancton, déixanse medrar e colléitanse unha vez que consumiron todas as algas. Esta técnica dá lugar a baixas densidades de rotíferos, e son propensos a colapsarse de xeito impredecible. Os cultivos de tipo II consisten en inocular cunha alta densidade de rotíferos unha quinta parte do volume do tanque. Aliméntanse con levadura e o volume de cultivo vaise incrementando progresivamente coidando de manter unha densidade de rotíferos alta. Os cultivos de tipo III son similares aos de tipo I, coa diferenza de que non hai cultivo previo de fitoplancton. Os rotíferos inocúlanse a unha baixa densidade no tanque e aliméntanse con levadura, concentrados de microalgas ou alimento seco, e recóllense unha vez alcanzada unha densidade elevada, arredor de 200

individuos/ml. Por último, no tipo IV os cultivos son inoculados con densidades de rotíferos moi elevadas (5.000-10.000 individuos/ml) e alimentados con *Chlorella* concentrada. A duración dos cultivos con densidades elevadas é de entre 2 e 5 días, mentres que os baseados en densidades máis baixas teñen unha duración maior e dependente da taxa reproductiva dos rotíferos. Nos cultivos con grandes densidades de rotíferos é necesario subministrar osíxeno e vixiar o pH e a produción de amonio.

*Cultivos continuos.* Inspíranse nos quimiostatos e turbidostatos empregados no cultivo de microorganismos e son sistemas de tamaño relativamente pequeno, habitualmente 1000 l. Utilizando unha dieta apropiada, como *Nannochloropsis* ou unha mestura de varias especies de microalgas, poden conseguirse elevadas taxas de crecemento nos cultivos de *B. plicatilis* e polo tanto tamén altas produtividades, de ata  $222 \times 10^6$  rotíferos/m<sup>3</sup>/día (James e Abu-Rezeq, 1989; Abu-Rezq *et al.*, 1997). Crese que a eficiencia deste tipo de cultivos é debida en parte ao crecemento de bacterias que reciclan o nitróxeno excretado polos rotíferos e que ao mesmo serven de alimento (Hino *et al.*, 1997).

*Cultivos semicontinuos.* Neste tipo de cultivos unha parte do cultivo é retirada diariamente e reemplazada por auga de mar. A taxa de renovación está determinada pola taxa de crecemento da poboación. Os rotíferos son alimentados con levadura e a densidade de cultivo oscila entre 100 e 300 individuos/ml. A acumulación dos produtos de excreción e dos residuos da dixestión pode dar lugar ao colapso do cultivo, que pode evitarse acoplando un sistema de recirculación para eliminar a materia orgánica particulada para ser posteriormente descomposta e utilizada como fertilizante para cultivos microalgais. Esta variante do cultivo semicontinuo denomínase "cultivo feed-back" (Lubzens, 1987; 2003). Controlando a calidade da auga e alimentando cunha dieta artificial poden conseguirse densidades de 3.000 rotíferos/ml mantendo unha taxa de renovación do 20% (Suantika *et al.*, 2000).

En xeral, os sistemas de cultivo son os mesmos independentemente da cepa ou especie de rotífero que se cultive, aínda que as condicións de cultivo si deben ser modificadas coa finalidade de obter as máximas produtividades. A temperatura de cultivo de *Brachionus rotundiformis* pode variar entre os 25 °C e

os 35 °C, mentres que para cultivar *B. plicatilis* debe manterse entre 20 °C e 25 °C (Lubzens, 2003). As diferentes taxas de crecemento das dúas especies tamén deben terse en conta para axustar a taxa de dilución no caso dos cultivos semicontínuos (James e Abu-Rezeq, 1989; Navarro e Yúfera 1998).

A utilización de microalgas encarece notablemente o cultivo de rotíferos. 18 litros de *Chlorella* concentrada ( $20.000 \times 10^6$  células/ml) custaban en 2001 entre 140 e 150 \$. Aínda así, as microalgas son imprescindibles se se queren realizar cultivos de rotíferos a moi elevadas densidades (Hagiwara *et al.*, 2001). Pero o alimento habitualmente usado na produción de rotíferos é a levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), moito máis barata e fácil de obter e de almacenar. Os rotíferos cultivados con levadura presentan taxas reprodutivas máis baixas que os alimentados con microalgas (Yúfera e Pascual, 1980; Carić *et al.*, 1993; Lubzens *et al.*, 1995), aínda que non todos os autores atopan estas diferencias (Tamaru *et al.*, 1993). O principal inconveniente da levadura é que os rotíferos cultivados con esta dieta carecen de ácidos graxos poliinsaturados de cadea longa (Watanabe *et al.*, 1983). Os rotíferos reflexan a composición bioquímica do alimento que consumen (Whyte e Nagata, 1990; Frolov *et al.*, 1991; Whyte *et al.*, 1994), así que polo tanto a selección da dieta pode ser de crucial importancia, xa que en última instancia determina o valor nutritivo dos rotíferos. Aínda que os rotíferos posúen a dotación enzimática necesaria para sintetizar ácidos graxos  $\omega$ -3 de cadea longa, a taxa de síntese é demasiado lenta para que cheguen a acumularse grandes cantidades de DHA e EPA se o rotífero non os recibe a través da dieta (Lubzens *et al.*, 1985). Por este motivo, antes de ser ofrecidos ás larvas os rotíferos son sometidos a un enriquecemento, incubándoos durante un determinado intervalo con dietas que lles aportan os nutrientes esenciais para as larvas de peixe, principalmente ácidos graxos poliinsaturados da serie  $\omega$ -3.

Para enriquecer os rotíferos poden utilizarse microalgas mariñas, emulsións lipídicas ou micropartículas de diversas composicións (Coutteau e Sorgeloos, 1997; Dhert *et al.*, 2001). As técnicas de enriquecemento de rotíferos soen clasificarse en curtas ("short-term enrichment") ou longas ("long-term enrichment"), pero as características de cada unha delas non están claramente definidas. Algúns autores opinan que un enriquecemento curto debe ter unha

duración inferior a 8 h (Coutteau e Sorgeloos, 1997), mentres que para outros este tipo de enriquecemento pode prolongarse ata as 24 h e consideran enriquecementos longos aqueles que duran varios días, periodo no que se produce un crecemento da poboación de rotíferos (Rainuzzo *et al.*, 1994).

O obxectivo principal do enriquecemento é elevar o contido de EPA e DHA dos rotíferos, conseguindo ademais unha relación DHA/EPA igual ou superior a 2 para satisfacer os requerimentos nutricionais das larvas. Os datos sobre o grao de acumulación de ácidos graxos poliinsaturados en rotíferos durante periodos curtos de enriquecemento son variados, pero diversos autores coinciden en que para obter os maiores contidos de lípidos e ácidos graxos son necesarios enriquecementos de entre 12 e 24 h (Ando *et al.*, 2004; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Frolov *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1996). Por outra banda, durante os enriquecementos longos os lípidos ingeridos son dixeridos, absorbidos e incorporados aos tecidos dos rotíferos en forma de novas moléculas lipídicas, e isto pode reducir a dispoñibilidade de certos ácidos graxos para as larvas de peixe. O DHA e o EPA nos triacilglicéridos dos rotíferos tenden a incorporarse na posición *sn*-3 e en menor medida, na *sn*-1 (Ando *et al.*, 2004), mentres que as lipasas pancreáticas dos peixes eliminan o ácido graxo situado na posición *sn*-1 dos triacilglicéridos e fosfolípidos e conservan o situado na posición *sn*-2, que permanece no novo lípido que se forme a partir da molécula orixinal (Bell *et al.*, 2003). Deste xeito, os enriquecementos longos poderían provocar que parte do EPA e o DHA non fose ben asimilada polas larvas alimentadas con eses rotíferos.

Axustar o tempo de enriquecemento podería axudar a optimizar a acumulación dos diversos nutrientes nos rotíferos. A porcentaxe de proteína tende a incrementarse coa duración do enriquecemento, mentres que a porcentaxe de glúcidos se reduce, e ao cabo de 6 h obtéñense os valores máximo e mínimo respectivamente (Frolov *et al.*, 1991). Fernández-Reiriz *et al.* (1993) tamén sinalan diferencias significativas nas porcentaxes de proteínas e glúcidos ás 6 h de enriquecemento respecto dos rotíferos iniciais. Prolongar o periodo de enriquecemento parece ser necesario para enriquecer os rotíferos cun contido elevado de ácido ascórbico (Brown *et al.*, 1998). Porén, nalgúns casos o enriquecemento curto dá mellores resultados xa que prolongalo pode provocar a



degradación dos nutrientes que se queren incorporar aos rotíferos, como no caso da astaxantina (Domínguez *et al.*, 2005).

As posibilidades de modificar o perfil de aminoácidos nos rotíferos son máis limitadas. Tanto o contido de proteína como o de aminoácidos libres poden variar co estado nutricional do rotífero (Frolov e Pankov, 1992; Øie *et al.*, 1997), pero a composición da proteína é moi estable e non varía co tipo de alimentación (Frolov *et al.*, 1991). A composición de aminoácidos libres pode ser manipulada, pero os rotíferos presentan o inconveniente de que unicamente un 3% aproximadamente dos seus aminoácidos totais son aminoácidos libres (Øie *et al.*, 1997). O enriquecemento pode incrementar a porcentaxe de aminoácidos libres nos rotíferos e tamén en *Artemia*, especialmente cando se utilizan microalgas, máis vantaxosas que os enriquecedores comerciais (Aragão *et al.*, 2004).

### **O papel das microalgas na acuicultura: valor nutritivo e técnicas de produción**

As microalgas mariñas están consideradas un alimento excelente para o enriquecemento de rotíferos (Dhert *et al.*, 2001), e posúen ademais outras aplicacións no cultivo larvario de peixes. A adición de microalgas nos tanques de larvas, técnica coñecida como "auga verde", permite que os rotíferos se sigan alimentando e conserven o seu valor nutritivo (Reitan *et al.*, 1993; Øie *et al.*, 1997), mentres que en ausencia de microalgas os rotíferos poden perder ata un 50% da súa biomasa e proteínas en 4 días (Makridis e Olsen, 1999) e un 20% diario do contido de lípidos (Reitan *et al.*, 1993). A presenza de microalgas nos tanques de cultivo larvario probablemente modifica as comunidades bacterianas dos mesmos e contribúe ao establecemento da flora microbiana no tracto dixestivo das larvas (Reitan *et al.*, 1997). As larvas consumen parte destas microalgas, aínda que a súa capacidade de dixerilas é variable (Reitan *et al.*, 1997).

A pesar das múltiples propiedades das microalgas, os inconvenientes derivados do custo e a complexidade de produción (Duerr *et al.*, 1998) fan que o seu uso como enriquecedores para os rotíferos sexa limitado, utilizándose

preferentemente dietas artificiais con diversas presentacións: emulsións lipídicas, micropartículas sólidas ou liposomas. Porén, os enriquecedores artificiais tamén presentan unha serie de problemas. O uso de emulsións pode dar lugar a rotíferos cun contido lipídico demasiado elevado (Dhert *et al.*, 2001). Os aceites ademais impregnan a superficie do rotífero e son así transferidos aos tanques de larvas, afectando á calidade da auga, e tamén poden provocar mortalidades nos propios rotíferos (Rodríguez *et al.*, 1996). Pola súa banda, as micropartículas sólidas poden perder parte dos nutrientes hidrosolubles en contacto coa auga. Os produtos elaborados a partir de microalgas concentradas ou liofilizadas son unha posible alternativa á produción de microalgas *in situ* nas instalacións dedicadas á acuicultura xa que permiten reducir custos e simplificar a produción de rotíferos. A incorporación de biomasa microalgal ten asimismo un gran potencial na substitución dalgúns compoñentes dos pensos de engorde de peixes (Fábregas e Herrero, 1986; Coutinho *et al.*, 2006).

Probablemente o cultivo de microalgas tivo os seus inicios a finais do século XIX, a partir dos coñecementos e os métodos desenvolvidos para o cultivo de bacterias. A observación do elevado contido de proteína das microalgas fixo que entre os anos 1940 e 1960 as investigacións se enfocaran cara á produción de biomasa microalgal como fonte de proteínas para o consumo humano. Este proxecto finalmente non chegou a materializarse (Wikfors e Ohno, 2001), pero na actualidade determinadas especies de microalgas son cultivadas para a obtención de compostos destinados ao mercado dos complementos nutricionais. É o caso de *Dunaliella salina*, capaz de acumular ata o 10% do seu peso de  $\beta$ -caroteno (Ben-Amotz e Avron, 1990), e que é cultivada en grandes estanques ao aire libre en zonas desertas costeiras (Israel, Australia e Hawaii), e da microalga de auga doce *Haematococcus pluvialis*, que se cultiva en fotobiorreactores pechados para a obtención do carotenoide astaxantina. Os ácidos graxos  $\omega$ -3, especialmente o DHA, tamén teñen interese para a nutrición humana e inclúense nas formulacións dos alimentos infantís. O DHA obtense principalmente dos cultivos heterotróficos de *Cryptocodinium cohnii* e *Schizotrychium* (Wikfors e Ohno, 2001), pero varias especies de microalgas están tamén consideradas como potenciais e prometedoras fontes de ácidos graxos  $\omega$ -3: *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp., *Chlorella minutissima*, *Monodus subterraneus* ou *Phaeodactylum tricornutum*

(Borowitzka, 1988; Roessler, 1990; Yongmanitchai e Ward, 1991; Bajpai e Bajpai, 1993).

Paralelamente ao interés creado acerca das posibilidades das microalgas para o consumo humano, o desenvolvemento de medios de cultivo para microalgas mariñas (Provasoli *et al.*, 1957; Guillard e Ryther, 1962) e das técnicas de produción permitiu impulsar os cultivos de bivalvos e tamén dispoñer de alimento para a produción do alimento vivo destinado á cría de larvas de peixes e crustáceos. Nos anos 1960, coa intención de abaratar a produción de bivalvos, leváronse a cabo ensaios para reemplazar as microalgas por dietas artificiais (Robert e Trintignac, 1997; Muller-Feuga, 2000). O fracaso destas tentativas foi a razón de que os esforzos se dedicasen entón a profundizar no estudo da calidade nutritiva das microalgas e a súa relación coa composición bioquímica das mesmas (Wikfors e Ohno, 2001). Así, observouse que a variabilidade bioquímica debida ás condicións de cultivo dentro dunha cepa podía ser maior que a variabilidade entre cepas distintas, e tamén se suxeriu que o valor nutritivo das diferentes especies podía deberse á presenza ou ausencia de determinados nutrientes máis que ao seu contido de proteínas, lípidos ou glúcidos (Parsons *et al.*, 1961).

Hoxe en día, a produción acuícola constitúe a principal aplicación das microalgas e a necesidade de abaratar os custos deu lugar á aparición de dúas tendencias complementarias na investigación sobre a produción de microalgas para acuicultura. Por unha banda, o desenvolvemento de derivados liofilizados ou concentrados a partir de biomasa microalgal producidos en empresas especializadas. Por outra, a introdución de técnicas que permitan cultivar microalgas *in situ* de forma relativamente sinxela, aplicando ao mesmo tempo os coñecementos sobre a fisioloxía das microalgas para conseguir a mellor calidade nutritiva posible.

Os sistemas de cultivo de microalgas, e tamén doutros microorganismos, poden clasificarse en catro tipos básicos:

*Cultivo "batch"*. Tamén se denomina cultivo discontinuo, pechado ou masivo. Neste sistema non se engade ningún substrato nin se retira ningún produto ata o

final do proceso. Este tipo de cultivos son sistemas pechados, coa excepción da entrada de gases nos sometidos a aireación, nos que as células se multiplican de forma expoñencial (fase logarítmica) ata que a taxa de división celular diminúe polo esgotamento dalgún dos nutrientes ou pola acumulación dalgún metabolito ata alcanzar niveis tóxicos. Polo tanto, a concentración de nutrientes nos cultivos discontinuos cambia ao longo do tempo como consecuencia do crecemento do microorganismo. Cando a taxa de crecemento diminúe ata valores próximos a cero, os cultivos están en fase estacionaria.

*Cultivo continuo.* O substrato é engadido de forma continua e o produto tamén se retira de forma continua, de maneira que o volume de cultivo é constante, ao igual que a concentración de substrato e de microorganismos unha vez alcanzado o estado de equilibrio. Existen dúas variantes principais dos sistemas de cultivo continuo: quimiostatos e turbidostatos. Os quimiostatos caracterízanse por que o medio é introducido no cultivo cunha taxa constante. A concentración no medio dun nutriente limitante determina a densidade do microorganismo en cultivo, e o fluxo ou taxa de dilución determina a taxa de crecemento. Nos turbidostatos a densidade de poboación é controlada por un fotosensor de maneira que se mantén nun nivel preestablecido e todos os nutrientes son engadidos en exceso (Tempest, 1978).

*Cultivo "fed-batch".* Neste tipo de cultivos o substrato engádese de forma constasnte, pero non se retira o produto, polo que o volume do cultivo se incrementa co tempo. Este sistema é o que se utiliza industrialmente para a produción de levadura de pan e penicilina.

*Cultivo semicontinuo.* Conceptualmente similar ao sistema continuo, diferénciase deste en que unha parte do cultivo é retirada do fermentador e substituída por medio fresco a intervalos de tempo fixos. A porcentaxe de cultivo retirada diariamente denomínase taxa de renovación. Con esta técnica mantéñense elevadas taxas de división. Polo tanto, a pesar de que a produción é continua, a concentración de substrato e microorganismos non é constante ao longo do tempo. O sistema semicontinuo é unha alternativa aos sistemas continuos especialmente indicada no caso das microalgas sometidas a periodos circadianos de luz e escuridade, xa que a sincronización da división celular que se produce

nestas condicións non fai recomendable o cultivo continuo. Se os ciclos de renovación se fan coincidir cos ciclos circadianos, a biomasa obtida posúe as características de homoxeneidade e estabilidade dos cultivos continuos. Propúxose o termo ciclostato para denominar a este tipo de cultivos sometidos a ciclos de luz e escuridade e diferencíalos dos quimiostatos estándar (Chisholm *et al.*, 1975).

Os sistemas de produción de microalgas máis comúns nas instalacións de acuicultura consisten en fotobiorreactores cilíndricos de 100 ou 150 l de volume, ou tanques rectangulares de paredes opacas que son iluminados desde a superficie. Estes sistemas son operados en réxime discontinuo, e a baixa dispoñibilidade de luz e a utilización de medios con concentracións baixas de nutrientes tales como o medio f/2 (Guillard e Ryther, 1962) ou o medio Conway (Walne, 1966) dan lugar a produtividades moi pequenas, da orde de 0,12 g/l ao cabo de cinco días de cultivo (Muller-Feuga *et al.*, 2003). Fronte a estes métodos de produción tan pouco eficientes, os sistemas de produción semicontinua de microalgas con medios de cultivo ricos en nutrientes permiten obter produtividades notablemente máis elevadas (Otero, 1994).

Ademais de escoller un sistema de produción axeitado, tamén deben seleccionarse os parámetros de cultivo, xa que a dispoñibilidade de luz e nutrientes, así como a temperatura, determina a produtividade e a composición bioquímica das microalgas tanto en sistemas discontinuos como continuos. A dispoñibilidade de luz e CO<sub>2</sub> é indispensable para obter elevadas taxas de crecemento e densidade celulares elevadas nos cultivos de microalgas (Lubián *et al.*, 1986; Sukenik *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 1990; Gordillo *et al.*, 1998; Fábregas *et al.*, 2004). A salinidade do medio de cultivo e a concentración de nutrientes poden ser ademais utilizadas para modificar a composición bioquímica das microalgas en cultivo batch (Fábregas *et al.*, 1984; 1985a; 1985b; 1986a; 1986b; 1987; 1989). Porén, os cultivos continuos e semicontinuos proporcionan a ferramenta máis eficaz para estudar as respostas fisiolóxicas fronte aos cambios ambientais, xa que a diferenza dos sistemas discontinuos permiten controlar as condicións de cultivo, a densidade celular e a taxa de crecemento das microalgas, manténdolas respectivamente constantes ou suxeitas a variacións de acordo cun ritmo circadiano.

As investigacións realizadas sobre o cultivo semicontínuo dun amplo grupo de microalgas (*Tetraselmis suecica*, *Chlorella autotrophica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Porphyridium cruentum*, *Dunaliella tertiolecta*) permitiron observar respostas similares aos cambios na taxa de renovación e na concentración de nutrientes en todas as especies estudadas (Arredondo-Vega *et al.*, 1995; Fábregas *et al.*, 1995a; 1995b; 1996a; 1996b; 1996c; 1998; Otero e Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1995; 1997a; 1997b; 1998):

1. A densidade celular de estabilización descende ao incrementarse a taxa de renovación. Debido a isto a evolución da produtividade celular adopta unha forma parabólica, alcanzando valores máximos nas taxas de renovación intermedias.
2. O contido celular de clorofilas e carotenoides increméntase coa taxa de renovación en condicións de limitación por nitróxeno, de maneira que a concentración de clorofila por mililitro se mantén en valores estables nestas condicións (Otero *et al.*, 1998).
3. O contido orgánico celular descende ao incrementarse a taxa de renovación, independentemente do estado nutricional do cultivo (Fábregas *et al.*, 1996a).
4. En condicións de limitación por nutrientes, o aumento da taxa de renovación dá lugar a un incremento da porcentaxe de proteína na fracción orgánica ao tempo que diminúen as porcentaxes de glúcidos e/ou lípidos. Mentres que estas condicións provocan un descenso da porcentaxe de glúcidos en tódalas especies estudadas, a evolución do contido de lípidos varía segundo a especie.
5. En condicións de saturación por nitróxeno a composición relativa da fracción orgánica estabilízase (Fábregas *et al.*, 1996c).
6. En condicións de saturación por nitróxeno o contido celular de proteína diminúe cando se incrementa a taxa de renovación debido ao descenso

do contido orgánico celular e a que a composición relativa permanece constante (Otero e Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1997a).

7. En condicións de limitación por nutrientes prodúcese un incremento da porcentaxe de ácidos graxos insaturados ao aumentar a taxa de renovación (Otero *et al.*, 1997a; 1997b), xa que os lípidos de reserva son substituídos por lípidos de membrana ricos en ácidos graxos poliinsaturados.
8. O contido celular de esteroides descende cando aumenta a taxa de renovación independentemente da condición nutricional do cultivo (Fábregas *et al.*, 1997).

A variación da taxa de dilución aplicada ao cultivo continuo provoca modificacións na composición bioquímica das microalgas que se traducen en grandes variacións do valor nutritivo das mesmas (Scott, 1980; Taub, 1980). Da mesma maneira, modificar a taxa de renovación e/ou a concentración de nutrientes nos sistemas semicontínuos ten un enorme impacto sobre a composición e a calidade nutritiva das microalgas, como xa foi demostrado en *Artemia* (Fábregas *et al.*, 1996b, 1998, 2001). Sorprendentemente, todas as posibilidades que os sistemas de cultivo continuo ou semicontínuo ofrecen para obter produtividades relativamente altas de microalgas con elevados contidos de proteínas e ácidos graxos poliinsaturados non soen ser tidas en consideración pola maioría das instalacións de acuicultura, que producen as súas microalgas en sistemas discontinuos pouco eficientes. A introdución de novos modelos de fotobiorreactores de manexo sinxelo permitiría aumentar o rendemento dos cultivos de microalgas e obter biomasa de mellor calidade nutritiva.

As dúas especies de microalgas utilizadas neste traballo, *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO, pertencen a dous dos xéneros de microalgas máis utilizados en acuicultura. *Nannochloropsis* é apreciada polo seu contido de proteínas e EPA (Volkman *et al.*, 1993), e *N. oculata* é habitualmente empregada para o cultivo de rotíferos, soa ou en combinación con levadura (Fukusho, 1989) e tamén para o enriquecemento, xa que proporciona aos

rotíferos un elevado contido de EPA (Watanabe *et al.*, 1983). *Isochrysis* aff. *galbana* Clon T-ISO constitúe un bo alimento para as larvas de bivalvos, aínda que debe combinarse cunha diatomea (Ewart e Epifanio, 1981; Helm e Laing, 1987). T-ISO tamén se utiliza no enriquecemento de rotíferos e nas técnicas de “auga verde” polo súa elevada porcentaxe de DHA (Øie *et al.*, 1997).



## **Obxectivos**

---



## Obxectivo xeral

Estudo das condicións óptimas para o cultivo en réxime semicontínuo de dúas microalgas mariñas (*Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis* aff. *galbana* Clon T-ISO) para a mellora do perfil bioquímico de *Brachionus plicatilis* en experimentos de enriquecemento e cultivo, mediante a variación da taxa de renovación e da intensidade luminosa.

## Obxectivos particulares

Estudo do efecto da dispoñibilidade de luz e de CO<sub>2</sub> sobre a composición bioquímica de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo discontinuo.

Estudo do efecto da taxa de renovación e da intensidade luminosa sobre a composición bioquímica de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo semicontínuo.

Estudo do efecto da taxa de renovación sobre a composición bioquímica de *Nannochloropsis gaditana* en cultivo semicontínuo.

Estudo das modificacións na composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* producidas polo enriquecemento durante 24 h con *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivadas en sistema semicontínuo con distintas taxas de renovación.

Cultivo de *Brachionus plicatilis* con *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) procedente de cultivo semicontínuo: efecto da taxa de renovación do cultivo microalgal sobre o crecemento poboacional e a composición bioquímica do rotífero.

Estudo do efecto da utilización de distintas cantidades da microalga *Nannochloropsis gaditana* cultivada en sistema semicontínuo sobre a composición bioquímica de *Brachionus plicatilis*.

Estudo de efecto do tempo de enriquecemento con *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivadas en sistema semicontínuo sobre a composición de ácidos graxos de *Brachionus plicatilis*.

Estudo da acumulación de oligoelementos nas microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo semicontínuo e en *Brachionus plicatilis* alimentado con estas microalgas.



## **Materiais e métodos**



## Sistemas de cultivo de microalgas e rotíferos

Para o cultivo de microalgas utilizáronse minifotobiorreactores tubulares de vidro, de fondo cóncavo e 30 mm de diámetro, con 80 ml de volume de cultivo. Cada tubo conectouse a un sistema de aireación que proporcionou un fluxo de aire continuo de 230 ml/min, suplementado durante o periodo de luz con pulsos de de CO<sub>2</sub> de 10 s de duración cada 10 min, coa finalidade de proveer os cultivos dunha fonte de carbono inorgánico e ao mesmo tempo manter o pH entre 7,5 e 8. Os biorreactores mantivéronse nunha cámara de cultivo a unha temperatura de 22 °C e un fotoperiodo circadiano de 12 h de luz e 12 h de escuridade. A iluminación consistiu en tubos fluorescentes Mazda Fluor Lumière du Jour 36W/LJ (Figura 1). Outro sistema de cultivo empregado (Capítulo 9) consistiu en botellas de 90 mm de diámetro e 1 l de capacidade con 900 ml de cultivo mantidas nas mesmas condicións que os fotobiorreactores.



**Figura 1.** Sistema de cultivo de microalgas en fotobiorreactores de 80 ml. *Isochrysis* aff. *galbana* Clon T-ISO (arriba) e *Nannochloropsis gaditana* (abaixo).



**Figura 2.** Sistema de cultivo de *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis* aff. *galbana* T-ISO en botellas de 1 l.

O medio de cultivo preparouse autoclavando auga de mar a 120 °C durante 20 minutos, axustando previamente a salinidade a 3,5% cun refractómetro Atago S/mill. Unha vez autoclavada e fría, enriqueceuse con nutrientes inorgánicos e orgánicos nas seguintes concentracións:  $\text{KNO}_3$ , 4 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,22 mM;  $\text{ZnCl}_2$ , 2,29  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnCl}_2$ , 3,4  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaMoO}_4$ , 2,72  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CoCl}_3$ , 0,38  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$ , 0,46  $\mu\text{M}$ ; citrato férrico, 21,2  $\mu\text{M}$ ; tiamina, 1 mg/l; biotina, 13,4  $\mu\text{g/l}$ ; vitamina  $\text{B}_{12}$ , 9,4  $\mu\text{g/l}$ ; EDTA, 4,7 mg/l (modificado de Fábregas *et al.*, 1984). Nos cultivos realizados en botellas a concentración de  $\text{KNO}_3$  foi 2,5 mM e tódolos demais nutrientes engadíronse en proporción.

Os fotobiorreactores –tubos e botellas– inoculáronse cunha densidade inicial de microalgas correspondente ao 10% ou 15% da densidade celular máxima alcanzada na fase estacionaria. Os cultivos deixáronse medrar ata o final da fase logarítmica. Considerouse que se alcanzara a fase estacionaria cando a densidade celular se mantiña constante durante tres días consecutivos como mínimo. Nese momento iniciouse o réxime semicontínuo. Basicamente, o sistema de cultivo semicontínuo consiste en retirar diariamente unha parte do cultivo,



substituíndoo por medio fresco. Esta operación realízase durante a primeira hora do ciclo de luz, que segundo os estudos existentes é o momento máis conveniente (Otero, 1995). A porcentaxe de volume de cultivo que se retira denomínase taxa de renovación. Nos experimentos realizados as taxas de renovación empregadas foron o 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, que corresponden a taxas de crecemento de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 divisións/día. O estado de estabilización alcánzase cando a densidade celular nos cultivos se mantén constante durante polo menos tres días consecutivos.

O rotífero *Brachionus plicatilis* cultivouse de forma rutinaria en botellóns de 6 l con auga de mar autoclavada durante 20 min a 120 °C, sometido a aireación suave e fotoperiodo circadiano de 12 h de luz e 12 h de escuridade nunha cámara de cultivo a 22 °C. Diariamente os rotíferos foron alimentados con microalgas frescas de varias especies: *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* aff. *galbana* clon T-ISO, *Rhodomonas lens* e *Phaeodactylum tricornutum*. Aproximadamente cada quince días os rotíferos filtrábanse e pasábanse a un novo botellón con auga de mar limpa. Este proceso realizouse tamén dous días antes de iniciar os experimentos con rotíferos. Para realizar os experimentos de enriquecemento e cultivo os rotíferos transferíronse a botellas de 1 l de capacidade, sometidos a un fluxo de aire de 120 ml/minuto aproximadamente e un ciclo de luz:escuridade 12 h:12 h cun tubo fluorescente Mazda Fluor Lumière du Jour 36W/LJ (Figura 3). A intensidade luminosa foi de 54  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .



Figura 3. Sistema de cultivo do rotífero *Brachionus plicatilis* en botellas de 1 l.

## **Reconto celular e obtención de biomasa seca de microalgas e rotíferos**

O reconto de células realízase sobre o volume retirado ó renovar os cultivos, antes de adicionar medio fresco. Para calcular a densidade celular fixéronse dilucións en auga de mar e contáronse as células mediante unha cámara Improved Neubauer (Brand) nun microscopio de contraste de fases Nikon Labophot. A dilución fíxose de maneira que en cada campo de reconto de 1 mm<sup>2</sup> o número de células estivese entre 30 e 300.

A biomasa microalgal para realizar análise elemental e determinacións de proteínas, glúcidos, lípidos, pigmentos e ácidos graxos recolleuse centrifugando 5 ou 10 ml de cultivo nunha centrífuga de rotor basculante Kubota KS8000 a 3.100 rpm, en tubos de vidro. Retírouse o sobrenadante e os tubos contendo o pellet almacenáronse a -30° C.

Os rotíferos filtráronse a través dun filtro de 300 µm de luz de malla para eliminar as pseudofeces; a continuación recolléronse nunha malla de 60 µm, laváronse con auga destilada e liofilizáronse. O liofilizado repartiuse en tubos ( 4-5 mg de biomasa por tubo) que se almacenaron en conxelador a -30° C para as posteriores determinacións de proteínas, glúcidos, lípidos e análise elemental. Para os análises de ácidos graxos as mostras de rotíferos non foron liofilizadas senón que se recolleron en filtros de malla de 40 µm de luz e conxeláronse a continuación.

## **Cálculo da taxa de crecemento**

Utilizouse a mesma magnitude,  $r$  (día<sup>-1</sup>) para designar a taxa de crecemento dos cultivos discontinuos de microalgas (Capítulo 1) e a taxa de crecemento dos cultivos de rotíferos (Capítulo 7). Calculouse segundo a seguinte fórmula (Scott e Baynes, 1978; Wood *et al.*, 2005):

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}$$

onde  $N_t$ =densidade celular final ou número de rotíferos finais,  $N_0$ =densidade celular inicial ou número de rotíferos iniciais e  $t-t_0$ =duración do cultivo en días.

### **Determinación da concentración de nitrato no medio de cultivo de microalgas**

Centrifúganse 2 ml de cultivo durante 15 minutos a 3.100 rpm. O sobrenadante fíltrase a través dun filtro de fibra de vidro Whatman GF/C de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  a outro tubo. A concentración de  $\text{NO}_3^-$  determinouse por espectrofotometría empregando unha lonxitude de onda de 220 nm (Collos *et al.*, 1999). Como patrón utilizouse unha serie de dilucións de  $\text{NaNO}_3$  en auga de mar. Os valores de absorbencia destas dilucións axustáronse a unha recta por mínimos cadrados a partir da cal se interpolou a concentración de nitrato no medio de cultivo.

### **Determinación do peso seco**

A recollida de microalgas para a determinación do peso seco realizouse mediante filtros Whatman GF/C lavados con auga destilada. Os filtros laváronse con auga destilada, deixáronse secar e carbonizáronse previamente nun forno a 500  $^\circ\text{C}$  durante 12 h para eliminar as trazas de materia orgánica que puideran conter, e posteriormente pesáronse nunha balanza analítica Sartorius modelo 2405 ( $d=\pm 0,001$  mg). A través deles filtráronse entre 5 e 15 ml de cultivo, segundo a densidade celular de cada un (canto menor foi a densidade celular máis volume de cultivo se filtrou, para minimizar os posibles erros debidos á técnica). Para eliminar as sales procedentes da auga de mar os filtros laváronse tres veces cunha disolución isotónica (0,5 M) de formiato amónico. O filtrado sécase durante toda a noite nun forno a 80  $^\circ\text{C}$  e a continuación os filtros pésanse na mesma balanza analítica. O peso seco é a diferenza entre o peso do filtro carbonizado e o peso do filtro unha vez filtrada a mostra (Utting, 1985).

A determinación do peso seco dos rotíferos fíxose dun xeito similar, coa diferenza de que os filtros lávanse con auga destilada e non con formiato amónico.

### **Análise elemental (C-H-N)**

Para a determinación do peso seco liofilizado, as mostras contidas en tubos previamente pesados e conxeladas a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  foron inmediatamente transferidas a un liofilizador Labconco Lyph-Lock 6. Unha vez liofilizada a biomasa, os tubos foron pesados de novo para a determinación do peso seco das mostras empregadas para a análise elemental.

As análises da composición elemental (carbono, hidróxeno e nitróxeno, CHN) realizáronse sobre alicuotas da biomasa liofilizada homoxeneizada. Pesáronse entre 1 e 2 mg de mostra nunha balanza analóxica Sartorius ( $d \pm 0,001\text{ mg}$ ) nunha cápsula especial de estaño. Para a realización das análises utilizouse un autoanalizador Carlo Erba 1108, equipado cun autosampler AS200.

O método analítico baséase na oxidación instantánea e completa da mostra, que converte todas as substancias orgánicas e inorgánicas en produtos da combustión. Os gases resultantes da combustión pasan a través dun forno de redución e son arrastrados ó interior da columna cromatográfica (Porapak Q/S) polo gas transportador, neste caso helio, onde son separados para a súa detección por un detector de condutividade térmica, que emite un sinal proporcional á concentración dos compoñentes individuais da mostra.

O instrumento calíbrase con acetanilida, estándar aconsellado para mostras con alto contido orgánico, sendo a concentración das mostras calculada mediante un algoritmo de regresión lineal en base á área debaixo dos picos xerados polo detector. Para a realización destes cálculos o autoanalizador está equipado cun ordenador (EAGER 200 Workstation).

## **Determinación do contido de proteínas**

O método empregado para a determinación do contido proteico consiste nunha modificación do método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) proposta por Herbert *et al.* (1971). O "reactivo de fenol" de Folin & Ciocalteu, que é esencialmente unha solución de ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, é reducido polos fenóis (e por outras moitas sustancias) a "azul de molibdeno" que pode ser determinado colorimetricamente. As proteínas reducen o reactivo de fenol, que pode ser polo tanto utilizado para a súa determinación. Sen embargo, a cantidade de color producida varía en gran medida para distintas proteínas, xa que esta reacción é debida case enteiramente ó seu contido en tirosina e triptófano, sendo pouco influíntes os demais aminoácidos. A causa disto, a reactividade deste ensaio fronte a unha determinada proteína dependerá da composición da mesma e da presenza doutra substancia que poida oxidar o reactivo de fenol de Folin (Herbert *et al.*, 1971).

O pretratamento das proteínas con álcali e a presenza de trazas de sales de cobre no medio incrementan a cor producida co reactivo de Folin. As sales de cobre non incrementan a cromoxenicidade dos aminoácidos libres tirosina e triptófano e o efecto é presumiblemente debido á formación de complexos do cobre con outros aminoácidos. Esta modificación do método orixinal de Folin non só incrementa a sensibilidade senón que tamén reduce as diferencias en cromoxenicidade de distintas proteínas. Un estudio complexo desta técnica foi realizado por Lowry *et al.* (1951), e unha adaptación do mesmo para a análise de microorganismos foi proposta máis tarde por Herbert *et al.* (1971).

Para a realización das análises recolléronse 4-5 mg da mostra liofilizada de rotíferos ou 2-5 ml de cultivo de microalgas centrifugado (3.100 rpm, 15 min, posteriormente conxelado). Sometéronse a hidrólise engadindo 2 ml de NaOH 1 N, a unha temperatura de 95-100 °C durante 60 min, en tubos tapados. As mostras deixáronse enfriar e clarificáronse por centrifugación (3.100 rpm, 10 min). Transferíronse por triplicado entre 0,1 e 0,4 ml desta solución a un novo tubo e engadíronselles o volume necesario de NaOH 1 N ata completar 0,4 ml en total e 0,4 ml de auga destilada. A esta mestura, igual que á curva patrón e a un branco elaborado con 0,4 ml de NaOH 1 N e 0,4 ml de auga destilada

engadíronselles 2 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ao 5% (peso:volumen) ó que se lle engade previamente unha solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  ao 0,5% (peso:volumen) en tartrato de sodio-potasio ó 1% (peso:volumen), nunha relación 50:2 (volumen:volumen). As mostras déixanse reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente antes de engadirles 0,4 ml do reactivo comercial de fenol Folin:Ciocalteau (Panreac) diluído á metade con auga destilada.

As mostras deixáronse repousar a temperatura ambiente durante 30 min antes de ler a absorbencia a 750 nm nun espectrofotómetro HP8453-DA empregando unha cubeta de vidro de 1 cm contra o branco tratado cos mesmos reactivos.

Como patrón utilizouse unha dilución de 1 mg/ml de sero-albúmina bovina (BSA). A curva patrón elaborouse con 25, 50, 75, 100, 200 e 400  $\mu\text{l}$  desta disolución. Os resultados da absorbencia da curva patrón axustáronse por mínimos cadrados a unha ecuación de segundo grado a partir da que se calcularon por interpolación os valores da proteína das mostras problema.

### **Determinación do contido de lípidos**

Para a determinación do contido en lípidos da biomasa utilizouse unha proba cuantitativa baseada na carbonización (Marsh e Weinstein, 1966), que é un método rápido e cunha sensibilidade maior que outros métodos colorimétricos (Amenta, 1964; Dittmer e Wells, 1969). Este método xeral e inespecífico permite unha rápida estimación dos lípidos totais dunha mostra biolóxica. As principais vantaxes deste procedemento son a súa rapidez, sensibilidade, reproductibilidade e o emprego dun reactivo simple e estable como é o ácido sulfúrico concentrado.

Para a súa posterior determinación, os lípidos extraéronse polo procedemento de Bligh e Dyer (1959) tal e como describen Holland e Gabbott (1971). Pesáronse 4-5 mg da mostra liofilizada de rotífero ou 2-5 ml de cultivo microalgal fresco e centrifugado (3.100 rpm, 15 min) posteriormente conxelado. Engadíronse á mostra 4,5 ml de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2 volumen:volumen). Para facilitar a extracción as mostras tratáronse cun disruptor celular durante 5 minutos ou con

sonicador durante 1 minuto no caso de T-ISO, que ao carecer de parede celular grosa non precisa tratamento con disruptor. Centrifugáronse (3.100 rpm, 10 min) e recolleuse o sobrenadante, ó que se engadiron 1,5 ml de  $\text{CHCl}_3$  e 1,5 ml de auga destilada para a separación das fases polar e apolar. Os tubos axitáronse e centrifugáronse durante 5 min a 3.100 rpm para facilitar a separación das dúas fases. A fase apolar (inferior) extraeuse cunha pipeta Pasteur e pasouse a un novo tubo. O extracto lipídico así obtido secouse mediante a evaporación do  $\text{CHCl}_3$  nun forno a 37 °C. Este extracto lipídico total resuspendeuse en 1 ml de  $\text{CHCl}_3$ , do que se tomaron por triplicado alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ , que se secan novamente no forno a 37 °C. Para elaborar a curva patrón, paralelamente preparouse unha disolución de tripalmitina (Sigma, T-58888) de 0,3 mg/ml en  $\text{CHCl}_3$ . Esta repartiuse en tubos con 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9 ml por triplicado que son evaporados igual que as mostras.

Unha vez evaporado o solvente das mostras e da curva patrón, os tubos retíranse do forno e déixanse enfriar. A continuación engádense a cada tubo 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, e prepárase un branco tamén con 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos (mostras, patrón e branco) colócanse nun forno a 200 °C durante 15 min para a carbonización do extracto lipídico. Transcorrido este tempo os tubos enfríanse a temperatura ambiente durante 5 min e a 4 °C outros 5-10 min. A continuación engádense 3 ml de auga destilada a cada tubo, mesturando ben con axuda dun axitador vórtex. Os tubos enfríanse de novo a 4° C. Unha vez fríos retíranse do frigorífico e déixanse a temperatura ambiente uns 10 min, ata que desaparecen todas as burbullas.

A absorbencia das mostras mídese a 375 nm nun espectrofotómetro HP8453-DA en cubetas de vidro de 1 cm contra o branco. Esta é a lonxitude de onda á que a proba presenta unha maior sensibilidade. A 375 nm a relación entre a absorbencia e as concentracións de lípidos é lineal para todas as clases de lípidos ensaiados (Marsh e Weinstein, 1966).

Os valores de lectura dos tubos de tripalmitina utilizáronse para o cálculo da recta patrón mediante un axuste lineal por mínimos cadrados. As cantidades de lípidos nas mostras problema calculáronse por interpolación a partir desta recta.

## **Determinación do contido de glúcidos en biomasa e sobrenadante**

Todos os métodos propostos para a determinación de glúcidos totais son colorimétricos e derivan do test de Molish para glúcidos; implican o quencemento do material con ácido sulfúrico concentrado e un composto causante de cor que usualmente é unha amina aromática ou un fenol (Herbert *et al.*, 1971). O fenol é un alcohol moi reactivo que reacciona cos glúcidos dando lugar a un complexo coloreado de tonalidade entre amarelo e marrón, segundo a concentración de glúcidos. Esta relación é lineal a unha lonxitude de onda de 485 nm.

O método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) continúa a ser o máis empregado e a penas foi modificado. É moi insensible á interferencia con proteínas e a cor producida é moi estable. Existe a posibilidade de interferencia polas pentosas compoñentes dos ácidos nucleicos, pero a súa simplicidade fai que sexa o método máis estendido neste tipo de investigacións (Kochert, 1978). O nitrato tamén interfere cando se determina o contido de exopolisacáridos en mostras de medio de cultivo, pero este problema pode evitarse diluíndo a mostra.

Para a determinación do contido de glúcidos en biomasa utilizáronse 4-5 mg da mostra de rotíferos liofilizada ou 2-5 ml de cultivo microalgal centrifugado (3.100 rpm, 15 min) e posteriormente conxelado. Resuspendeuse a biomasa en 4 ml de NaOH 1 N. As mostras tratáronse nun disruptor ou nun sonicador para facilitar a hidrólise. Deste hidrolizado repartíronse por triplicado alícuotas de 0,5 a 1 ml. Se o volume era inferior a 1 ml, completouse ata esta cantidade con NaOH 1 N. Preparouse tamén un branco con 1 ml de NaOH 1 N e unha recta patrón cunha disolución de glucosa anhidra 0,1 mg/ml en NaOH 1 N que se repartiu en tubos con 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 ml, enrasándose os tubos ata 1 ml con NaOH 1 N.

Ós tubos engadíronselles 25  $\mu$ l de fenol ao 80% en auga destilada e mesturáronse ben nun axitador vórtex. Inmediatamente adicionáronse 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (riqueza 95,5 %,  $d=1,84$ ), dirixindo a caída do ácido cara á superficie do líquido e axitando o tubo no vórtex. Despois de repousar 30 min a temperatura ambiente, a absorbencia das mostras leuse a 485 nm nun



espectrofotómetro HP8453-DA en cubetas de vidro de 1 cm contra o branco. Os valores da mostra de glucosa axustáronse a unha recta por mínimos cadrados da que por extrapolación se calculou o contido de glúcidos das mostras problema.

Para determinar o contido de exopolisacárido en mostras de sobrenadante do cultivo de T-ISO o sobrenadante foi diluído nunha proporción 1:5 con auga de mar autoclavada. Desta dilución repartiéronse alícuotas de 1 ml ás que se lles engadiron directamente 25  $\mu$ l de fenol ó 80% e 2,5 ml de ácido sulfúrico. Deixáronse repousar 30 minutos e leuse a absorbencia a 485 nm. O branco consistiu en auga de mar autoclavada.

### **Cálculo do valor calórico da biomasa**

O valor calórico calculouse a partir do contido de proteínas, lípidos e glúcidos obtido mediante as técnicas analíticas anteriormente descritas, utilizando as fórmulas de conversión propostas polo National Research Council (1977):

$$\text{Valor calórico (Kcal/g)} = (5,72 \times \text{peso proteína}) + (9,50 \times \text{peso lípidos}) + (4,03 \times \text{peso glúcidos})$$

A conversión de calorías a joules realizouse tendo en conta a relación

$$1 \text{ caloría} = 4,185 \text{ joules}$$

### **Determinación do contido de pigmentos**

O contido de pigmentos determinouse mediante un método espectrofotométrico que permite obter os contidos celulares das distintas clases de clorofilas pero non permite distinguir entre os distintos carotenoides, polo que

se determinou o contido de carotenoides totais. Os tubos contendo mostras de 2 ou 5 ml de cultivo de microalgas previamente centrifugadas e conxeladas recubríronse con papel de aluminio e mantivéronse en xeo durante todo o proceso de extracción para evitar a degradación dos pigmentos pola acción da luz ou do osíxeno. A estas mostras engadíronselles 3 ml de acetona ao 90% (diluída con auga destilada) e sonicáronse durante 1 min. Tras a sonicación centrifugáronse durante 15 minutos a 4 °C e 3.100 rpm nunha centrífuga Hettich Universal 32R. O sobrenadante transferiuse a unha cubeta de vidro de 1 cm para a determinación espectrofotométrica do contido de pigmentos nun espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453E-DA. A absorbencia (A) das mostras mediuse ás lonxitudes de onda 480, 630, 664 e 667 nm.

Os cálculos realizáronse mediante as ecuacións propostas por Jeffrey e Humphrey (1975) para a determinación de clorofilas e as de Strickland e Parsons (1972) para a determinación de carotenoides totais:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 11,47 A_{664} - 0,40 A_{630}$$

$$\text{Clorofilas } c_1 + c_2 \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 24,36 A_{647} - 3,73 A_{630}$$

$$\text{Carotenoides totais (}\mu\text{g/ml)} = 4 A_{480}$$

O contido de clorofilas *c* pode ser subestimado se é moito menor que o contido de clorofila *a*; aínda así as ecuacións de Jeffrey e Humphrey (1975) son máis precisas que outras ecuacións (Jeffrey e Welschmeyer, 1997).

### **Análise de ácidos graxos**

A obtención dos ácidos graxos consta de dúas fases. En primeiro lugar realízase unha extracción dos lípidos da mostra e a continuación o extracto lipídico é esterificado para obter os ésteres metílicos dos ácidos graxos que serán analizados nun cromatógrafo de gases.

A extracción dos lípidos realizouse segundo o método de Bligh e Dyer (1959) a partir de mostras conxeladas de cultivo de microalgas fresco e centrifugado (3.100 rpm, 15 min) ou de 4-5 mg de rotífero tamén conxelados. Os lípidos extraéronse con 3 ml de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2 v:v). Para facilitar a extracción as mostras de rotífero deixáronse repousar a 4 °C durante 30 minutos e posteriormente tratáronse cun disruptor celular durante 5 min, igual que as mostras de *Nannochloropsis gaditana*. As mostras de T-ISO tratáronse cun sonicador durante 1 minuto. En todo momento os tubos contendo as mostras mantivéronse en xeo e tapados con papel de aluminio para evitar no posible a degradación dos ácidos graxos. Os extractos lipídicos centrifugáronse durante 10 minutos e recolleuse o sobrenadante, engadíndose 1,8 ml de auga destilada e 1,8 de  $\text{CHCl}_3$ . Separáronse as fases por centrifugación e eliminouse a fase acuosa. Á fase apolar engadíronselle 50  $\mu\text{l}$  dunha disolución 1 mg/ml de triheptadecanoína (Sigma) como estándar interno. Evaporouse o cloroformo mediante un fluxo de  $\text{N}_2$  e os extractos lipídicos foron sometidos a metanolise mediante a adición de 2 ml de  $\text{HCl}:\text{CH}_3\text{OH}$  ao 5% en peso e tratamento a 85 °C durante 2,5 horas (Sato e Murata, 1988). Os metilésteres dos ácidos graxos obtidos separáronse da fase polar mediante unha dobre extracción con hexano e foron concentrados por evaporación con  $\text{N}_2$  do disolvente ata un volume de 100 ou 200  $\mu\text{m}$ , dependendo do grado esperado de concentración dos ácidos graxos.

A separación e identificación dos ácidos graxos realizouse nun cromatógrafo de gases GC8000 Series acoplado a un espectrómetro de masas MD800 Perkin-Elmer, usando unha columna Omegawax<sup>TM</sup> 250 fused silica (Supelco) de 30 m de lonxitude e 0,25 mm de diámetro. As condicións da análise foron as seguintes: volume inxectado, 1  $\mu\text{l}$ ; gas portador, He; fluxo de gas portador na columna, 0,8 ml/min; relación split, 1,99; temperatura inxector, 230 °C. Método do cromatógrafo: tempo de splitless, 1 min; rango de temperaturas, 1 min a 35 °C, rampa de 35 °C/min ata 200 °C e 45 min a 200 °C. Método de adquisición de espectros de masas: retardo do solvente, 4,5 min; rango de masas, 10-400; tempo interscan, 30 s.

Os ácidos graxos foron identificados mediante a comparación dos espectros de masas cos espectros contidos na base de datos de espectros de

masas NIST e WILEY. Esta identificación foi confirmada mediante a comparación cun patrón comercial de metilésteres de ácidos graxos PUFA-3 (Metreya Inc., Pleasant Gap, PA, USA). O cálculo da concentración realizouse mediante a integración da área dos picos, que no sistema GC-MS é directamente proporcional á masa.

### **Determinación do contido de oligoelementos**

A determinación do contido de metais e algúns elementos non metálicos realizouse mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Nesta técnica, a mostra é normalmente transportada ó interior do aparello coma unha corrente líquida que se converte nun aerosol mediante o proceso coñecido como nebulización. A mostra en forma de aerosol transpórtase ó plasma, onde é desolvatada, vaporizada, atomizada e excitada e/ou ionizada polo plasma. O plasma é formado con un fluxo de argon que pasa a través de un campo de radiofrecuencia onde é mantido nun estado de ionización parcial. Isto permite alcanzar temperaturas moi altas, de aproximadamente uns 10.000 °C. A alta temperatura, a maior parte dos elementos emiten luz nunha lonxitude de onda característica. Esta radiación é detectada e pódese converter en información sobre concentración. A luz dos diferentes elementos que compoñen as mostras é separada en diferentes lonxitudes de onda por medio dunha renxela e é capturada por detectores sensibles á luz, un por cada elemento a analizar. Isto permite a análise de máis de 70 elementos químicos nunha mostra. En termos de sensibilidade, pódese comparar á absorción atómica de chama, aínda que os límites de detección atópanse normalmente en solucións acuosas a niveis de µg/L. O equipo utilizado foi un ICP-OES da marca PerkinElmer, modelo Optima 4300 DV.

O tratamento das mostras conxeladas de microalgas e as mostras liofilizadas de rotífero consistiu nunha hidrólise en ácido nítrico ao 65% a 90 °C durante 2 h. A continuación as mostras filtráronse e diluíronse con auga MilliQ ata

unha concentración de ácido nítrico do 6,5%. Tamén se preparou un branco con ácido nítrico ao 65% que se someteu ao mesmo tratamento que as mostras.

### **Tratamento estatístico das mostras**

Para realizar o tratamento estatístico utilizouse o software SPSS para Windows versión 14.0. Empregáronse tests non paramétricos debido ao pequeno tamaño das mostras ( $n < 30$ ), que impediu axustalas a unha distribución normal estándar.

A comparación das medias de dúas mostras realizouse mediante o test U de Mann-Whitney (Capítulos 1, 2, 3, 4, 7 e 8), mentres que para comparar as medias de máis de dúas mostras aplicouse o test H de Kruskal-Wallis (Capítulo 8).



## **Descripción das especies utilizadas**





### ***Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO)**

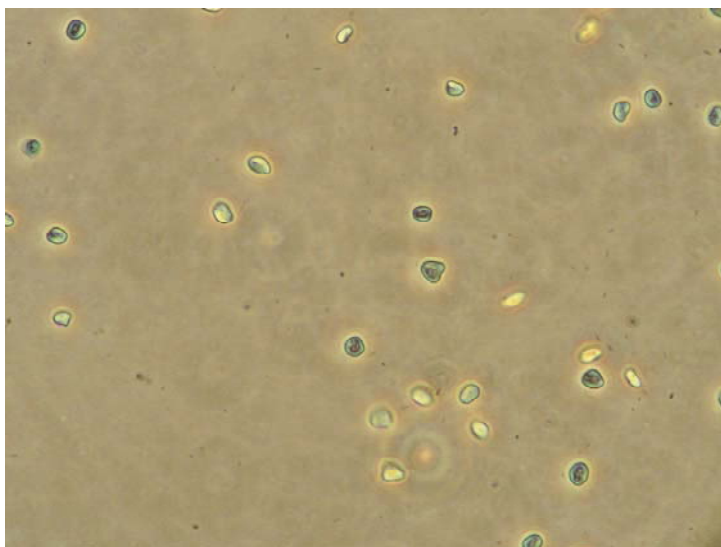
Pertence á División Prymnesiophyta, Clase Prymnesiophyceae, Orde Isochrysidales, Familia Isochrysidaceae, Xénero *Isochrysis*. A clase Haptophyceae (=Prymnesiophyceae) foi proposta por Christensen (1962) para acomodar a unha serie de organismos naquel momento incluídos na división Chrysophyta e que presentaban unhas características morfolóxicas que os diferenciaban doutras crisófitas. Máis adiante considerouse necesario crear unha nova división, Prymnesiophyta, e tamén se propuxo cambiar o nome da clase de Haptophyceae a Prymnesiophyceae (Hibberd, 1796). Coñécense uns 50 xéneros e aproximadamente 500 especies de primnesiófitas (Green *et al.*, 1990), pero constantemente descóbrense novas especies.

As primnesiófitas poden medir ata 30  $\mu\text{m}$  de diámetro pero a maioría das especies teñen un tamaño comprendido entre 2 e 20  $\mu\text{m}$  (Jeffrey e Vesk, 1997). Son de cor amarela-marrón e presentan variedade de formas, podendo ser esféricas, ovaladas, elipsoidais, fusiformes ou aplanadas (Heimdal, 1993). A maioría son de vida libre, móbiles, cocoides ou palmeloides, pero tamén hai especies formadoras de colonias e filamentos (Green *et al.*, 1990). Case todas as primnesiófitas son mariñas aínda que hai algunhas especies de auga dóce. Algunhas presentan reprodución sexual con alternancia de fases haploides e diploides (Gayral e Fresnel, 1983; Green *et al.*, 1990). Nas formas filamentosas algunhas células divídense dando 8 ou 16 células flaxeladas que se dispersan para dar lugar a novos filamentos (Green e Parke, 1975).

As células están recubertas de escamas que poden estar ou non calcificadas; as especies que presentan placas calcificadas –cocolitos– denomínanse cocolitofóridos. As escamas están compostas de polisacáridos e proteínas. Fórmanse no complexo de Golgi e libéranse na superficie da célula mediante a fusión da vesícula que as contén coa membrana plasmática (Klaveness e Paasche, 1979; Hibberd, 1980; Romanovicz, 1981). Os cocolitos sintetízanse tamén no Golgi ou nun sistema vacuolar independente.

Posúen dous flaxelos isocontos lisos, coa excepción da orde Pavlovaes na que os flaxelos son diferentes. Na maioría das especies asociado aos flaxelos

atópase un orgánulo filiforme exclusivo das primenesiófitas, o haptonema, do que a clase recibiu o seu nome inicial. A lonxitude do haptonema varía segundo as especies e o seu interior consta de seis ou sete microtúbulos dispostos en círculo e rodeados dunha membrana de retículo endoplásmico. O haptonema parece ter a función de fixar a célula a un substrato (Parke *et al.*, 1971).



**Figura 1.** *Isochrysis* aff. *galbana* Clon T-ISO (CCMP 1324).

Presentan un ou dous cloroplastos periféricos con lamelas formadas por tres tilacoides e sen lamela periférica. O pirenoide está no interior do plasto ou formando un abultamento na súa superficie. Os cloroplastos están rodeados por unha membrana do retículo endoplásmico que tamén inclúe ao núcleo. Os pigmentos das primnesiófitas inclúen clorofilas *a*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub> e *c*<sub>3</sub>, e  $\beta$ , $\beta$ -caroteno, fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina. Definíronse catro tipos de composicións pigmentarias en función da presenza dos derivados da clorofila *c* e da fucoxantina (Jeffrey e Wright, 1994). A mancha ocular aparece soamente nalgúns membros das Pavlovaes. As primnesiófitas acumulan crisolaminarina e glóbulos lipídicos como substancias de reserva.

O xénero *Isochrysis* comprende especies cunhas dimensións de 3  $\mu\text{m}$   $\times$  5  $\mu\text{m}$  (Brown *et al.*, 1997) que presentan escamas unicamente no haptonema. Este

está moi reducido e mide unicamente 1 ou 2  $\mu\text{m}$ . Son microalgas moi utilizadas en acuicultura pola súa riqueza en lípidos e particularmente en ácidos graxos poliinsaturados; *I. galbana* Parke foi a primeira microalga empregada como alimento vivo nos cultivos de moluscos (Bruce *et al.*, 1940). *Isochrysis* aff. *galbana* Clon T-ISO foi illada en Tahití e presenta diferencias con outras cepas de *Isochrysis*. O rango de temperaturas que tolera é moi amplo, de 15 a 36  $^{\circ}\text{C}$ , presentando un bo crecemento a 33  $^{\circ}\text{C}$  (Nelson *et al.*, 1992). No tocante á súa composición bioquímica, destacan os seus elevados contidos de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 $\omega$ -3) e 18:4 $\omega$ -3 e a ausencia case total de ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega$ -3), mentres que *Isochrysis galbana* Parke presenta cantidades moderadas de EPA e DHA. A cepa utilizada de *Isochrysis* aff. *galbana* Clon T-ISO (CCMP1324) procede do Provasoli-Guillard Center for the Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) Bigelow, Maine, USA (Figura 1).

### ***Nannochloropsis gaditana* Lubián**

*Nannochloropsis gaditana* pertence á División Eustigmatophyta, Clase Eustigmatophyceae, Orde Eustigmatales, Familia Monodopsidaceae, Xénero *Nannochloropsis* (Hibberd, 1981). A División Eustigmatophyta separouse da División Xantophyta debido ás características da estrutura celular (Hibberd e Leedale, 1970; 1971; 1972) e á súa composición de pigmentos (Guillard e Lorenzen, 1972; Whittle, 1976; Whittle e Casselton, 1969; 1975; Schnepf *et al.*, 1996). Actualmente coñécense oito xéneros de Eustigmatophyta (Preisig e Wilhem, 1989; Hibberd, 1990; Karlson *et al.*, 1996; Santos, 1996; Schnepf *et al.*, 1996). A última especie en descubrirse foi *Nannochloropsis oceanica* (Suda *et al.*, 2002).

As eustigmatófitas son algas esféricas ou de forma oval e miden entre 2 e 18  $\mu\text{m}$ . Sempre se presentan illadas, sen formar grupos. Presentan unha cor verde-amarela que pode facer que se confundan con membros da división Chlorophyta (Santos, 1996). Habitan tanto augas dóces como salgadas e salobres e mesmo poden localizarse no solo. Reprodúcense mediante fisión binaria, dando lugar a dúas ou catro autosporas que se liberan ao romper a parede da célula nai. A división ten lugar durante a fase de escuridade (Flynn *et al.*, 1993). A maioría

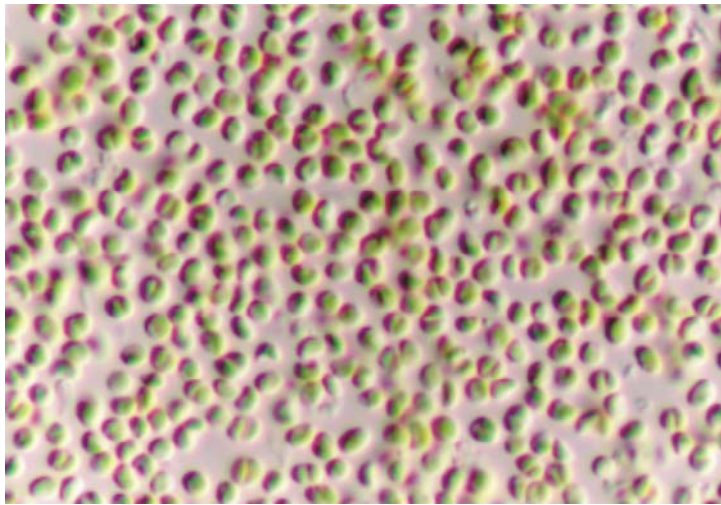
das especies producen tamén zoosporas (Hibberd, 1990). Os requerimentos nutricionais das eustigmatófitas non están claros. Algúns autores sosteñen que non precisan suplementos de vitaminas (Turner e Gowen, 1984), mentres que outros afirman que o uso de vitaminas favorece o crecemento e alonga a vida dos cultivos (Hibberd, 1990). A capacidade de crecemento mixotrófico tamén é obxecto de controversia (Turner e Gowen, 1984; Maseda, 2002; Hu e Gao, 2003; Rocha *et al.*, 2003).

Presentan un único cloroplasto parietal que nas células vexetativas da maioría das especies contén un pirenoide de gran tamaño e forma poliédrica unido á parede interna por un pedúnculo estreito (Hibberd, 1990). As lamelas están formadas por grupos de tres tilacoides pero non hai lamela periférica. O cloroplasto está recuberto polo retículo endoplásmico. O núcleo da célula contacta co cloroplasto, pero non está recuberto pola membrana do retículo endoplásmico.

As zoosporas presentan unha serie de características exclusivas da división. Algunhas especies posúen dous flaxelos, pero na maioría soamente aparece un no extremo anterior da zoospora aínda que está presente un segundo corpúsculo basal. No extremo anterior da zoospora localízase tamén unha mancha ocular de gran tamaño, independente do cloroplasto. É de cor laranxa-vermella e está formada por unha serie de glóbulos. Esta mancha ocular, ou estigma, tan característica é a que lle dá nome á división. As zoosporas carecen de Golgi e pirenoide (Hibberd e Leedale, 1970; 1971; 1972).

A composición de pigmentos das eustigmatófitas é tamén única, presentan unicamente clorofila *a* e o carotenoide máis abundante é a violaxantina, que se atopa formando parte do complexo colector de luz (Brown, 1987; Owens *et al.*, 1987; Sukenik *et al.*, 1992). A presenza de  $\beta$ -caroteno, vaucheriaxantina e cantaxantina tamén é característica das eustigmatófitas. As diferencias no perfil de pigmentos dentro da división poden resultar útiles para a caracterización de especies (Establier e Lubián, 1982; Lubián e Establier, 1982), igual que os esteroides (Patterson *et al.*, 1994), aínda que ás veces é preciso examinar secuencias de DNA (Andersen *et al.*, 1998).

As especies do xénero *Nannochloropsis* son lixeiramente ovoides, cun diámetro de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , e carecen de fases móbiles e flaxeladas (Hibberd, 1981). A súa morfoloxía provocou que durante moito tempo fosen consideradas "chlorellas mariñas" (Maruyama *et al.*, 1986; Gladu *et al.*, 1995). A maioría das especies localízanse en hábitats mariños, pero recentemente descubriuse unha especie de *Nannochloropsis* en ecosistemas de auga dóce (Krienitz *et al.*, 2000). En acuicultura *Nannochloropsis* é apreciada por ser rica en proteínas e ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega$ -3) e pola facilidade do seu cultivo (Volkman *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1983).



**Figura 2.** *Nannochloropsis gaditana* (CCMP 527).

*Nannochloropsis gaditana* (Figura 2) distínguese doutras representantes do xénero pola súa composición de pigmentos, xa que presenta  $\alpha$ -caroteno, ademais de  $\beta$ -caroteno (Lubián e Establier, 1982). A cepa utilizada de *Nannochloropsis gaditana* (CCMP527) procede do Provasoli-Guillard Center for the Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) Bigelow, Maine, USA.

### ***Brachionus plicatilis* O. F. Müller**

Pertence ao Phylum Rotifera, Clase Monogononta, Orde Ploima, Familia Brachionidae, Xénero *Brachionus*. O phylum Rotifera ou Rotatoria comprende cerca de 2.000 especies de pequenos organismos, cunha talla que oscila entre 100  $\mu\text{m}$  e 1 mm. A maioría son habitantes das augas dóces, pero tamén hai especies de augas mariñas litorais e algunhas viven en musgos, en ambientes semiacuáticos. Hai formas sésiles e mesmo coloniais, pero a maior parte dos rotíferos son de vida libre.

Os rotíferos son organismos pseudocelomados, cunha cavidade corporal que deriva do blastocele embrionario. Unha peculiaridade deste phylum, que tamén se dá nos nematodos, é a eutelia ou constancia no número de células que constitúen o corpo, arredor de mil. A mitose cesa ao final do desenvolvemento embrionario, de maneira que o crecemento se debe exclusivamente ao incremento do volume das células. Debido a este fenómeno a rexeneración nos animais eutélicos é practicamente inexistente. O corpo dun rotífero é máis ou menos cilíndrico ou con forma de saco e está dividido en cabeza, tronco e un pé terminal. Ás veces hai un colo ben definido entre a cabeza e o tronco. O nome deste grupo fai referencia á coroa de cilios presente na parte anterior da cabeza, que cando está en movemento semella unha roda. O pé nas formas sésiles remata nun disco adhesivo e nas nadadoras en dedos móbiles, de un a catro segundo as especies. Nestas últimas as glándulas pedias secretan un adhesivo que lle permite ao animal fixarse ao sustrato de forma transitoria. Todo o corpo, agás a coroa, está recuberto por unha cutícula intracelular incluída na epidermis, que é sincitial. A cutícula soe estar engrosada formando unha estrutura chamada loriga (Figura 3).

Os rotíferos aliméntanse de partículas en suspensión e microorganismos que son conducidos polo movemento dos cilios da coroa cara á boca, aínda que tamén hai especies depredadoras que capturan activamente ás súas presas. A boca está situada en posición ventral e rodeada por parte da coroa. Continúase cun tubo bucal ciliado que a conecta coa farinx ou mástax, dotado de musculatura que move os trofos, unhas pezas mandibulares que trituran o alimento. O esófago, tubular, conecta o mástax co estómago, que pode ter forma de saco ciliado ou ser un tubo de paredes grosas. O intestino é curto e remata na

parte posterior do corpo, formando unha cloaca na que conflúen tamén os protonefridios e o oviducto.

O sistema excretor consta de dous protonefridios sincitiais que desembocan na cloaca mediante un conducto común ou unha vexiga. Ao ser organismos acuáticos e de moi pequeno tamaño, os rotíferos carecen de sistemas respiratorio e circulatorio.

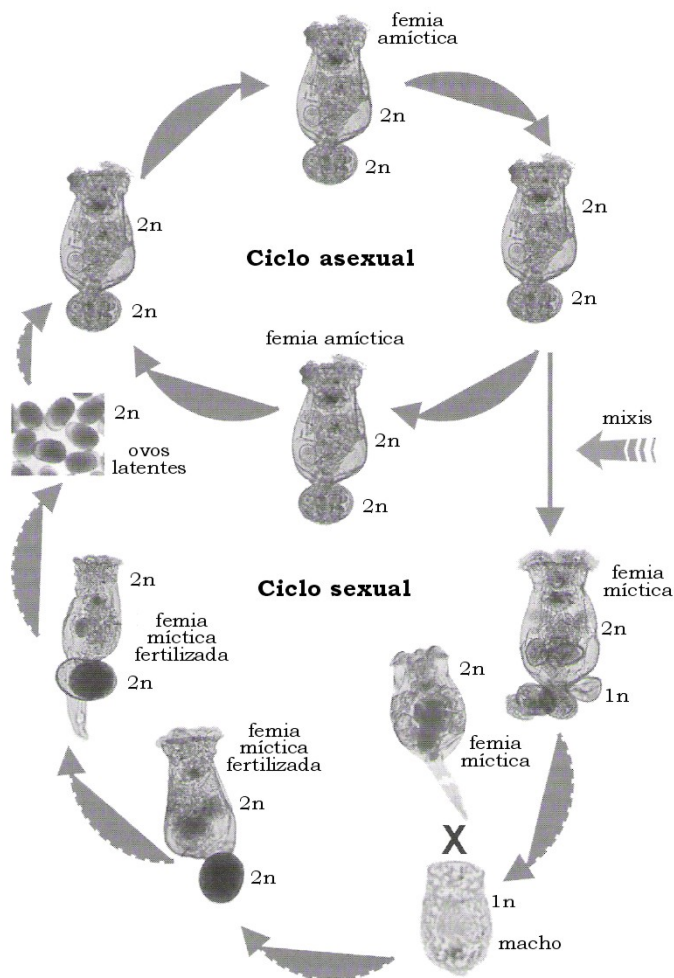


**Figura 3.** *Brachionus plicatilis* O. F. Müller

O sistema nervioso é simétrico. O cerebro é bilobado e sitúase enriba do mástax. De aquí saen dous cordóns nerviosos ventrolaterais e lonxitudinais. Hai pares de ganglios conectando cos troncos nerviosos ou co cerebro. Os nervios están diferenciados en sensoriais e motores. Na superficie do corpo hai sedas sensoriais. Poden aparecer tamén palpos e fasetas ciliadas, probablemente con función quimiorreceptora. Os órganos da visión son simples ocelos formados por unha única célula que contén unha masa de gránulos de pigmento sobre os que se sitúa un lente. Estes ollos poden ser cerebrais se a célula ocular está incluída

no cerebro. Os rotíferos poden responder positivamente ós estímulos luminosos ou amosarse indiferentes á luz.

As poboacións de rotíferos están constituídas case na súa totalidade por femias e na maioría das especies a reprodución é partenoxenética. Os machos son máis pequenos que as femias, miden como máximo unha cuarta parte do seu tamaño. Son raros e na clase Bdelloidea non existen en absoluto. A fecundación ten lugar por impregnación hipodérmica.



**Figura 4.** Ciclo biolóxico de *Brachionus plicatilis* (modificado de Lubzens, 2003).



As femias da clase Monogononta teñen un único ovario que se abre á cloaca por un oviducto e unha glándula vitelóxena. Nas da clase Bdelloidea ou Digononta hai dous xermovitelarios (o ovario e a glándula vitelóxena aparecen combinados) cun oviducto común. Na clase Seisonidea as femias presentan dous ovarios pero non glándulas vitelóxenas.

Os mecanismos reproductivos son diferentes en cada clase. Os bdelloideos reproducense exclusivamente por partenoxénese ao non haber machos. Polo contrario, na clase Seisonidea os machos sempre están presentes e os ovos teñen que ser fecundados, orixinando indistintamente machos e femias, e non hai partenoxénese. Os monogonontes teñen un ciclo máis complicado (Figura 4). Durante a maior parte do ano a poboación componse de femias diploides, chamadas amícticas porque producen ovos tamén diploides que se desenvolven partenoxeneticamente. En resposta a determinados factores que aínda non se coñecen ben, estes ovos amícticos orixinan femias mícticas, morfoloxicamente distintas ás anteriores. As femias mícticas producen por meiose ovos haploides, que en ausencia de fecundación dan lugar a machos. Estes machos fecundan ás femias mícticas, que entón producirán ovos diploides dotados dunha cuberta grosa, permanecendo como formas de resistencia que darán novamente femias, mícticas ou amícticas (Barnes, 1987, Meglitsch, 1972).

A salinidade, a densidade de poboación e a temperatura inflúen na produción de femias mícticas e por tanto na reprodución sexual en *Brachionus plicatilis* (Snell, 1986). Outros factores implicados en distintas especies de rotíferos son o xenotipo, a dieta ou o fotoperiodo. A porcentaxe de femias mícticas na poboación está relacionada coa taxa de reprodución asexual. Cando a salinidade sobrepasa o 3,5% non se observa mixis en *B. plicatilis*, pero en salinidades máis baixas incrementase tanto a taxa de reprodución asexual coma a porcentaxe de femias mícticas (Lubzens *et al.*, 1985). A temperatura exerce un efecto similar, reducíndose significativamente o número de femias mícticas a partir dos 28 °C (Snell, 1986). Nun medio cunha salinidade alta, a taxa de filtración do rotífero diminúe, reducíndose así a inxestión de comida; nestas condicións predomina a reprodución asexual. Un ambiente favorable sen limitacións de alimento permitiría a reprodución sexual. Isto parece acontecer no xénero *Asplanchna*, no

que a presenza de  $\alpha$ -tocoferol no medio indicando a dispoñibilidade de alimento induce a mixis (Gilbert, 1980).

Altas densidades poboacionais nun cultivo tamén fan incrementar a proporción de femias míticas. Probablemente o estímulo é algún metabolito liberado polos propios rotíferos, pois obtense o mesmo resultado cando un pequeno número de rotíferos se cultiva nun medio no que previamente se mantivo unha poboación moi densa (Carmona *et al.*, 1993). Esa substancia podería actuar como un sinal para a produción de ovos de resistencia ante un posible deterioro do hábitat debido á sobreexplotación. Así, algúns autores consideran que a mixis responde a un fenómeno de indución por un factor que indica que o ambiente é favorable, como sería a presenza de  $\alpha$ -tocoferol, ou ao contrario, por un factor que indica unha degradación das condicións ambientais, por exemplo unha alta concentración de metabolitos causada por unha densidade poboacional excesiva. Pola contra, outros autores (Snell, 1986) sosteñen que a reprodución sexual non responde a un factor inductor, senón que ten lugar de forma habitual nos ambientes favorables, e é reprimida cando as condicións se volven extremas, sendo entón substituída pola reprodución asexual.

*Brachionus plicatilis* é unha especie nadadora cun tamaño arredor dos 240  $\mu\text{m}$  de longo e 170  $\mu\text{m}$  de ancho en estado adulto (Serra *et al.*, 1998). Os rotíferos do xénero *Brachionus* poden alimentarse de diversos tipos de partículas (microalgas, bacterias, levaduras ou micropartículas artificiais) xa que soamente seleccionan o alimento en función do seu tamaño, e os individuos máis grandes prefiren partículas de maior tamaño (Rothhaupt, 1990). *Brachionus* é capaz de tolerar amplos rangos de variación nas condicións ambientais. Pode vivir en augas cunha salinidade entre o 0,1 e o 6%, podendo ser cultivado perfectamente en auga de mar sen diluír, aínda que para conseguir as máximas taxas de reprodución a salinidade debe estar entre o 0,4 e o 3,5% (Walker, 1981). É unha especie particularmente termofílica. Nos cultivos de anguía aparece a finais da primavera, cando a temperatura da auga é de 17-20  $^{\circ}\text{C}$  e desaparece en decembro, cando a temperatura diminúa ata os 10  $^{\circ}\text{C}$ , quedando os ovos latentes como formas de resistencia no fondo dos tanques (Fukusho, 1989). A temperatura óptima depende da cepa, alcanzándose as máximas taxas de reprodución entre os 25  $^{\circ}\text{C}$  e os 35  $^{\circ}\text{C}$  (Lubzens, 1987), aínda que algunhas

cepas poden reproducirse mesmo cando a temperatura baixa ata os 5 °C (Iwamoto e Fukusho, 1980). O rango de pH que poden tolerar vai de 5 a 10 (Ito, 1980). A concentración óptima de osíxeno no medio é 5-7 ppm (Abe *et al.*, 1982).

Os rotíferos utilizados proceden das instalacións de INSUIÑA S. L. en Mougás, Oia (Pontevedra).



## **Capítulo 1.**

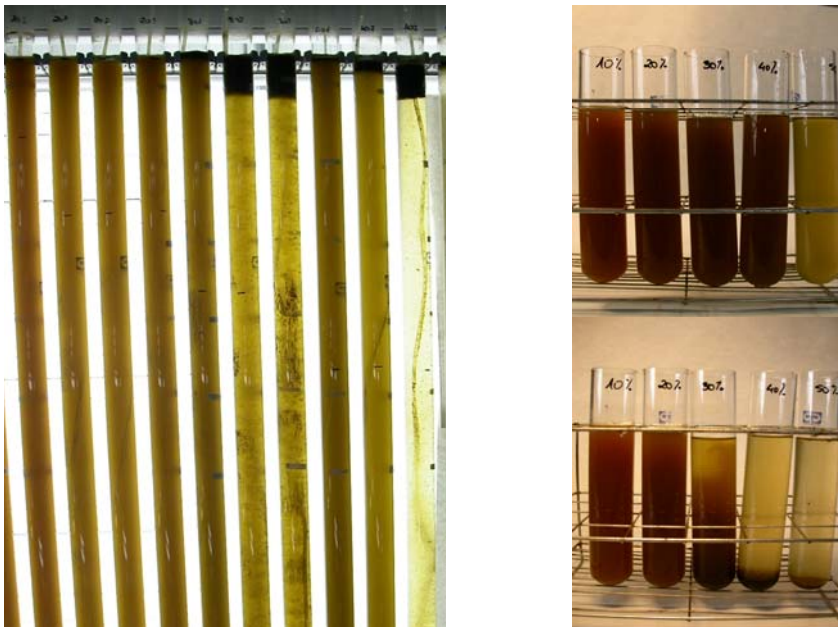
---

**Cultivo discontinuo de *Isochrysis* aff. *galbana*  
(Clon T-ISO). Efecto da suplementación con  
CO<sub>2</sub> e da intensidade luminosa**



## Introducción

As microalgas do xénero *Isochrysis*, entre elas *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO), acumulan glúcidos tanto en resposta á carencia de nutrientes (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989) como en condicións de elevada intensidade luminosa (Sukenik e Wahnnon, 1991), pero non se atopan na literatura referencias á produción de exopolisacáridos por parte destas especies. Porén, en ensaios de cultivo semicontinuo de T-ISO con intensidades luminosas elevadas realizados no noso laboratorio presentáronse problemas que poderían estar relacionados coa síntese deste tipo de compostos. Nos cultivos con altas taxas de renovación e polo tanto sometidos a unha radiación luminosa elevada, observouse a formación de agregados celulares que os facían inservibles para o seu uso en acuicultura, acompañada dun gran crecemento bacteriano que finalmente provocaba a morte das células (Figura 1). Nos cultivos con taxas de renovación baixas, que presentaban unha gran densidade celular, a viscosidade do medio de cultivo era tan alta que as células non se depositaban mesmo despois de permanecer 24 horas en repouso (Figura 2). Este fenómeno facía imposible a recollida de



**Figura 1.** Formación de floculos nun cultivo semicontinuo de T-ISO cultivado con taxa de renovación e intensidade luminosa elevadas. **Figura 2.** Mostras de cultivos semicontínuos de T-ISO recién recollidas (arriba) e despois de 24 h (abaixo). Unicamente se depositan as células dos cultivos con taxas de renovación altas (as taxas de renovación están indicadas polas inscricións nos tubos).

mostras, tanto por centrifugación como por filtración. A tinción das células con Alcian Blue revelou que as células presentaban unicamente pequenas cantidades de exopolisacárido na súa superficie xa que fixaban moi pouco colorante. O exopolisacárido, se efectivamente se estaba a producir, debía ser liberado ao medio.

Para tratar de solucionar este problema, é necesario establecer unhas condicións de cultivo que permitan obter unha alta produtividade de T-ISO reducindo ao mesmo tempo a produción de exopolisacárido. Neste primeiro experimento realizáronse cultivos batch nos que se modificaron dúas variables: a intensidade luminosa e o aporte de CO<sub>2</sub>.

### **Deseño experimental**

A microalga mariña *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO, CCMP 1324) cultivouse en réxime discontinuo en biorreactores tubulares con 80 ml de volume de cultivo. A concentración de nitróxeno, en forma de KNO<sub>3</sub>, foi 4 mM. A composición detallada do medio de cultivo está descrita no apartado Materiais e métodos. Os cultivos sometéronse a un fluxo de aire de 230 ml/minuto, e a un réxime de luz:escuridade 12h:12h. Probáronse dúas intensidades luminosas distintas, 25 e 93  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  e dous tipos de aireación, con e sen aporte suplementario de CO<sub>2</sub>, xenerándose así catro condicións de cultivo diferentes, que se denominaron como se indica na Táboa 1. Empregáronse tres réplicas para cada condición (12 cultivos en total). A densidade celular inicial foi de  $10 \times 10^6$  células/ml. Escolleuse unha densidade inicial relativamente alta para evitar a fotoinhibición durante os primeiros días de crecemento nos cultivos sometidos a unha intensidade luminosa elevada. Os cultivos deixáronse medrar e unha vez alcanzada a fase estacionaria –indicada por unha densidade celular constante durante un mínimo de tres días consecutivos- recolléronse mediante centrifugación mostras da biomasa microalgal para a determinación de proteínas, lípidos, glúcidos e ácidos graxos, e mostras do medio de cultivo –o sobrenadante resultante da centrifugación- para a determinación do exopolisacárido producido polas células de T-ISO.



**Táboa 1.** Denominación dos grupos de cultivo, segundo as condicións de iluminación e aporte suplementario ou non de CO<sub>2</sub>.

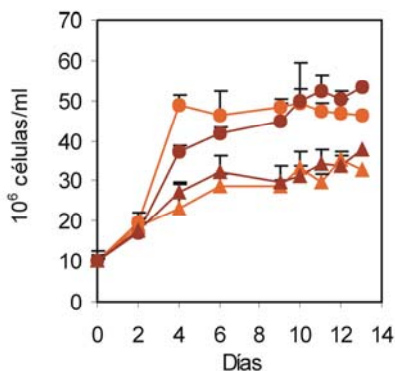
	con aporte de CO <sub>2</sub>	sen aporte de CO <sub>2</sub>
alta luz	<b>+C+L</b>	<b>-C+L</b>
baixa luz	<b>+C-L</b>	<b>-C-L</b>

## Resultados e discusión

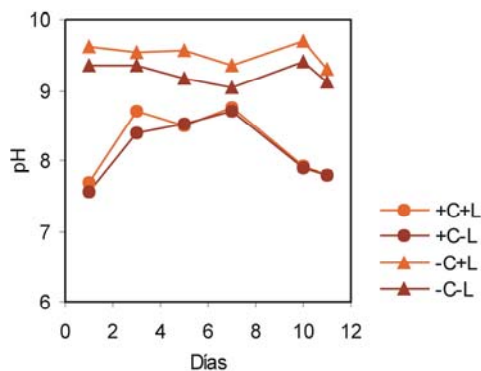
As densidades celulares na fase estacionaria foron notablemente maiores nos cultivos que recibiron un aporte suplementario de CO<sub>2</sub>, que alcanzaron densidades celulares arredor dos 50×10<sup>6</sup> células/ml, mentres que os cultivos que non recibiron CO<sub>2</sub> tiveron unha densidade celular aproximada de 35×10<sup>6</sup> células/ml. O test U de Mann-Whitney indica diferencias significativas nas densidades celulares dos cultivos con e sen aporte de CO<sub>2</sub> (p=0,004). Polo contrario, a intensidade luminosa non tivo influencia sobre a densidade celular. Os distintos cultivos non alcanzaron a fase estacionaria simultaneamente, xa que +C+L precisou só catro días para alcanzar a súa densidade máxima, mentres que os demais grupos entraron na fase estacionaria no 10º ou 11º día de cultivo (Táboa 2; Figura 3). En consecuencia, a taxa de crecemento (*r*) foi notablemente maior nos cultivos +C+L en comparación co resto dos grupos (Táboa 1). O carbono inorgánico pode ser un nutriente limitante e o seu efecto positivo sobre a taxa de crecemento e a densidade celular do xénero *Isochrysis* xa foi demostrado (Kaplan *et al.*, 1986; Clark *et al.*, 1999).

O pH foi maior nos cultivos que non recibiron CO<sub>2</sub>, entre 9 e 9,7, e nos que foron suplementados, a captación do CO<sub>2</sub> fixo que o pH se incrementara durante a fase de crecemento expoñencial, de 7,5 a 8,7, experimentando un descenso na fase estacionaria (Figura 4). A pH 9 o carbono inorgánico está principalmente en forma de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Aínda que *Isochrysis galbana* cultivada á concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> presenta anhidrasa carbónica externa, demostrouse que dispón dun mecanismo de transporte activo de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Bhatti *et al.*, 2002). Outros autores sosteñen que a captación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en T-ISO é bastante ineficiente, polo que recomendan suplementar os cultivos con CO<sub>2</sub> para asegurar densidades celulares altas (Camiro-Vargas *et al.*, 2005), tal e como demostran os

datos obtidos. Valores de pH por riba de 9 poden ademais reducir a dispoñibilidade de de  $\text{Fe}^{3+}$ , que precipita en forma de carbonatos (Kaplan *et al.*, 1986).

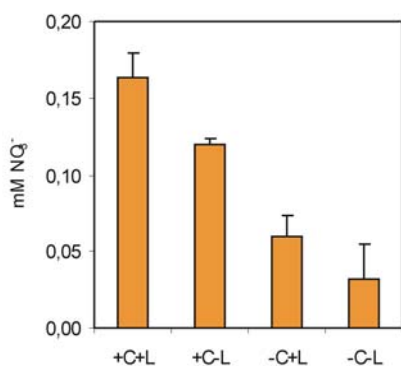


**Figura 3.** Curvas de crecemento de *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO) con distintas intensidades luminosas e con ou sen aporte de  $\text{CO}_2$ .



**Figura 4.** Evolución do pH nos cultivos de T-ISO ao longo do crecemento.

En experimentos para determinar o efecto do  $\text{CO}_2$  sobre o crecemento de cultivos discontinuos de *Pavlova lutheri* e *Phaeodactylum tricornutum*, varios autores (Yongmanitchai e Ward, 1991; Carvalho e Malcata, 2005) sinalan que unha concentración de  $\text{CO}_2$  do 1% proporciona as maiores produtividades de biomasa, que descenden cando se utilizan concentracións de  $\text{CO}_2$  maiores. Yongmanitchai e Ward (1991) suxiren que o incremento da densidade celular reduce a dispoñibilidade de luz no cultivo e en consecuencia a captación de  $\text{CO}_2$ , polo que aumentar a súa concentración non ten efecto sobre o crecemento das microalgas. Nos nosos cultivos non houbo diferencias significativas nas densidades celulares dos cultivos suplementados con  $\text{CO}_2$ , polo que non se pode pensar na luz como factor limitante do crecemento. O nitróxeno presente no medio de cultivo (concentración inicial, 4 mM en forma de  $\text{KNO}_3$ ) foi consumido practicamente na súa totalidade, pero houbo pequenas diferencias entre os distintos grupos (Figura 5).

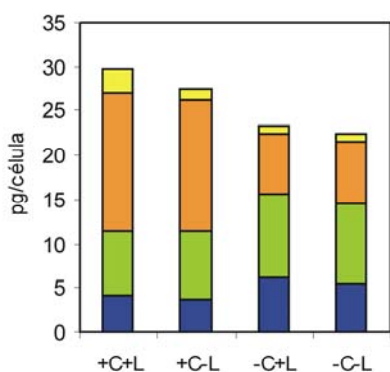


**Figura 5.** Concentración residual de nitrato no medio de cultivo unha vez alcanzada a fase estacionaria.

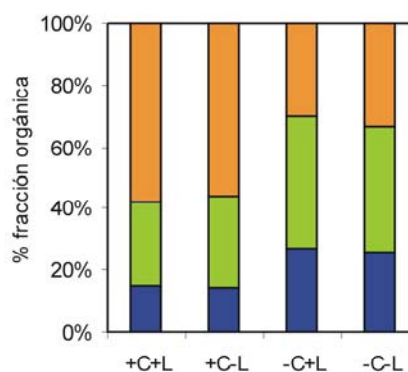
En contido celular, as células cultivadas sen CO<sub>2</sub> presentaron maior contido de proteína, 5,54 e 6,06 pg/célula, que as suplementadas, que contiñan 4,12 e 3,79 pg/célula (Figura 6; Táboa 2), de maneira que a maior densidade celular compensou o menor contido de proteína por célula e a cantidade de proteína por ml foi moi similar en tódolos grupos (Táboa 2). A luz tivo tamén un efecto positivo, e os cultivos sometidos a 93 μmoles quanta/m<sup>2</sup>/s acumularon máis proteína que os sometidos a 25 μmoles quanta/m<sup>2</sup>/s. A porcentaxe de proteína na fracción orgánica celular -é dicir, a suma de proteínas, glúcidos e lípidos- situouse no rango de valores típico de cultivos de microalgas do xénero *Isochrysis* en fase estacionaria (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 1997): arredor dun 15% nos cultivos enriquecidos con CO<sub>2</sub> e superando lixeiramente o 25% nos cultivos non suplementados (Figura 7; Táboa 2). Canto máis se prolonga a fase estacionaria, maior cantidade de substancias de reserva se acumulan na célula e polo tanto a porcentaxe de proteína descende.

Este comportamento contrasta cos resultados obtidos por outros autores, que en traballos con diatomeas citan incrementos da proteína celular cando os cultivos se suplementan con CO<sub>2</sub>, tanto en réxime discontinuo (de Castro e Tavano García, 2005) como semicontinuo (Chrimadha e Borowitzka, 1994). Estas maiores cantidades de proteína van acompañadas nos dous casos de incrementos na taxa de crecemento e na densidade celular, o que indica que os cultivos non suplementados sufrían un déficit de carbono inorgánico que se correxiu subministrando CO<sub>2</sub>. En cultivos non aireados de *Isochrysis galbana* a falta de CO<sub>2</sub> é a responsable do baixo índice de aproveitamento do nitrato do medio e a súa

transformación en proteína, que se incrementa cando se introduce CO<sub>2</sub> nos cultivos (Fábregas *et al.*, 1985). Nos nosos cultivos con CO<sub>2</sub>, a maior taxa de crecemento e a elevada densidade celular final esgotaron rapidamente o nitrato do medio e deron lugar a un menor contido de proteína celular, xa que o nitróxeno distribuíuse entre un maior número de células. Ademais, unha maior taxa de crecemento vai acompañada dun aproveitamento lixeiramente menor do nitrato (Figura 5).



**Figura 6.** Composición bioquímica de *I. aff. galbana* T-ISO. ■, proteínas; ■, lípidos; ■, glicidos; ■, exopolisacárido.



**Figura 7.** Composición da fracción orgánica celular de *I. aff. galbana* T-ISO. ■, proteínas; ■, lípidos; ■, glicidos.

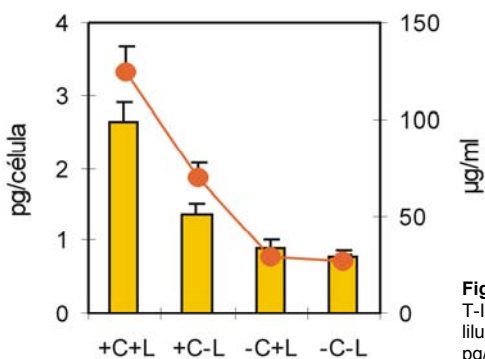
Nos cultivos sen CO<sub>2</sub> a limitada dispoñibilidade de carbono inorgánico ralentizou o crecemento da poboación microalgal e a menor densidade permitiu unha maior acumulación de proteína por célula. É posible que esta maior cantidade de proteína fose acompañada ademais dun incremento porcentual da Rubisco, que representa ata un 23% da proteína de *I. galbana* adaptada a concentracións baixas de CO<sub>2</sub> (Falkowski *et al.*, 1989; Herzig e Falkowski, 1989, citadas en Clark *et al.*, 1999), e quizais tamén á expresión de anhidrasa carbónica tanto externa como interna, que aumentan a súa actividade en resposta a baixas concentracións de CO<sub>2</sub> (Bhatti *et al.*, 2002).

As diferencias nas condicións de cultivo tiveron outros efectos na composición bioquímica de T-ISO. O esgotamento dos nutrientes que se produce ao alcanzar a fase estacionaria provoca que as microalgas acumulen produtos de

reserva, tanto glúcidos como lípidos, pero en proporcións variables dependendo da especie (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1996). As microalgas do xénero *Isochrysis* acumulan os dous tipos de produtos de reserva, pero a predominancia de lípidos ou glúcidos parece depender das condicións de cultivo máis que da especie. En condicións de iluminación continua *I. galbana* acumula preferentemente glúcidos (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989), pero cun réxime de iluminación circadiano tanto T-ISO como *I. galbana* almacenan maior cantidade de lípidos (Brown *et al.*, 1993; Fidalgo *et al.*, 1998).

As células que recibiron un suplemento de CO<sub>2</sub> acumularon dobre cantidade de glúcidos, arredor de 15 pg/célula, que as que recibiron aireación sen suplemento de CO<sub>2</sub>, que acumularon uns 7 pg de glúcidos/célula, e tamén liberaron ao medio maiores cantidade de exopolisacárido (Figura 4; Figura 8; Táboa 1). En consecuencia, a porcentaxe de glúcidos na fracción orgánica celular foi superior ao 50% nos cultivos suplementados con CO<sub>2</sub>, mentres que nos cultivos sen CO<sub>2</sub> mantívose en torno ao 30% (Figura 7; Táboa 2). O efecto do CO<sub>2</sub> sobre a acumulación de polisacáridos intracelulares pode non existir na fase expoñencial e aparecer unicamente na fase estacionaria (Ishida *et al.*, 2000), cando as células deixan de dividirse activamente e consumen menos enerxía.

A intensidade da luz tivo un efecto moi pequeno na produción de glúcidos celulares, pero estimulou a produción de exopolisacáridos, especialmente nos cultivos que recibiron CO<sub>2</sub>. Os cultivos suplementados e expostos a unha intensidade luminosa de 93  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  sintetizaron o dobre de exopolisacárido que os sometidos a menor intensidade luminosa, 2,63 pg/célula fronte a 1,36 pg/célula (Figura 8). Estas cantidades equivaleron respectivamente ao 15% e ao 8,5% do total dos glúcidos sintetizados polas células. Nos cultivos non suplementados con CO<sub>2</sub>, a produción de exopolisacárido foi de 0,90 pg/célula nos cultivos sometidos a 93  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  e 0,78 pg/célula nos sometidos a 25  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , que equivalen ao 11,8% e 9,8% dos glúcidos totais respectivamente (Táboa 2). O escaso efecto da luz no contido intracelular de glúcidos contrasta cos resultados doutros traballos nos que o incremento da intensidade lumínica estimulou a síntese e acumulación de glúcidos tanto na fase expoñencial como na estacionaria (Renaud *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993a).



**Figura 8.** Producción de exopolisacárido en T-ISO con diferentes condiciones de iluminación e dispoñibilidade de CO<sub>2</sub>. ■, pg/célula; ●-, µg/ml.

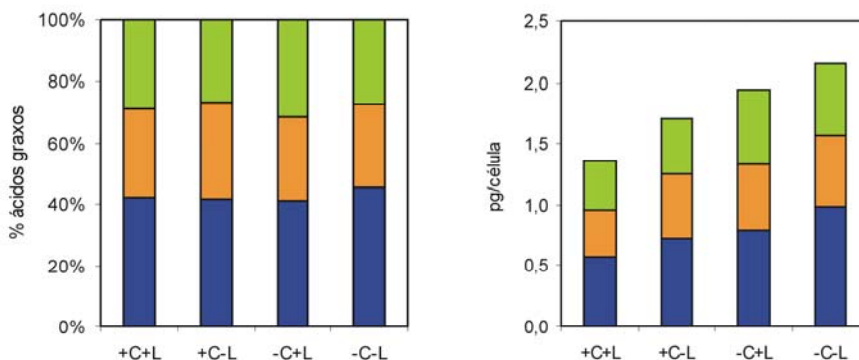
Aínda que non existen estudos sobre T-ISO, a produción de exopolisacáridos noutros microorganismos fotoautótrofos está relacionada con diversos factores. Nalgunhas diatomeas observouse que a acumulación de glúcidos intracelulares de reserva está asociada á carencia de nitróxeno, pero a liberación de grandes cantidades de polisacáridos ten lugar cando se esgota o fósforo inorgánico do medio (Myklestad e Haug, 1972; Guerrini *et al.*, 2000). O déficit de fósforo inibe a actividade das enzimas glicolíticas e tamén a da UDP-glicosil pirofosforilasa, clave na síntese do polisacárido de reserva crisolaminarina, polo que os produtos excedentes da fotosíntese son extruídos ao medio (Guerrini *et al.*, 2000). Nas cianobacterias a produción de exopolisacáridos podería ter a función de reequilibrar os metabolismos do carbono e o nitróxeno (Otero e Vincenzini, 2004). Segundo este modelo, a produción de exopolisacárido ten lugar en condicións nas que a dispoñibilidade de CO<sub>2</sub> é alta en relación á dispoñibilidade de nitróxeno, por exemplo, se se suplementa con CO<sub>2</sub> un cultivo diazotrófico ou polo contrario, se nun cultivo con nitrato o pH se incrementa ata o punto de dificultar a fixación do nitróxeno. A intensidade luminosa tamén resulta un factor determinante na síntese de exopolisacárido nas cianobacterias, que é maior cando se incrementa a iluminación (Otero e Vincenzini, 2003).

Alguns autores (Azam e Smith, 1991, citado en Guerrini *et al.*, 2000) suxiren que nas diatomeas a produción de polisacáridos favorece relacións mutualistas con bacterias que ao alimentarse desta materia orgánica liberan substancias inorgánicas útiles para as microalgas sometidas a un estrés nutritivo.

Polo contrario, outros sosteñen que as bacterias que se alimentan destes polisacáridos tamén compiten coas microalgas polo fósforo, acentuando o estrés nutritivo e estimulando aínda máis a produción de polisacárido (Guerrini *et al.*, 1998). Aínda que a asociación microalga-bacteria sexa de tipo mutualista e represente un beneficio no medio natural, en cultivo a excesiva liberación de substancias orgánicas ao medio soe dar lugar a unha elevada proliferación de bacterias, que poden provocar descensos de pH ou liberar compostos perxudiciais para as microalgas, ademais de contaminar os cultivos de rotíferos, moluscos ou larvas que reciban esas microalgas. Polo tanto é desexable minimizar os factores que favorecen a produción de polisacárido en T-ISO.

Os cultivos -C+L e -C-L sintetizaron respectivamente 9,67 e 8,91 pg de lípidos (Figura 6; Táboa 2) e 1,96 e 2,18 pg de ácidos graxos (Figura 9; Táboa 3) por célula. Cantidades de lípido algo máis baixas, da orde de 8 pg/célula, e similares de ácidos graxos obtéñense ao final da fase logarítmica en cultivos de T-ISO non aireados e sometidos a unha intensidade luminosa de 100  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ ; sen embargo o contido lipídico diminúe se se reduce a iluminación (Brown *et al.*, 1993). Os cultivos +C+L e +C-L acumularon 7,29 e 7,77 pg de lípidos (Figura 6; Táboa 2) e 1,38 e 1,73 pg de ácidos graxos por célula (Figura 9; Táboa 3). En fracción orgánica, os lípidos representaron case o 30% nos grupos suplementados con CO<sub>2</sub> e algo máis do 40% nos grupos non suplementados, sendo os principais compoñentes da fracción orgánica nestes cultivos (Figura 5; Táboa 2). Nos grupos suplementados con CO<sub>2</sub> a intensidade luminosa non tivo un efecto destacado sobre o contido lipídico, pero nos cultivos non suplementados o contido celular de lípidos foi maior coa intensidade luminosa máis alta.

A porcentaxe do peso lipídico que corresponde aos ácidos graxos foi baixa, variando entre o 19% e o 24%. T-ISO presenta unha gran variedade de clases de lípidos (Volkman *et al.*, 1989). Este feito pode suxerir que unha gran parte dos lípidos de T-ISO son lípidos "non acílicos" (non formados por ácidos graxos) como esteroides, hidrocarburos, alquenonas ou pigmentos, e é posible que sexan estes lípidos non acílicos os que experimentan en maior medida o efecto dos cambios nas condicións de cultivo, disminuindo na fase estacionaria.



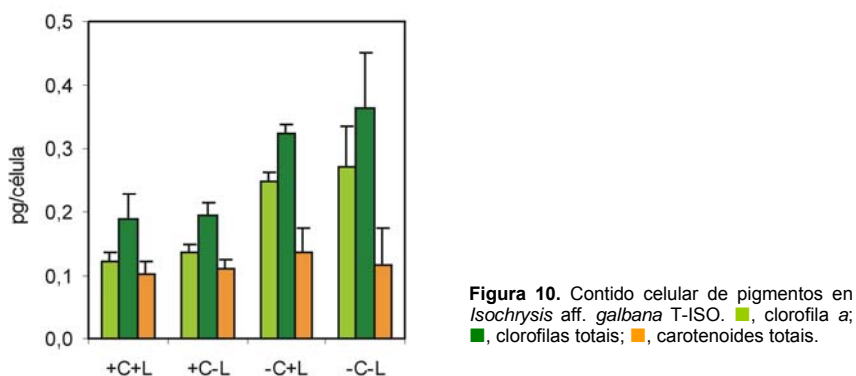
**Figura 9.** Contido de ácidos graxos saturados (■), monoinsaturados (■) e poliinsaturados (■) de *Isochrysis* aff. *galbana*. Esquerda, expresado en porcentaxes sobre o total de ácidos graxos. Dereita, expresado en pg/célula.

Os lípidos non formados por ácidos graxos que máis contribúen ao contido lipídico en T-ISO son as alquenonas, metil e etilcetonas de cadea formada por entre 36 e 39 carbonos e frecuentemente con dobres enlaces (Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1993). O contido de alquenonas incrementábase en resposta a un aumento da intensidade luminosa ou á limitación por nitóxeno, e na fase estacionaria poden supoñer ata un 26% dos lípidos totais de T-ISO (Brown *et al.*, 1993; Dunstan *et al.*, 1993). No tocante aos pigmentos, os maiores contidos de clorofila rexistráronse nos cultivos non suplementados con CO<sub>2</sub>, pero a súa contribución ao contido total de lípidos é reducida (Figura 10). Entre as demais clases de lípidos "non acílicos", os esteroides están presentes unicamente en pequenas cantidades no xénero *Isochrysis*, entre un 0,2 e un 1,2 % dos lípidos, dependendo das condicións de cultivo e da fase de cultivo na que se recollen as mostras (Dunstan *et al.*, 1993; Volkman *et al.*, 1989). Non tódolos autores que fixeron estudos sobre a composición lipídica de *Isochrysis* citan a presenza de hidrocarburos, pero cando aparecen tamén o fan en porcentaxes moi pequenas, representando entre o 0,10% e o 0,57% do peso orgánico (Ben-Amotz *et al.*, 1985) ou o 0,4% dos lípidos en *Isochrysis* sp. (Volkman *et al.*, 1989).

O perfil de ácidos graxos non variou moito coas distintas condicións de cultivo. A porcentaxe de ácidos graxos saturados+monoinsaturados estivo comprendida entre o 67,80% e o 72,57% do total, situándose a porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados entre o 26,25% e o 31,02% (Figura 9; Táboa 3).



Esta porcentaxe tan alta de ácidos graxos saturados e monoinsaturados é típica dos cultivos microalgais en fase estacionaria, nas que a maioría dos lípidos son triacilglicéridos ou outros lípidos de reserva. O maior contido por célula dos tres tipos de ácidos graxos correspondeu aos cultivos -C-L. Os ácidos graxos máis abundantes foron o 14:0, o 16:0, o 18:1 $\omega$ -9, o 18:4 $\omega$ -3 e o 22:6 $\omega$ -3 (DHA). O 14:0 e o 18:4 $\omega$ -3 foron máis abundantes nos cultivos privados de CO<sub>2</sub> tanto en porcentaxe como en contido neto, e o 16:0 e o 18:1 $\omega$ -9 alcanzaron porcentaxes maiores nos cultivos suplementados con CO<sub>2</sub> pero os contidos por célula máis elevados obtivéronse nos cultivos sen CO<sub>2</sub> (Táboa 3).



**Figura 10.** Contido celular de pigmentos en *Isochrysis aff. galbana* T-ISO. ■, clorofila a; ■, clorofilas totais; ■, carotenoides totais.

En T-ISO, o 14:0 aparece sobre todo en glicolípidos e fosfolípidos, e o 18:4 $\omega$ -3 é característico dos glicolípidos, mentres que os ácidos graxos 16:0 e 18:1 $\omega$ -9 localízanse principalmente nos triglicéridos (Sukenik e Wahnon, 1991). A abundancia de 14:0 e 18:4 $\omega$ -3 podería estar polo tanto relacionada cunha maior superficie de membrana fotosintética; as células procedentes dos cultivos -C+L e -C-L son máis novas, e os seus maiores contidos de clorofila e carotenoides (Figura 10; Táboa 2) reforzan esta posibilidade. A maior cantidade de lípidos nas células cultivadas sen CO<sub>2</sub> implica tamén unha maior cantidade de triglicéridos, representados polos ácidos graxos 16:0 e 18:1 $\omega$ -9. En canto ao DHA, as maiores porcentaxes obtivéronse nos cultivos sometidos a intensidade luminosa máis alta. O DHA é un ácido graxo característico dos fosfolípidos, pero en T-ISO unha fracción relativamente importante do mesmo atópase formando parte dos triacilglicéridos (Sukenik e Wahnon, 1991), que probablemente se acumularon en

resposta á elevada intensidade luminosa. Tzovenis *et al.* (1997) sinalan un efecto positivo da luz na acumulación de DHA en T-ISO tanto en porcentaxe como en contido celular en cultivos non suplementados con CO<sub>2</sub>. O aporte de CO<sub>2</sub> deu lugar á porcentaxe máxima de DHA, pero o contido por célula foi maior nos cultivos -C+L debido ao seu maior contido total de ácidos graxos (Táboa 3). Nos dous casos os maiores valores obtéñense na fase expoñencial, pero a elevada densidade celular ao final da fase expoñencial resulta nunha maior produtividade final de DHA. Un incremento da porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados ao comezo da fase estacionaria tamén se observa en *Isochrysis galbana* (Fidalgo *et al.*, 1998).

A modo de resume, pode concluírse que foi a dispoñibilidade de carbono o principal factor determinante do crecemento e da composición bioquímica de T-ISO. Nos cultivos suplementados con CO<sub>2</sub>, a maior parte do carbono destinouse á síntese de glúcidos mentres que os cultivos limitados por carbono acumularon preferentemente lípidos. Nos cultivos non suplementados con CO<sub>2</sub> a menor densidade celular permitiu ás células captar máis nitróxeno e sintetizar maiores cantidades de proteína. A maior duración da fase expoñencial implica que os cultivos medren lentamente e polo tanto que a idade das células sexa menor, polo que acumulan máis ácidos graxos típicos de lípidos de membrana. Curiosamente, a variación da intensidade luminosa non tivo efectos sobre a densidade celular final e afectou soamente de forma limitada á composición bioquímica de T-ISO. A intensidade luminosa máis elevada favoreceu unha maior síntese de proteínas e de DHA respecto dos cultivos sometidos a unha intensidade luminosa débil, pero o seu principal efecto foi estimular a produción de exopolisacárido nos cultivos con CO<sub>2</sub>.

A diferente evolución dos cultivos discontinuos de T-ISO pode ser indicativa de como os factores estudados afectarían á microalga nun cultivo semicontínuo. Para o cultivo de T-ISO débese evitar o aporte excesivo de CO<sub>2</sub> – cuidando de non limitar o crecemento– e de luz, dado que os excedentes de carbono fixado na fotosíntese derívanse á formación de glúcidos intracelulares, que reducen o valor nutritivo da microalga, e polisacáridos, que poden provocar a perda do cultivo debido á agregación celular e á proliferación de bacterias.

**Táboa 2.** Composición de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en sistema discontinuo con e sen subministro de CO<sub>2</sub> e dúas intensidades luminosas diferentes. +C+L, con CO<sub>2</sub> e alta luz; +C-L, con CO<sub>2</sub> e baixa luz; -C+L, sen CO<sub>2</sub> e alta luz; -C-L, sen CO<sub>2</sub> e baixa luz.

	+C+L	+C-L	-C+L	-C-L
<b>Densidade celular (10<sup>6</sup> cél/ml±std)</b>	47,38±2,76	51,38±5,30	32,58±2,55	34,19±4,23
<b>Taxa de crecemento (r)</b>	0,38	0,15	0,11	0,11
<b>Produtividade (10<sup>9</sup> células/l/día)</b>	3,64	3,95	2,51	2,63
<b>Proteína (pg/cél±std)</b>	4,12±0,77	3,79±0,19	6,06±0,27	5,54±0,32
<b>Lípidos (pg/cél±std)</b>	7,29±0,23	7,77±1,08	9,67±0,38	8,91±0,66
<b>Glúcidos en biomasa (pg/cél±std)</b>	15,72±1,14	14,54±1,49	6,75±0,58	7,15±0,88
<b>Exopolisacárido (pg/cél±std)</b>	2,63±0,28	1,36±0,16	0,90±0,11	0,78±0,09
<b>Total prot+líp+glúc (pg/cél±std)</b>	28,83±1,38	27,46±1,75	23,38±1,21	22,24±1,64
<b>Valor calórico (10<sup>-7</sup> J/cél)</b>	6,81	6,67	6,58	6,20
<b>Proteína/ml (µg/ml±std)</b>	185,12 ±7,71	194,70 ±9,72	197,51 ±8,72	189,28 ±11,06
<b>Lípidos/ml (µg/ml±std)</b>	345,53 ±11,11	399,00 ±55,35	315,11 ±12,48	304,50 ±22,60
<b>Glúcidos/ml (µg/ml±std)</b>	762,35 ±21,52	747,08 ±76,73	219,86 ±18,98	244,60 ±30,07
<b>Exopolisacárido/ml (mg/ml±std)</b>	124,36 ±13,30	69,89 ±7,99	29,21 ±3,61	26,65 ±2,93
<b>% proteína na F. O.</b>	14,30	13,80	25,93	24,89
<b>% lípidos na F. O.</b>	25,30	28,28	41,37	40,05
<b>% glúcidos na F. O.</b>	54,53	52,96	28,87	32,17
<b>% EPS (no total dos glúcidos)</b>	15,11	8,55	11,77	9,83
<b>Clorofila a (pg/cél±std)</b>	0,12 ±0,02	0,14 ±0,01	0,25 ±0,02	0,27 ±0,06
<b>Clorofilas totais (pg/cél±std)</b>	0,19 ±0,04	0,19 ±0,02	0,32 ±0,01	0,36 ±0,09
<b>Carotenoides totais (pg/cél±std)</b>	0,10 ±0,02	0,11 ±0,01	0,14 ±0,04	0,12 ±0,06

**Táboa 3.** Composición de ácidos graxos de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo discontinuo con e sen subministro de CO<sub>2</sub> e dúas intensidades luminosas diferentes. +C+L, con CO<sub>2</sub> e alta luz; +C-L, con CO<sub>2</sub> e baixa luz; -C+L, sen CO<sub>2</sub> e alta luz; -C-L, sen CO<sub>2</sub> e baixa luz.

Ácidos graxos	+C+L		+C-L		-C+L		-C-L	
	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél
14:0	<b>20,07</b> ±3,48	<b>0,275</b> ±0,033	<b>20,05</b> ±1,94	<b>0,347</b> ±0,052	<b>20,91</b> ±0,15	<b>0,409</b> ±0,071	<b>25,47</b> ±3,23	<b>0,561</b> ±0,125
16:0	<b>20,14</b> ±2,01	<b>0,277</b> ±0,013	<b>19,52</b> ±3,90	<b>0,340</b> ±0,090	<b>17,22</b> ±1,22	<b>0,338</b> ±0,054	<b>18,43</b> ±0,95	<b>0,402</b> ±0,038
16:1 (ω-9)	<b>0,95</b> ±0,15	<b>0,013</b> ±0,003	<b>0,86</b> ±0,24	<b>0,015</b> ±0,004	<b>0,98</b> ±0,00	<b>0,019</b> ±0,003	<b>1,03</b> ±0,90	<b>0,021</b> ±0,019
16:1 (ω-7)	<b>4,36</b> ±0,36	<b>0,060</b> ±0,002	<b>3,23</b> ±0,18	<b>0,056</b> ±0,007	<b>4,48</b> ±0,50	<b>0,088</b> ±0,015	<b>4,78</b> ±0,71	<b>0,105</b> ±0,024
16:2 (ω-6)	<b>0,21</b> ±0,02	<b>0,003</b> ±0,000	<b>0,21</b> ±0,05	<b>0,004</b> ±0,001	<b>0,25</b> ±0,03	<b>0,005</b> ±0,001	<b>0,29</b> ±0,04	<b>0,006</b> ±0,000
16:2 (ω-4)	<b>0,69</b> ±0,00	<b>0,010</b> ±0,001	<b>0,52</b> ±0,04	<b>0,009</b> ±0,001	<b>0,54</b> ±0,10	<b>0,011</b> ±0,003	<b>0,61</b> ±0,04	<b>0,013</b> ±0,001
18:0	<b>0,83</b> ±0,05	<b>0,012</b> ±0,001	<b>1,43</b> ±1,38	<b>0,026</b> ±0,026	<b>1,91</b> ±2,40	<b>0,039</b> ±0,039	<b>0,76</b> ±0,33	<b>0,016</b> ±0,006
18:1 (ω-9)	<b>21,20</b> ±2,61	<b>0,294</b> ±0,052	<b>24,75</b> ±3,27	<b>0,424</b> ±0,026	<b>18,94</b> ±1,15	<b>0,370</b> ±0,045	<b>18,75</b> ±1,75	<b>0,407</b> ±0,013
18:1 (ω-7)	<b>1,01</b> ±0,21	<b>0,014</b> ±0,004	<b>1,02</b> ±0,05	<b>0,018</b> ±0,001	<b>1,20</b> ±0,06	<b>0,024</b> ±0,006	<b>1,00</b> ±0,18	<b>0,022</b> ±0,002
18:2 (ω-6)	<b>1,87</b> ±0,38	<b>0,026</b> ±0,007	<b>2,94</b> ±0,20	<b>0,051</b> ±0,002	<b>1,75</b> ±0,03	<b>0,034</b> ±0,010	<b>1,99</b> ±0,12	<b>0,043</b> ±0,004
18:3 (ω-6)	<b>0,04</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,44</b> ±0,60	<b>0,008</b> ±0,011	<b>0,09</b> ±0,01	<b>0,002</b> ±0,001	<b>0,05</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000
18:3 (ω-3)	<b>3,20</b> ±0,74	<b>0,045</b> ±0,012	<b>4,01</b> ±0,29	<b>0,069</b> ±0,001	<b>4,45</b> ±0,24	<b>0,087</b> ±0,020	<b>4,53</b> ±0,19	<b>0,099</b> ±0,006
18:4 (ω-3)	<b>10,54</b> ±1,40	<b>0,146</b> ±0,025	<b>10,85</b> ±0,85	<b>0,187</b> ±0,001	<b>13,71</b> ±2,47	<b>0,267</b> ±0,037	<b>12,77</b> ±1,10	<b>0,278</b> ±0,024
20:0	<b>0,17</b> ±0,05	<b>0,002</b> ±0,001	<b>0,14</b> ±0,02	<b>0,002</b> ±0,000	<b>0,16</b> ±0,02	<b>0,003</b> ±0,001	<b>0,09</b> ±0,02	<b>0,002</b> ±0,000
20:1 (ω-9)	<b>0,55</b> ±0,11	<b>0,008</b> ±0,002	<b>0,86</b> ±0,04	<b>0,015</b> ±0,001	<b>1,55</b> ±0,29	<b>0,030</b> ±0,008	<b>1,33</b> ±0,01	<b>0,029</b> ±0,003
20:2 (ω-9)	<b>0,09</b> ±0,06	<b>0,001</b> ±0,001	<b>0,09</b> ±0,04	<b>0,002</b> ±0,001	<b>0,05</b> ±0,02	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,09</b> ±0,03	<b>0,002</b> ±0,001
20:3 (ω-6)	<b>0,04</b> ±0,02	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,20</b> ±0,23	<b>0,004</b> ±0,004	<b>0,08</b> ±0,05	<b>0,001</b> ±0,001	<b>0,25</b> ±0,38	<b>0,006</b> ±0,009
20:4 (ω-6)	<b>0,03</b> ±0,01	-	<b>0,04</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,04</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,02</b> ±0,01	-
20:5 (ω-3)	<b>0,32</b> ±0,02	<b>0,004</b> ±0,000	<b>0,25</b> ±0,05	<b>0,004</b> ±0,000	<b>0,42</b> ±0,00	<b>0,008</b> ±0,002	<b>0,24</b> ±0,02	<b>0,005</b> ±0,001
22:0	<b>0,35</b> ±0,07	<b>0,005</b> ±0,001	<b>0,21</b> ±0,03	<b>0,004</b> ±0,001	<b>0,25</b> ±0,04	<b>0,005</b> ±0,001	<b>0,12</b> ±0,06	<b>0,003</b> ±0,002
22:1 (ω-9)	<b>0,24</b> ±0,04	<b>0,003</b> ±0,001	<b>0,51</b> ±0,67	<b>0,008</b> ±0,010	<b>0,21</b> ±0,01	<b>0,004</b> ±0,001	<b>0,10</b> ±0,01	<b>0,002</b> ±0,000
22:5 (ω-6)	<b>1,86</b> ±0,10	<b>0,026</b> ±0,003	<b>1,28</b> ±0,20	<b>0,022</b> ±0,002	<b>1,18</b> ±0,01	<b>0,023</b> ±0,003	<b>0,88</b> ±0,08	<b>0,019</b> ±0,003
22:6 (ω-3)	<b>11,24</b> ±0,31	<b>0,155</b> ±0,012	<b>6,59</b> ±0,90	<b>0,113</b> ±0,007	<b>9,66</b> ±0,25	<b>0,189</b> ±0,013	<b>6,43</b> ±0,22	<b>0,140</b> ±0,011
<b>Total</b>		<b>1,381</b> ±0,076		<b>1,726</b> ±0,135		<b>1,959</b> ±0,176		<b>2,184</b> ±0,208

<b>Saturados</b>	<b>41,56</b>	<b>0,57</b>	<b>41,35</b>	<b>0,72</b>	<b>40,44</b>	<b>0,79</b>	<b>44,87</b>	<b>0,98</b>
	±5,34	±0,04	±5,94	±0,15	±5,86	±0,16	±2,89	±0,15
<b>Monoinsaturados</b>	<b>28,32</b>	<b>0,39</b>	<b>31,22</b>	<b>0,54</b>	<b>27,36</b>	<b>0,54</b>	<b>27,00</b>	<b>0,59</b>
	±2,67	±0,06	±3,90	±0,03	±2,49	±0,06	±2,25	±0,01
<b>Sat+Mono</b>	<b>69,88</b>	<b>0,96</b>	<b>72,57</b>	<b>1,25</b>	<b>67,80</b>	<b>1,33</b>	<b>71,86</b>	<b>1,57</b>
	±2,94	±0,03	±2,05	±0,13	±3,45	±0,16	±1,11	±0,16
<b>Poliinsaturados</b>	<b>28,26</b>	<b>0,39</b>	<b>26,15</b>	<b>0,45</b>	<b>31,02</b>	<b>0,61</b>	<b>27,25</b>	<b>0,59</b>
	±2,84	±0,06	±1,85	±0,01	±3,41	±0,07	±1,18	±0,05
<b>ω-3</b>	<b>25,29</b>	<b>0,35</b>	<b>21,70</b>	<b>0,37</b>	<b>28,23</b>	<b>0,55</b>	<b>23,96</b>	<b>0,52</b>
	±2,40	±0,05	±2,06	±0,01	±3,08	±0,06	±1,32	±0,04
<b>ω-6</b>	<b>2,28</b>	<b>0,03</b>	<b>3,93</b>	<b>0,07</b>	<b>2,24</b>	<b>0,04</b>	<b>2,68</b>	<b>0,06</b>
	±0,44	±0,01	±0,23	±0,01	±0,45	±0,01	±0,32	±0,01
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>11,27</b>	<b>11,27</b>	<b>5,55</b>	<b>5,55</b>	<b>12,79</b>	<b>12,79</b>	<b>9,05</b>	<b>9,05</b>
	±1,29	±1,29	±0,81	±0,81	±1,87	±1,87	±1,46	±1,46



## **Capítulo 2.**

---

### **Cultivo semicontinuo de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) con intensidad luminosa elevada**





## **Introducción**

No capítulo 1 observouse que a intensidade luminosa e a dispoñibilidade de CO<sub>2</sub> afectan á composición bioquímica e á produción de exopolisacárido de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) na fase estacionaria en cultivos discontinuos. O cultivo semicontinuo é unha ferramenta eficaz para manter poboacións de microalgas en crecemento expoñencial, o que permite reducir o seu contido de substancias de reserva. Existen datos sobre o cultivo semicontinuo de *Isochrysis galbana* con varias taxas de renovación (Otero *et al.*, 1997a), pero non sobre T-ISO. Neste experimento T-ISO foi cultivada en sistema semicontinuo con varias taxas de renovación. Para evitar a excesiva produción de exopolisacárido que podería arruinar os cultivos controlouse o subministro de CO<sub>2</sub> pero utilizouse unha intensidade luminosa elevada, que algúns autores relacionan cunha maior produción de DHA en T-ISO (Tzovenis *et al.*, 1997).

## **Deseño experimental**

A microalga mariña *Isochrysis* aff. *galbana* (clon T-ISO, CCMP 1324) cultivouse en réxime semicontinuo, empregando biorreactores tubulares contendo 80 ml de cultivo cunha concentración de nutrientes equivalente a 4 mmoles/l de nitróxeno en forma de KNO<sub>3</sub> (ver Materiais e métodos). Os cultivos sometéronse a un réxime de luz:escuridade 12 h:12 h, sendo a intensidade luminosa de 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s. Introduciuse aireación suplementada con CO<sub>2</sub> e o pH mantívose en valores arredor de 8. Os cultivos unialgais iniciáronse cunha densidade de  $7,2 \times 10^6$  células/ml e deixáronse medrar ata acadar a fase estacionaria. Durante os primeiros días reduciuse a intensidade luminosa para evitar problemas de fotoinhibición. Cando os cultivos entraron na fase estacionaria iniciouse o réxime semicontinuo, retirando diariamente o 10%, 20%, 30%, 40% ou 50% do volume de cultivo. Unha vez en estado de equilibrio, recolléronse mostras de biomasa microalgal para determinacións de peso seco e análises bioquímicas. O último día todo o volume de cultivo foi recollido para realizar o experimento de enriquecemento de rotífero (Capítulo 5). Para conseguir a cantidade de microalga necesaria para este experimento cultiváronse tres réplicas

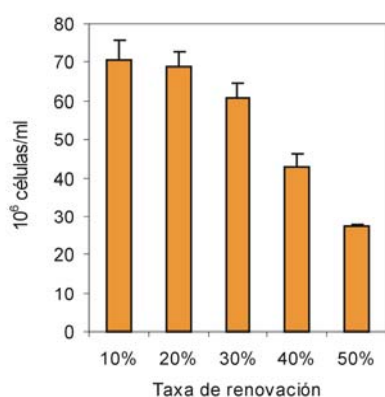
das taxas de renovación do 10% e 20%, catro da taxa de renovación do 30%, cinco da taxa de renovación do 40% e seis da taxa de renovación do 50%.

## **Resultados e discusión**

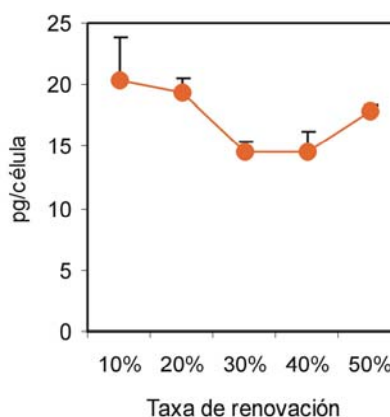
A densidade celular media na fase estacionaria (antes de comezar o réxime semicontinuo) foi de  $60,41 \pm 8,60 \times 10^6$  células/ml, maior que a conseguida nos cultivos discontinuos do capítulo 1. Esta cifra pode incrementarse aínda máis, ata case  $80 \times 10^6$  células/ml, se se utiliza luz continua (Boussiba *et al.*, 1988). Como acontece tipicamente nos sistemas semicontinuos, a densidade de estabilización no réxime semicontinuo descendeu a medida que aumenta a taxa de renovación, aínda que non houbo diferencias estatisticamente significativas entre as densidades celulares nas taxas de renovación do 10% e 20% (Figura 1; Táboa 1). Os nutrientes engadidos nas taxas de renovación do 10% e 20% permitiron que a densidade celular se incrementara ata  $70 \times 10^6$  células/ml, superando á obtida na fase estacionaria e compensando a dilución diaria dos cultivos. O peso seco celular diminuíu desde a taxa de renovación do 10% ata as taxas de renovación do 30% e 40%, pasando de 20,41 pg/célula a 14,49 e 14,57 pg/célula, e incrementouse novamente na taxa de renovación do 50% ata 17,92 pg/célula (Figura 2; Táboa 1). Estes valores son comparables aos obtidos por Tzovenis *et al.* (1997, 2003a) en condicións de iluminación similares ás nosas, en cultivos discontinuos e aireados de 4 l, en fase expoñencial e estacionaria. Outros autores sen embargo citan valores de peso seco tres veces maiores en T-ISO (Brown *et al.*, 1993). A evolución do peso orgánico (suma de proteínas, lípidos e glúcidos) foi diferente, descendendo de forma continua coa taxa de renovación (Táboa 1). Esta diferenza está probablemente relacionada cun aumento do contido inorgánico nas células das taxas de renovación superiores (ver Capítulo 10). En *Phaeodactylum tricornutum* observouse un incremento do volume celular coa taxa de renovación observado que podería suxerir asimesmo unha maior concentración de minerais nas taxas de renovación altas (Fábregas *et al.*, 1996).

A gráfica da evolución da produtividade expresada en células/l/día ten a forma parabólica típica dos sistemas semicontinuos que empregan varias taxas de renovación (Fábregas *et al.*, 1995a; 1995b). En cambio, a produtividade de

biomasa aumenta na taxa de renovación do 50% debido ao incremento do peso seco celular nesa condición respecto das taxas de renovación intermedias (Figura 3). A máxima produtividade en número de células obtívose na taxa de renovación do 30%, con  $18,17 \times 10^9$  células/l/día, mentres que a máxima produtividade en biomasa rexistrouse na taxa de renovación do 20% con 268 mg/l/día, aínda que só foi lixeiramente superior á conseguida na taxa de renovación do 30%. As produtividades máis baixas rexistráronse na taxa de renovación do 10%, sendo  $7,06 \times 10^9$  células/l/día e 144 mg/l/día (Figura 3; Táboa 1).



**Figura 1.** Densidades celulares de estabilización de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo semicontinuo con intensidade luminosa de  $162 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .



**Figura 2.** Peso seco (pg/célula) en función da taxa de renovación de T-ISO cultivada en réxime semicontinuo con intensidade luminosa de  $162 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

As densidades celulares na fase de estabilización son algo maiores que as obtidas en *I. galbana* coas mesmas condicións de cultivo e concentración de nitróxeno no medio (Otero *et al.*, 1997a), que acadou un valor máximo de  $63,49 \times 10^6$  células/ml na taxa de renovación do 10% e un mínimo de  $13,63 \times 10^6$  células/ml na do 50%. En consecuencia as produtividades en número de células tamén son maiores en T-ISO pero a tendencia é a mesma, coa máxima produtividade na taxa de renovación do 30%. Condicións de cultivo distintas modifican os valores da máxima produtividade e tamén a taxa de dilución óptima para conseguila tanto en *Isochrysis galbana* como en T-ISO. En estanques ao aire libre de 300 l e  $2,5 \text{ m}^2$  de superficie, con saturación de nutrientes e elevadas

intensidades luminosas, *I. galbana* acadou unha produtividade máxima (29,5 g de biomasa libre de cinzas por m<sup>2</sup> e día) cando a densidade celular despois de renovar se axusta a 350 mg/l de biomasa libre de cinzas (Boussiba *et al.*, 1988). Isto equivale a unha taxa de renovación diaria do 41% e a unha produtividade de 246 mg/l/día, algo superior á obtida con T-ISO neste experimento xa que o noso valor máximo de 268 mg/l/día refírese a biomasa total. En grandes biorreactores sometidos a unha iluminación continua de 40.000 lux (540  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s), as produtividades máximas de T-ISO oscilan entre  $4 \times 10^9$  células/l/día en cultivos de 200 l e  $10 \times 10^9$  células/l/día en cultivos de 80 l, cunha taxa de renovación do 50% nos dous casos (Laing, 1985). Estes valores son inferiores aos obtidos nos biorreactores de 80 ml –coa excepción da taxa de renovación do 10%- e probablemente son debidos a unha iluminación insuficiente.

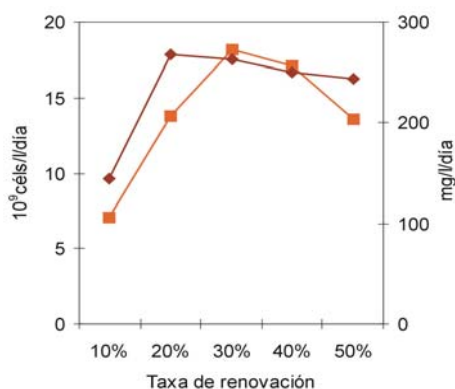
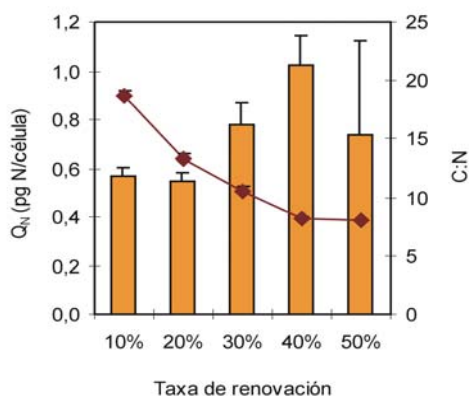


Figura 3. Produtividade do cultivo semicontinuo de T-ISO en fase de estabilización, cultivada cunha intensidade luminosa de 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s. -■-  $10^9$  células/l/día; -●- mg/l/día.

A cota celular de nitróxeno,  $Q_N$ , aumentou desde 0,55 pg/célula nas taxas de renovación do 10% e 20% ata 1,01 pg/célula na taxa de renovación do 40%, e descendeu novamente na taxa de renovación do 50%. A cota celular de carbono  $Q_C$  descendeu coa taxa de renovación desde 8,81 ata 5,30 pg/célula, aínda que houbo un novo incremento na taxa de renovación do 40%. Como consecuencia da evolución de  $Q_N$  e  $Q_C$  a relación C:N diminuíu de xeito lineal ata a taxa de renovación do 40%, a partir da cal se estabilizou marcando o punto de saturación por nitróxeno no medio de cultivo (Figura 4; Táboa 1).

A evolución de  $Q_N$  evidencia que foi o nitróxeno, e non a luz, o factor limitante do crecemento ata a taxa de renovación do 40%, a pesar de que a

elevada densidade celular nos cultivos con taxas de renovación baixas seguramente reduciu en gran medida a radiación luminosa efectiva dispoñible no interior do fotobiorreactor. Por outra banda, nun cultivo continuo limitado por luz pero con suficientes nutrientes, a cota celular de nitróxeno aumenta só lixeiramente en resposta ao incremento da taxa de dilución; o incremento é moito maior en condicións de limitación por nitróxeno ou fósforo (Laws e Bannister, 1980; Otero *et al.*, 1998).



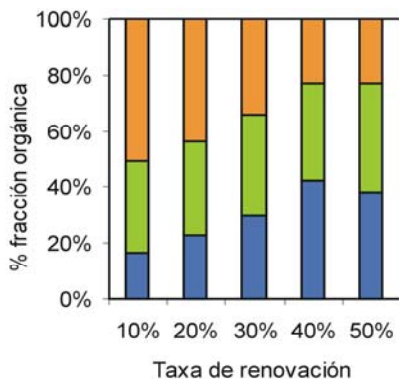
**Figura 4.** Evolución da cota celular de nitróxeno  $Q_N$ , e da relación C:N en relación coa taxa de renovación en T-ISO cultivada cunha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . ■  $Q_N$ ; -◆- C:N.

A relación C:N diminuíu ao incrementarse a taxa de renovación, estabilizándose nas taxas de renovación 40% e 50% con valores 8,3 e 8,0. Estes valores son lixeiramente altos xa que nun cultivo microalgal sen limitación por nutrientes C:N tende a aproximarse á relación de Redfield, que ten un valor de 6,6 (Goldman *et al.*, 1989) pero outros traballos tamén citan valores relativamente elevados de C:N, ou relacións N/C baixas. Sukenik e Wahnon (1991) rexistraron valores de  $N/C=0,106$  ( $C:N=9,4$ ) en T-ISO cultivada en turbidostato e polo tanto non limitada por nutrientes. En condicións de limitación por nitróxeno ou fósforo, a relación C:N está correlacionada linealmente coa taxa de crecemento e diminúe a medida que esta aumenta, de forma lineal en cultivos continuos con iluminación tamén continua (Laws e Wong, 1978; Laws e Bannister, 1980) e estabilizándose en condicións de saturación por nitróxeno nos cultivos semicontinuos con réxime de luz:escuridade 12h:12h (Otero *et al.*, 1998). Debe terse en conta que a evolución da relación C:N non depende unicamente do comportamento da cota celular de nitróxeno, senón tamén da cota celular de carbono,  $Q_C$ . As conclusións

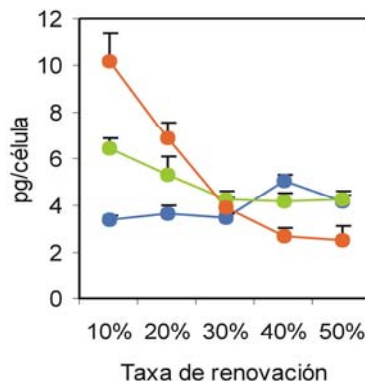
establecidas sobre o comportamento de  $Q_C$  en cultivos continuos son diversas. Laws e Bannister (1980) rexistran evolucións diferentes de  $Q_C$  en función de cal sexa o nutriente limitante. Así, en *Thalassiosira fluviatilis* cultivada en quimiostato cun ciclo de luz:escuridade 12h:12h a cota celular de carbono mantense constante en condicións de limitación por nitróxeno, independentemente da taxa de dilución, e diminúe ao incrementarse a taxa de dilución cando o nutriente limitante é o fósforo. En *Dunaliella tertiolecta* cultivada con limitación de nitróxeno  $Q_C$  incrementábase rapidamente cando a taxa de crecemento se aproxima ao seu valor máximo, pero este incremento é moito máis lento nas taxas de crecemento inferiores (Goldman e Peavey, 1979).

Noutras especies de microalgas, a evolución das cotas celulares de carbono e nitróxeno e da relación C:N en sistemas semicontínuos coas mesmas condicións de cultivo é similar á observada en T-ISO, pero os valores son diferentes segundo a especie. En *Phaeodactylum tricornutum* cultivado cunha concentración 4 mM de nitróxeno a relación C:N estabilízase na taxa de renovación do 40% (Otero *et al.*, 1998), mentres que en *Dunaliella tertiolecta* cultivada coa mesma concentración de nutrientes a estabilización prodúcese na taxa de renovación do 30% (Fábregas *et al.*, 1995a). Os valores de estabilización de C:N nestas dúas especies son menores que en T-ISO, situándose arredor de 6 en *P. tricornutum* e 5,2-5,3 en *D. tertiolecta*. En *Isochrysis galbana* cultivada en réxime semicontínuo con 4mM de nitróxeno a estabilización de C:N prodúcese na taxa de renovación do 40%, con valores entre 7 e 7,3 (Otero, 1994).

Os cambios no estado nutricional de *Isochrysis aff. galbana* T-ISO reflexáronse na súa composición bioquímica, que variou considerablemente en función da taxa de renovación. A medida que aumentou a dispoñibilidade de nitróxeno aumentou o contido de proteína e diminuíu o de lípidos e sobre todo glúcidos, que se estabilizaron cando se alcanzou a saturación por nitróxeno, a partir da taxa de renovación do 40%. O peso orgánico calculado como a suma de proteínas, lípidos e glúcidos, reduciuse a medida que se incrementou a taxa de renovación, xa que o aumento do contido proteico non compensou a drástica diminución da cantidade de glúcidos. A porcentaxe orgánica, é dicir, o contido orgánico en relación ao peso seco celular, experimentou a mesma evolución, diminuíndo tamén de xeito moi marcado (Táboa 1).



**Figura 5.** Porcentaxes de proteínas, lípidos e glicídios na fracción orgánica de T-ISO en réxime semicontinuo cultivada con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . ■ proteínas; ■ lípidos; ■ glicídios.



**Figura 6.** Contido celular (pg/célula) de proteínas, lípidos e glicídios de T-ISO cultivada en réxime semicontinuo cultivada con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . -●- proteínas; -●- lípidos; -●- glicídios.

A porcentaxe de proteína na fracción orgánica evolucionou da mesma maneira que  $Q_N$  e multiplicouse por 2,5, pasando dun 16,99% na taxa de renovação do 10% a un 42,20 % na taxa de renovação do 40% e disminuindo algo na taxa de renovação do 50% (Figura 5, Táboa 1). En condicións de saturación por nitróxeno a porcentaxe de proteína na fracción orgánica das microalgas tende a estabilizarse independentemente da taxa de renovação e da concentración de nitróxeno no medio. Porcentaxes de proteína entre o 34% e o 37% da fracción orgánica obsérvanse ao final da fase logarítmica en *Isochrysis* sp. cultivada con concentracións elevadas de nitróxeno, que diminúen ata o 23% na mesma fase de crecemento se a microalga se cultivou con deficiencia de nitróxeno (Ben-Amotz *et al.*, 1985). O perfil de ácidos graxos permite supoñer que a cepa que se empregou neste traballo, UTEX 2307, é moi similar á *Isochrysis* aff. *galbana* CCMP 1324 utilizada por nós. En contido celular, a proteína mantívose practicamente estable entre as taxas de renovação do 10% e 30% con valores entre 3,41 e 3,63 pg/célula, e incrementouse na taxa de renovação do 40%, na que acadou un valor de 5,01 pg/célula (Figura 6; Táboa 1). Tanto a cantidade de proteína como a súa evolución coa taxa de renovação son practicamente iguais aos datos obtidos por Sukenik e Wahnnon (1991) en quimiostato con luz continua, que citan un aumento do contido de proteína coa taxa de dilución e valores

comprendidos entre 3,5 e 5,3 pg de proteína por célula. Outros autores en cambio citan cantidades de proteína moito maiores, de 7,7 a 11 pg/célula dependendo do sistema de cultivo e da intensidade luminosa, pero equivalentes a un 37% da fracción orgánica (Renaud *et al.*, 1991), que é un valor algo inferior aos obtidos no noso experimento en condicións de saturación por nitróxeno.

Por outra banda, a porcentaxe de proteína en relación ao peso seco duplicouse entre as taxas de renovación do 10% e do 40% debido ao descenso do peso seco celular, e pasou do 16,70% ao 34,41%, que é un valor moi similar ao obtido en cultivos discontinuos de T-ISO (Whyte, 1987) e de primnesiófitas en xeral (Brown *et al.*, 1997) na fase de crecemento expoñencial. Na taxa de renovación do 50% o contido de proteína diminuíu ata 4,16 pg/célula que supuxeron un 23,19% do peso seco. A porcentaxe de proteína en T-ISO pode alcanzar o 41% do peso seco na fase de crecemento expoñencial, pero un réxime semicontinuo con condicións de cultivo deficientes (bolsas de 85 l con iluminación de 100  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , medio de cultivo f/2 e taxa de renovación do 15% cada dous días) pode provocar que o contido proteico diminúa ata os valores típicos dun cultivo discontinuo en fase estacionaria, aproximadamente un 21% (Brown *et al.*, 1993b).

Os cultivos de T-ISO en fase estacionaria acumularon unha gran cantidade de glúcidos (Capítulo 1), e os glúcidos foron tamén a principal substancia de reserva nos cultivos semicontinuos con taxas de renovación baixas. Experimentaron un significativo descenso ao incrementarse a taxa de renovación, pasando de 10,19 pg/célula na taxa de renovación do 10% a 2,54 pg/célula na taxa de renovación do 50% (Figura 5; Táboa 1), evolucionando de maneira practicamente igual a *I. galbana* cultivada nas mesmas condicións (Otero *et al.*, 1997a). O contido de glúcidos debeu ser aínda maior, especialmente nas taxas de renovación baixas, xa que non se tivo en conta a produción de exopolisacáridos. A diminución no contido de glúcidos en T-ISO é a causa principal do descenso de  $Q_c$  e da relación C:N a medida que se incrementa a taxa de renovación. Un descenso continuo aínda que non linear, de 16 a 5 pg/célula, tamén se observa en T-ISO cultivada en quimiostato a medida que a taxa de dilución aumenta de 0,18 a 0,95/día (Sukenic e Wahnnon, 1991). En porcentaxe, os valores obtidos representaron un 50,77% e un 23,26% respectivamente da fracción orgánica da

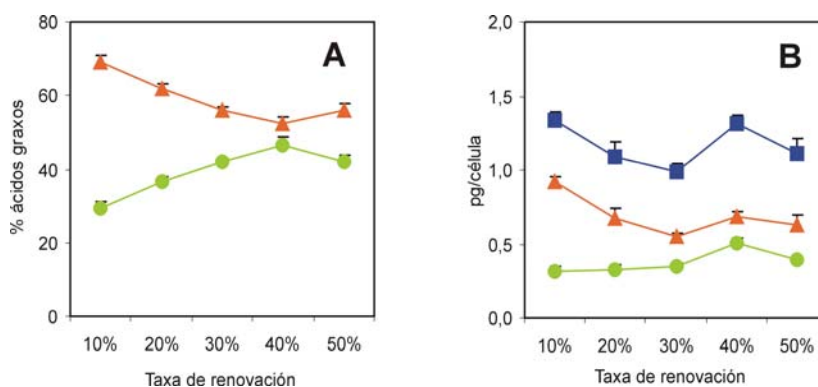


microalga e son comparables aos observados en distintas fases do crecemento de *Isochrysis galbana*, que van do 15,21% na fase de crecemento expoñencial ao 48,35% na fase estacionaria unha vez que cesou o crecemento (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989). En porcentaxes de peso seco os valores foron similares, do 49,93% ao 14,16%. Sen embargo, non todos os autores citan porcentaxes tan elevadas de glúcidos en T-ISO. Nalgúns casos os glúcidos non representan máis que un 20% do peso seco en condicións de deficiencia de nitróxeno (Ben-Amotz *et al.*, 1985), ou mesmo un 9% aproximadamente (Whyte, 1987). A razón máis probable destes valores é a baixa intensidade luminosa á que foron cultivadas as microalgas.

A porcentaxe de lípidos na fracción orgánica experimentou un lixeiro incremento coa taxa de renovación, pasando do 32,24% ao 38,64% (Figura 5; Táboa 1). Sen embargo, o contido lipídico por célula reduciuse de 6,47 pg na taxa de renovación do 10% a 4,23 pg na taxa de renovación do 30%, valor que se mantén nas taxas de renovación superiores (Figura 6; Táboa 1). En cultivos en quimiostato, o contido lipídico pode descender dos 6,3 aos 2,6 pg/célula cando a taxa de crecemento é 0,95 divisións/día (Sukenic e Wahnon, 1991). En porcentaxes de peso seco os lípidos mantivéronse estables, oscilando entre o 27% e o 31% entre as taxas de renovación do 10% e do 40%, e unicamente descendéron ata o 23% na taxa de renovación do 50% (Táboa 1). As porcentaxes de lípidos obtidas no noso sistema coas taxas de renovación mínima e máxima son moi semellantes ás obtidas en cultivos de T-ISO limitados por nitróxeno e fósforo e con taxas de crecemento equivalentes respectivamente ao 5% e ao 50% de  $\mu_{\text{máx}}$  (Reitan *et al.*, 1994). A pesares de que estas taxas de crecemento son inferiores ás dos cultivos semicontínuos con taxas de renovación do 10% e do 50% (taxa de crecemento  $\mu=0,2$  e  $=1$  respectivamente), as células non acumularon maiores cantidades de lípidos debido probablemente á menor intensidade luminosa, 70-90  $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$  para cultivos en matraces de 5 l.

O contido celular de ácidos graxos de T-ISO non resultou significativamente afectado pola taxa de renovación. Os valores máximos obtivéronse nas taxas de renovación do 10% e do 40%, con 1,34 e 1,31 pg/célula respectivamente, e nas demais taxas de renovación variaron entre 0,99 e 1,12 pg/célula (Figura 7B; Táboa 2). Estes datos son moi similares aos obtidos por Volkman *et al.* (1989) ao final da fase logarítmica en cultivos discontinuos. En

cambio, si houbo variacións na composición de ácidos graxos producidas pola taxa de renovación. En cultivos semicontínuos, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados diminúen a medida que aumenta a taxa de renovación mentres que o nitróxeno é limitante, aumentando os ácidos graxos poliinsaturados (Otero e Fábregas, 1997). En resposta á maior dispoñibilidade de nitróxeno, o conxunto dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados experimentou un descenso en porcentaxe ata a taxa de renovación do 40%, pasando do 69% ao 52,49%, e en contido celular ata a taxa de renovación do 30%, de 0,92 a 0,55 pg/célula, ascendendo a continuación. O comportamento dos ácidos graxos poliinsaturados foi o inverso, e incrementáronse en porcentaxe e contido celular ata a taxa de renovación do 40%, pasando dun 29,50% e 0,39 pg/célula a un 46% e 0,57 pg/célula (Figuras 7A e 7B; Táboa 2).



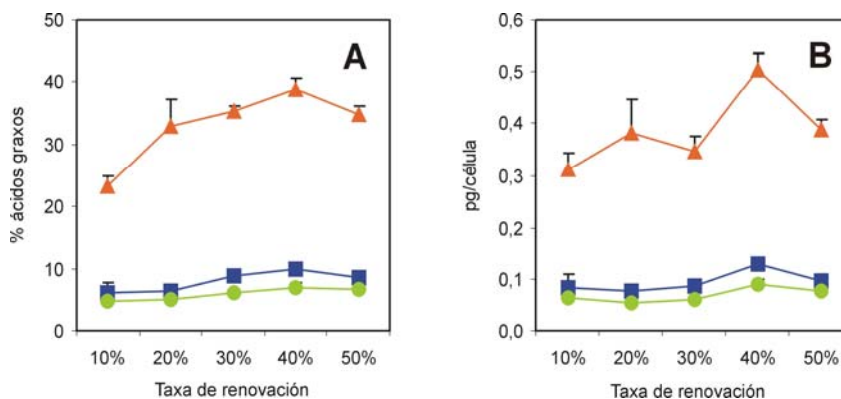
**Figura 7.** Evolución do contido de ácidos graxos de *T-ISO* en cultivo semicontínuo cunha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . A: expresado en porcentaxe sobre o total dos ácidos graxos. B: expresado en pg de ácido graxo por célula. -●- ácidos graxos poliinsaturados; -▲- ácidos graxos saturados + monoinsaturados; -■- ácidos graxos totais.

Os ácidos graxos máis abundantes en *Isochrysis aff. galbana* *T-ISO* son o 14:0, o 16:0, o 18:1 $\omega$ -9 e o 18:4 $\omega$ -3, e todos apareceron en porcentaxes superiores ao 15% do total dos ácidos graxos na maioría das taxas de renovación probadas. Outros ácidos graxos importantes son 16:1 $\omega$ -7, 18:2 $\omega$ -6, 18:3 $\omega$ -3 e 22:6 $\omega$ -3 (DHA), presentes en porcentaxes superiores ao 5%. Os ácidos graxos 16:0 e 18:1 $\omega$ -9 foron os principais responsables da diminución do conxunto de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, xa que a suma dos dous pasou de representar o 40,35% dos ácidos graxos na taxa de renovación do 10% a un

25,73% na taxa de renovación do 40%, e o contido celular de cada un deles reduciuse case á metade (Táboa 2).

No tocante aos ácidos graxos poliinsaturados, os maiores incrementos en porcentaxe rexistráronse nos  $\omega$ -3. O DHA pasou do 6,28% na taxa de renovación do 10% ao 9,88% na taxa de renovación do 40%, aumentando o contido celular de 0,084 a 0,129 pg/célula (Figura 8; Táboa 2). Estas porcentaxes son similares ás rexistradas nos cultivos discontinuos (Capítulo 1), pero menores que as porcentaxes sinaladas por diversos autores (Sukenik e Wahnon, 1992; Brown *et al.*, 1993a; Tzovenis *et al.*, 1997). O menor contido de ácidos graxos nos cultivos semicontinuos deu lugar tamén a menores contidos de DHA. As porcentaxes dos ácidos graxos 18:3 $\omega$ -3 e 18:4 $\omega$ -3 case se duplicaron, pasando de 4,66% e 11,98% a 7,90% e 20,48% respectivamente, mentres que os seus respectivos contidos celulares experimentaron un notable incremento, de 0,062 e 0,160 pg/célula a 0,103 e 0,267 pg/célula respectivamente. O conxunto dos ácidos graxos  $\omega$ -6 incrementouse de 4,77% ata 6,93% na taxa de renovación do 40% (Figura 8), e a relación  $\omega$ -3: $\omega$ -6 elevouse lixeiramente nas taxas de renovación intermedias. Os ácidos graxos 14:0 e 16:1 $\omega$ -7 non sufriron modificacións destacadas, producíndose soamente un pequeno descenso nas taxas de renovación máis altas tanto en porcentaxe como en contido celular, mentres que o 18:2 $\omega$ -6 incrementouse lixeiramente (Táboa 2).

As variacións das porcentaxes dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados suxire a posible existencia de cambios na composición das clases de lípidos acílicos. A diminución do 16:0 e o 18:1, principais compoñentes dos lípidos neutros en T-ISO (Sukenik e Wahnon, 1991), indica unha redución do contido de lípidos de reserva. O DHA é característico dos fosfolípidos e o 18:4 $\omega$ -3 nas primnesiofíceas localízase case exclusivamente nos galactolípidos, principais compoñentes das membranas tilacoidais (Sukenik e Wahnon, 1991; López Alonso *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1997; Meireles *et al.*, 2003). O incremento destes dous ácidos graxos ata a taxa de renovación do 40% suxire que a maior dispoñibilidade de nitróxeno co aumento da taxa de renovación ocasionou un incremento da superficie fotosintética e polo tanto tamén un incremento do contido de clorofila, igual que acontece con *I. galbana* en cultivo semicontinuo (Otero *et al.*, 1997).



**Figura 8.** Evolución do contido de ácidos graxos  $\omega$ -3 ( $\blacktriangle$ ),  $\omega$ -6 ( $\bullet$ ) e DHA ( $\blacksquare$ ) en *Isochrysis aff. galbana* T-ISO en cultivo semicontinuo cultivada cunha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . A: expresado en porcentaxes. B: expresado en pg de ácido graso por célula.

A relativa estabilidade do contido de ácidos graxos contrasta co descenso do contido lipídico. Ademais, os ácidos graxos representaron unicamente entre un 20% e un 31% dos lípidos totais. Estas porcentaxes son baixas comparadas cos datos de Reitan *et al.* (1994) que citan entre un 36% e un 40% de ácidos graxos nos lípidos de T-ISO en condicións de limitación por fósforo e cos de Sukenik e Livne (1991) que atoparon porcentaxes de ácidos graxos comprendidos entre o 40% e o 60% do peso dos lípidos totais. T-ISO presenta unha gran variedade de clases de lípidos (Volkman *et al.*, 1989), polo que unha gran parte do seu contido lipídico debe corresponder a lípidos non acílicos. Probablemente os lípidos “acílicos” experimentaron cambios nas súas respectivas proporcións, diminuindo a porcentaxe de triacilglicerois e aumentando os lípidos polares –fosfolípidos e glicolípidos- pero sen producirse grandes variacións cuantitativas. O incremento da taxa de crecemento de T-ISO en quimiostato pode causar unicamente pequenas diminucións no contido lipídico das células, pero grandes cambios na súa composición, reducindo a porcentaxe de lípidos neutros e incrementando as de glicolípidos e fosfolípidos (Saoudi-Helis *et al.*, 1994).

Os lípidos non formados por ácidos graxos que máis contribúen ao contido lipídico de T-ISO son as alquenonas. A limitación por nitróxeno ou unha intensidade luminosa elevada incrementan o contido de alquenonas (Brown *et al.*,

1993a; Dunstan *et al.*, 1993). Aínda que as alquenonas poden supoñer ata un 26% dos lípidos totais de T-ISO (Dunstan *et al.*, 1993), outros autores citan cantidades de alquenonas máis baixas cando T-ISO é cultivada en turbidostato, aproximadamente 0,30 pg/célula en cultivos saturados por nitróxeno e 0,48 pg/célula —11% dos lípidos totais— en cultivos limitados (Parrish *et al.*, 1998). A contribución dos pigmentos ao contido lipídico total pode considerarse limitado xa que clorofilas e carotenoides representan porcentaxes pequenas do peso celular no xénero *Isochrysis* (Capítulo 1). Dependendo das condicións de cultivo, o contido de clorofilas pode oscilar entre o 0,41% e o 1,83% do peso orgánico de *Isochrysis* sp., e o de carotenoides entre o 0,33% e o 0,64% (Ben-Amotz *et al.*, 1985). Polo tanto a evolución do contido de clorofila nos nosos cultivos probablemente non tivo un efecto destacado sobre os lípidos totais, aínda que evolucionaron de forma inversa. É posible que tamén se producisen pequenos incrementos no contido de carotenoides (Saoudi-Helis *et al.*, 1994; Sukenik e Wahnou, 1991), pero asimesmo con escasa influencia sobre o contido lipídico total. Outras clases de lípidos presentes en T-ISO como esteroides ou hidrocarburos aparecen soamente en pequenas cantidades (Volkman *et al.*, 1989; Dunstan *et al.*, 1993).

A variación da taxa de renovación produciu modificacións importantes na composición de T-ISO. Nos cultivos saturados por nitróxeno obtivéronse os máximos contidos de proteína e de ácidos graxos  $\omega$ -3 e reduciuse en gran medida o contido de glúcidos, ademais de alcanzarse produtividades elevadas. Porén, o contido de DHA foi máis baixo do agardado para cultivos semicontínuos polo que é necesario introducir novas modificacións nas condicións de cultivo.

**Táboa 1.** Composición de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en réxime semicontinuo cunha concentración de nitróxeno 4 mM e intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

	Taxa de renovación				
	10 %	20 %	30 %	40 %	50%
<b>Densidade celular</b>	70,58	69,00	60,56	42,91	27,27
<b>(10<sup>6</sup> cél/ml<math>\pm</math>std)</b>	$\pm 5,67$	$\pm 3,79$	$\pm 6,55$	$\pm 3,93$	$\pm 2,61$
<b>Produtividade</b>					
<b>(10<sup>9</sup> células/l/día)</b>	7,06	13,80	18,17	17,16	13,63
<b>(mg/l/día)</b>	144	268	263	250	244
<b>Peso seco (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	20,41 $\pm$ 3,36	19,39 $\pm$ 1,16	14,49 $\pm$ 0,86	14,57 $\pm$ 1,70	17,92 $\pm$ 0,52
<b>Proteína (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	3,41 $\pm$ 0,15	3,63 $\pm$ 0,39	3,48 $\pm$ 0,18	5,01 $\pm$ 0,26	4,16 $\pm$ 0,43
<b>Lípidos (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	6,47 $\pm$ 0,43	5,32 $\pm$ 0,74	4,23 $\pm$ 0,35	4,18 $\pm$ 0,31	4,22 $\pm$ 0,25
<b>Glúcidos (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	10,19 $\pm$ 1,17	6,91 $\pm$ 0,61	3,92 $\pm$ 0,40	2,69 $\pm$ 0,36	2,54 $\pm$ 0,55
<b>Total prot+líp+glúc (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	20,07 $\pm$ 1,34	15,86 $\pm$ 1,38	11,83 $\pm$ 0,48	11,88 $\pm$ 0,48	10,91 $\pm$ 0,32
<b>Valor calórico (10<sup>-7</sup> J/cél)</b>	5,10	4,14	3,17	3,31	3,10
<b>% proteína</b>	16,70	18,71	24,01	34,41	23,19
<b>% lípidos</b>	31,70	27,44	29,20	28,70	23,54
<b>% glúcidos</b>	49,93	35,64	27,04	18,44	14,16
<b>Total orgánico</b>	98,33	81,79	80,25	81,55	60,18
<b>% proteína na F. O.</b>	16,99	22,88	29,92	42,20	38,10
<b>% lípidos na F. O.</b>	32,24	33,55	36,37	35,19	38,64
<b>% glúcidos na F. O.</b>	50,77	43,57	33,71	22,61	23,26
<b>Q<sub>N</sub> (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	0,55 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,18	0,77 $\pm$ 0,29
<b>Q<sub>C</sub> (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	8,81 $\pm$ 0,55	6,34 $\pm$ 0,17	6,42 $\pm$ 0,78	7,20 $\pm$ 1,32	5,30 $\pm$ 1,91
<b>Relación C:N (átomos)</b>	18,7	13,5	10,6	8,3	8,0

**Táboa 2.** Composición de ácidos graxos de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) cultivada en réxime semicontínuo cunha concentración de nitróxeno 4 mM, expresada en porcentaxes sobre o total de ácidos graxos e pg/célula.

Ácidos graxos	Taxa de renovación									
	10%		20%		30%		40%		50 %	
	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél
<b>14:0</b>	<b>17,81</b>	<b>0,238</b>	<b>16,69</b>	<b>0,183</b>	<b>17,11</b>	<b>0,168</b>	<b>15,90</b>	<b>0,207</b>	<b>15,23</b>	<b>0,172</b>
	±1,29	±0,021	±1,59	±0,030	±1,15	±0,006	±2,43	±0,033	±2,14	±0,040
<b>16:0</b>	<b>19,86</b>	<b>0,266</b>	<b>17,31</b>	<b>0,189</b>	<b>13,28</b>	<b>0,131</b>	<b>12,38</b>	<b>0,161</b>	<b>14,42</b>	<b>0,162</b>
	±0,43	±0,010	±0,34	±0,016	±1,01	±0,003	±0,66	±0,009	±0,50	±0,019
<b>16:1 (ω-9)</b>	<b>0,32</b>	<b>0,004</b>	<b>0,24</b>	<b>0,003</b>	<b>0,10</b>	<b>0,001</b>	<b>0,24</b>	<b>0,003</b>	<b>0,31</b>	<b>0,004</b>
	±0,03	±0,000	±0,05	±0,000	±0,09	±0,001	±0,06	±0,001	±0,08	±0,001
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>5,87</b>	<b>0,078</b>	<b>6,03</b>	<b>0,066</b>	<b>5,71</b>	<b>0,056</b>	<b>4,94</b>	<b>0,065</b>	<b>4,44</b>	<b>0,050</b>
	±0,44	±0,004	±0,29	±0,008	±0,28	±0,001	±0,46	±0,009	±0,42	±0,009
<b>16:2 (ω-6)</b>	<b>0,31</b>	<b>0,004</b>	<b>0,35</b>	<b>0,004</b>	<b>0,48</b>	<b>0,005</b>	<b>0,51</b>	<b>0,007</b>	<b>0,43</b>	<b>0,005</b>
	±0,13	±0,002	±0,02	±0,001	±0,03	±0,000	±0,15	±0,002	±0,16	±0,002
<b>16:2 (ω-4)</b>	<b>1,32</b>	<b>0,018</b>	<b>0,94</b>	<b>0,010</b>	<b>0,64</b>	<b>0,006</b>	<b>0,59</b>	<b>0,008</b>	<b>0,53</b>	<b>0,006</b>
	±0,12	±0,001	±0,10	±0,002	±0,02	±0,000	±0,13	±0,002	±0,06	±0,001
<b>18:0</b>	<b>1,01</b>	<b>0,014</b>	<b>0,61</b>	<b>0,007</b>	<b>0,34</b>	<b>0,003</b>	<b>0,90</b>	<b>0,012</b>	<b>0,84</b>	<b>0,009</b>
	±0,15	±0,002	±0,42	±0,005	±0,26	±0,003	±0,65	±0,008	±0,24	±0,002
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>20,49</b>	<b>0,274</b>	<b>17,09</b>	<b>0,187</b>	<b>15,82</b>	<b>0,156</b>	<b>13,35</b>	<b>0,174</b>	<b>14,46</b>	<b>0,161</b>
	±0,91	±0,005	±0,50	±0,014	±0,79	±0,017	±1,01	±0,015	±1,06	±0,009
<b>18:1 (ω-7)</b>	<b>1,89</b>	<b>0,025</b>	<b>1,75</b>	<b>0,019</b>	<b>1,42</b>	<b>0,014</b>	<b>1,58</b>	<b>0,021</b>	<b>1,66</b>	<b>0,018</b>
	±0,04	±0,001	±0,15	±0,001	±0,23	±0,003	±0,20	±0,003	±0,19	±0,001
<b>18:2 (ω-6)</b>	<b>4,22</b>	<b>0,056</b>	<b>4,42</b>	<b>0,048</b>	<b>5,09</b>	<b>0,050</b>	<b>5,62</b>	<b>0,073</b>	<b>5,56</b>	<b>0,062</b>
	±0,27	±0,004	±0,16	±0,002	±0,03	±0,003	±0,54	±0,008	±0,34	±0,001
<b>18:3 (ω-6)</b>	<b>0,10</b>	<b>0,001</b>	<b>0,14</b>	<b>0,002</b>	<b>0,33</b>	<b>0,003</b>	<b>0,61</b>	<b>0,008</b>	<b>0,59</b>	<b>0,007</b>
	±0,03	±0,000	±0,02	±0,000	±0,01	±0,000	±0,03	±0,001	±0,04	±0,000
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>4,66</b>	<b>0,062</b>	<b>6,75</b>	<b>0,074</b>	<b>7,28</b>	<b>0,072</b>	<b>7,90</b>	<b>0,103</b>	<b>7,53</b>	<b>0,084</b>
	±0,27	±0,001	±0,98	±0,010	±0,20	±0,006	±0,58	±0,009	±0,66	±0,002
<b>18:4 (ω-3)</b>	<b>11,96</b>	<b>0,160</b>	<b>16,49</b>	<b>0,180</b>	<b>18,63</b>	<b>0,184</b>	<b>20,48</b>	<b>0,267</b>	<b>18,17</b>	<b>0,202</b>
	±0,64	±0,012	±0,77	±0,019	±0,31	±0,011	±0,58	±0,008	±1,12	±0,009
<b>20:0</b>	<b>0,25</b>	<b>0,003</b>	<b>0,12</b>	<b>0,001</b>	<b>0,13</b>	<b>0,001</b>	<b>0,07</b>	<b>0,001</b>	<b>0,09</b>	<b>0,001</b>
	±0,05	±0,001	±0,09	±0,001	±0,01	±0,000	±0,01	±0,000	±0,01	±0,000
<b>20:1 (ω-9)</b>	<b>1,00</b>	<b>0,013</b>	<b>1,51</b>	<b>0,017</b>	<b>1,68</b>	<b>0,017</b>	<b>2,96</b>	<b>0,039</b>	<b>4,46</b>	<b>0,049</b>
	±0,23	±0,003	±0,11	±0,003	±0,19	±0,002	±0,13	±0,003	±0,83	±0,007

<b>20:2 (ω-9)</b>	<b>0,10</b> ±0,04	<b>0,001</b> ±0,001	<b>0,15</b> ±0,05	<b>0,002</b> ±0,001	<b>0,07</b> ±0,02	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,05</b> ±0,04	<b>0,001</b> ±0,001	<b>0,05</b> ±0,02	<b>0,001</b> ±0,000
<b>20:3 (ω-6)</b>	<b>0,07</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,09</b> ±0,03	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,08</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,08</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,10</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>0,08</b> ±0,02	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,14</b> ±0,10	<b>0,002</b> ±0,001	<b>0,16</b> ±0,10	<b>0,002</b> ±0,001	<b>0,12</b> ±0,01	<b>0,002</b> ±0,000	<b>0,09</b> ±0,02	<b>0,002</b> ±0,000
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>0,41</b> ±0,15	<b>0,005</b> ±0,002	<b>0,53</b> ±0,20	<b>0,006</b> ±0,002	<b>0,44</b> ±0,05	<b>0,004</b> ±0,001	<b>0,53</b> ±0,04	<b>0,007</b> ±0,001	<b>0,44</b> ±0,03	<b>0,007</b> ±0,001
<b>22:0</b>	<b>0,34</b> ±0,04	<b>0,004</b> ±0,001	<b>0,23</b> ±0,01	<b>0,003</b> ±0,000	<b>0,21</b> ±0,03	<b>0,002</b> ±0,000	<b>0,13</b> ±0,01	<b>0,002</b> ±0,000	<b>0,17</b> ±0,04	<b>0,002</b> ±0,000
<b>22:1 (ω-9)</b>	<b>0,16</b> ±0,13	<b>0,002</b> ±0,002	<b>0,20</b> ±0,08	<b>0,002</b> ±0,001	<b>0,10</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,04</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,05</b> ±0,04	<b>0,001</b> ±0,000
<b>22:5 (ω-6)</b>	<b>1,49</b> ±0,27	<b>0,020</b> ±0,005	<b>1,69</b> ±0,15	<b>0,018</b> ±0,001	<b>2,06</b> ±0,20	<b>0,020</b> ±0,003	<b>1,84</b> ±0,24	<b>0,024</b> ±0,003	<b>1,75</b> ±0,24	<b>0,024</b> ±0,003
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>6,28</b> ±1,47	<b>0,084</b> ±0,023	<b>6,52</b> ±0,70	<b>0,071</b> ±0,009	<b>8,83</b> ±0,59	<b>0,087</b> ±0,011	<b>9,88</b> ±0,03	<b>0,129</b> ±0,013	<b>8,63</b> ±0,37	<b>0,129</b> ±0,013
<b>Total</b>		<b>1,337</b> ±0,059		<b>1,092</b> ±0,096		<b>0,986</b> ±0,060		<b>1,311</b> ±0,058		<b>1,118</b> ±0,096
<b>Saturados</b>	<b>39,28</b> ±1,58	<b>0,525</b> ±0,032	<b>34,96</b> ±2,32	<b>0,383</b> ±0,049	<b>31,07</b> ±1,77	<b>0,306</b> ±0,005	<b>29,38</b> ±2,57	<b>0,382</b> ±0,033	<b>30,75</b> ±2,52	<b>0,345</b> ±0,059
<b>Monoinsaturados</b>	<b>29,73</b> ±1,36	<b>0,397</b> ±0,003	<b>26,82</b> ±0,92	<b>0,293</b> ±0,026	<b>24,82</b> ±0,70	<b>0,245</b> ±0,022	<b>23,11</b> ±0,84	<b>0,301</b> ±0,022	<b>25,39</b> ±1,12	<b>0,283</b> ±0,012
<b>Sat+Mono</b>	<b>69,00</b> ±1,86	<b>0,922</b> ±0,029	<b>61,78</b> ±1,43	<b>0,675</b> ±0,069	<b>55,89</b> ±1,07	<b>0,551</b> ±0,023	<b>52,49</b> ±1,74	<b>0,683</b> ±0,036	<b>56,13</b> ±1,52	<b>0,628</b> ±0,071
<b>Poliinsaturados</b>	<b>29,50</b> ±1,72	<b>0,395</b> ±0,036	<b>36,52</b> ±1,31	<b>0,399</b> ±0,031	<b>42,05</b> ±0,91	<b>0,415</b> ±0,034	<b>46,36</b> ±2,41	<b>0,604</b> ±0,040	<b>42,12</b> ±1,76	<b>0,470</b> ±0,022
<b>ω-3</b>	<b>23,30</b> ±1,59	<b>0,312</b> ±0,033	<b>30,29</b> ±1,11	<b>0,331</b> ±0,026	<b>35,19</b> ±0,81	<b>0,347</b> ±0,029	<b>38,79</b> ±1,79	<b>0,505</b> ±0,031	<b>34,76</b> ±1,38	<b>0,388</b> ±0,020
<b>ω-6</b>	<b>4,77</b> ±0,37	<b>0,064</b> ±0,005	<b>5,14</b> ±0,23	<b>0,056</b> ±0,003	<b>6,15</b> ±0,11	<b>0,061</b> ±0,004	<b>6,93</b> ±0,71	<b>0,090</b> ±0,010	<b>6,78</b> ±0,47	<b>0,075</b> ±0,001
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>4,89</b> ±0,33		<b>5,90</b> ±0,22		<b>5,72</b> ±0,09		<b>5,62</b> ±0,33		<b>5,14</b> ±0,22	<b>5,137</b> ±0,223
<b>EPA : ARA</b>	<b>5,19</b> ±1,64		<b>4,32</b> ±1,33		<b>3,24</b> ±1,33		<b>4,66</b> ±0,38		<b>4,86</b> ±1,10	
<b>DHA : EPA</b>	<b>17,25</b> ±7,73		<b>13,20</b> ±3,42		<b>19,92</b> ±1,07		<b>18,47</b> ±0,57		<b>19,65</b> ±0,55	



### **Capítulo 3.**

---

#### **Cultivo semicontinuo de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) con intensidad luminosa moderada**



## **Introducción**

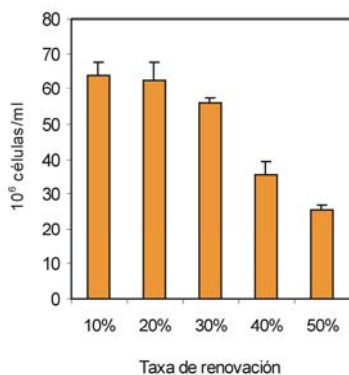
No capítulo anterior observouse que o cultivo semicontinuo produce unha gran variabilidade na composición bioquímica de T-ISO dependente da taxa de renovación. Os resultados máis destacados son un incremento do contido proteico e da porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados en condicións de saturación por nitróxeno e unha marcada redución do contido de glúcidos, modificacións que deberían dar lugar a un incremento no valor nutritivo da microalga. Polo contrario os cambios ocasionados pola taxa de renovación no perfil de ácidos graxos de T-ISO non foron moi marcados. Dado que os ácidos graxos poliinsaturados se atopan fundamentalmente formando parte das membranas celulares, especialmente das membranas tilacoidais, repetiuse o experimento de cultivo semicontinuo de T-ISO empregando unha intensidade luminosa menor para estimular o aumento da superficie fotosintética nas células.

## **Deseño experimental**

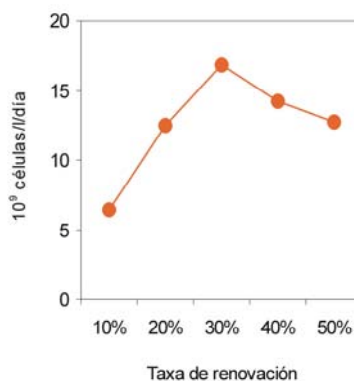
*Isochrysis* aff. *galbana* (clon T-ISO, CCMP 1324) cultivouse en biorreactores tubulares con 80 ml de cultivo. O medio de cultivo preparouse segundo o descrito no apartado Materiais e métodos, cunha concentración de nitróxeno 4 mM. A iluminación seguiu un ciclo de 12 h de luz: 12 h de escuridade e a intensidade luminosa foi 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . Os cultivos unialgais iniciáronse cunha densidade de  $7,2 \times 10^6$  células/ml e unha vez acadada a fase estacionaria iniciouse o réxime semicontinuo con taxas de renovación do 10%, 20%, 30%, 40% ou 50% diariamente. Recolléronse mostras dos cultivos en estado de equilibrio para análises da composición bioquímica da microalga, e o resto da biomasa retirada diariamente empregouse para o cultivo de rotíferos (Capítulo 6). Debido á cantidade de células microalgais necesarias para a alimentación dos rotíferos e a duración do experimento de crecemento, o número de réplicas dos cultivos oscilou entre 9 e 16, segundo a taxa de renovación.

## Resultados e discusión

A densidade celular na fase estacionaria foi de  $61,25 \pm 7,92 \times 10^6$  células/ml, estatisticamente igual á obtida nos cultivos de T-ISO sometidos a unha intensidade luminosa de  $162 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Capítulo 2). As densidades celulares na fase de estabilización descendieron coa taxa de renovación (Figura 1; Táboa 2), e igual que aconteceu no capítulo 2 o test U de Mann-Whitney non detectou diferencias significativas entre as taxas de renovación do 10% e do 20% non foron significativas, e tampouco as houbo entre as densidades das taxas de renovación do 20% e do 30%, que foi estrañamente alta  $56,13 \pm 1,01 \times 10^6$ . Os valores obtidos foron algo menores que os dos cultivos de T-ISO con  $162 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , pero as diferencias entre as dúas condicións de iluminación soamente foron significativas na taxa de renovación do 40% ( $p=0,039$ ). Os valores de produtividade tamén foron menores, cun valor mínimo de  $6,37 \times 10^9$  células/l/día na taxa de renovación do 10% e un máximo de  $16,84 \times 10^9$  células/l/día na taxa de renovación do 30% (Figura 2; Táboa 2). Recolléronse mostras para determinar peso seco, pero algúns dos datos obtidos foron anormalmente baixos. Debido a isto o peso seco da microalga non se incluíu nos resultados nin tampouco se fixeron cálculos respecto del, polo que non hai datos da produtividade dos cultivos expresados como mg de peso seco por litro e día.

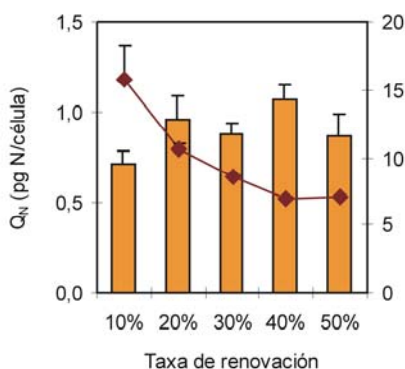


**Figura 1.** Densidade celular de *Isochrysis* aff. *galbana* T-ISO cultivada en réxime semicontínuo cunha intensidade luminosa de  $97 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

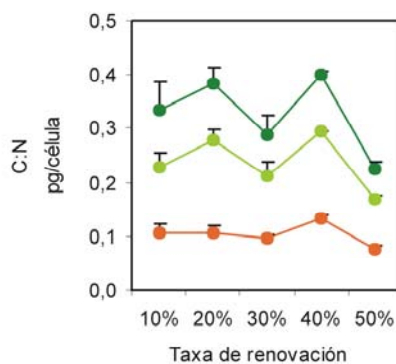


**Figura 2.** Produtividade de T-ISO en réxime semicontínuo cunha intensidade luminosa de  $97 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

A evolución de  $Q_N$ , que aumentou de 0,718 a 1,071 pg/célula, indica que o nitróxeno deixou de ser limitante na taxa de renovación do 40%, igual que aconteceu con T-ISO cultivada cunha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . A relación C:N tamén se estabilizou na taxa de renovación do 40%, pero neste caso os valores de C:N foron máis baixos que os obtidos no capítulo 2, e en condicións de saturación por nitróxeno diminuíron ata alcanzar un valor de 7 (Figura 3; Táboa 2). A diferenza foi debida principalmente ao incremento de  $Q_N$  nos cultivos iluminados con 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  respecto dos sometidos a 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , pois a menor densidade celular permitiu un mellor aproveitamento e unha maior acumulación de nitróxeno por célula. En canto a  $Q_C$ , en xeral os seus valores foron maiores nos cultivos sometidos a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Táboa 2). É posible que as células sometidas a 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  liberaran máis polisacáridos ao exterior, aparentando menor incorporación de carbono e menor produción de compostos carbonados.



**Figura 3.** Cota celular de nitróxeno ( $Q_N$ ) e relación C:N de T-ISO cultivada en réxime semicontinuo cunha intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .



**Figura 4.** Evolución do contido de pigmentos en T-ISO cultivada en réxime semicontinuo cunha intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . -●-, clorofila a; -●-, clorofilas totais; -●-, carotenoides totais.

O contido celular de clorofilas, tanto clorofila a como clorofilas totais, tamén presenta un valor máximo na taxa de renovación do 40% (Figura 4). Este comportamento da clorofila, incrementándose coa taxa de dilución, é característico dos cultivos limitados por nutrientes e coincide coa evolución da dispoñibilidade de nitróxeno no cultivo (Sukenik e Wahnou, 1991; Otero e

Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1997). Os carotenoides tamén tenden a incrementarse coa taxa de dilución pero en menor medida que as clorofilas (Sukenik e Wahnnon, 1991; Saoudi-Helis *et al.*, 1994).

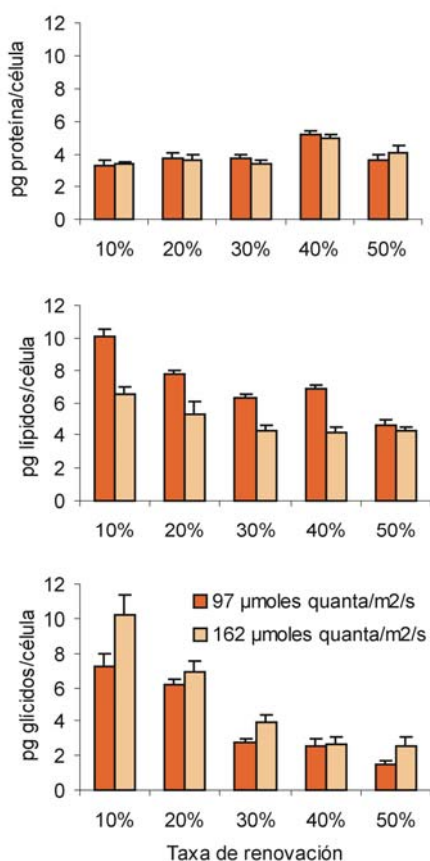
A composición bioquímica de T-ISO variou coa taxa de renovación igual que aconteceu no experimento anterior (Capítulo 2), pero producíronse diferencias entre os dous cultivos, resultado das distintas intensidades luminosas. O test de Mann-Whitney puxo de manifesto que as distintas intensidades luminosas non causaron diferencias significativas no contido de proteínas de T-ISO excepto na taxa de renovación do 30% ( $p=0,05$ ). Polo contrario, os contidos de lípidos e glúcidos foron significativamente diferentes para tódalas taxas de renovación coa excepción da taxa de renovación do 50% nos lípidos e a do 40% nos glúcidos (Táboa 1).

**Táboa 1.** Valores de p (test U de Mann-Whitney) do efecto da intensidade luminosa sobre o contido celular de proteínas, lípidos e glúcidos de T-ISO en función da taxa de renovación.

	Taxa de renovación				
	10%	20%	30%	40%	50%
<b>Proteínas</b>	0,827	0,513	0,050	0,127	0,268
<b>Lípidos</b>	0,050	0,050	0,050	0,050	0,127
<b>Glúcidos</b>	0,050	0,050	0,050	0,827	0,050

O contido de proteína evolucionou da mesma maneira en ambos cultivos, coincidindo co comportamento de  $Q_N$ , e rexistrou valores practicamente iguais nas dúas condicións lumínicas, cun mínimo de 3,38 pg/célula na taxa de renovación do 10% e un máximo de 5,22 pg/célula na taxa de renovación do 40%, nos cultivos iluminados con 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Figura 5; Táboa 2). En cultivos batch obtívose un contido proteico notablemente maior cando T-ISO se cultivou con intensidades luminosas baixas, de 35  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Nelson *et al.*, 1992), pero en turbidostato non se rexistraron diferencias no contido proteico en función da intensidade luminosa (Sukenik e Wahnnon, 1991).

A evolución dos glúcidos tamén foi a mesma, producíndose un descenso coa taxa de renovación. O contido de glúcidos foi sen embargo menor nos cultivos sometidos a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , e descendeu coa taxa de renovación de 7,26 a 1,51  $\text{pg/célula}$  (Figura 5; Táboa 2). No tocante aos lípidos, constituíron a fracción maioritaria en tódalas taxas de renovación nos cultivos sometidos a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , e tamén experimentaron un descenso a medida que aumentou a taxa de renovación, pasando de 10,09 a 4,65  $\text{pg/célula}$ . Nos cultivos que recibiron unha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  o contido de lípidos foi menor en tódalas taxas de renovación, e produciuse un descenso ata a taxa de renovación do 30%, a partires da cal o contido lipídico se estabilizou (Figura 5; Táboa 2).



**Figura 5.** Evolución do contido de proteínas, lípidos e glúcidos en T-ISO cultivada con dúas intensidades luminosas diferentes.

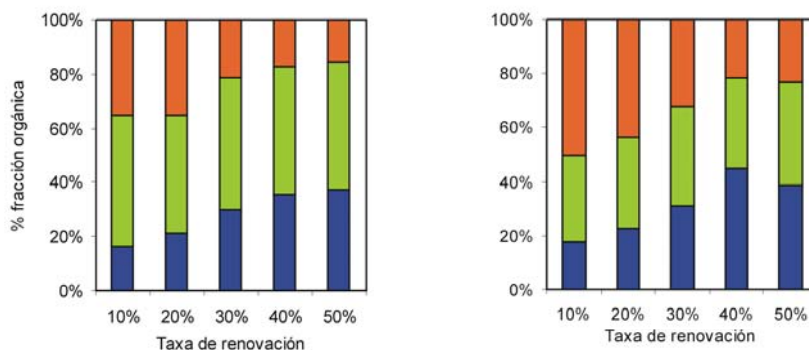
A redución da dispoñibilidade de luz dá lugar a resultados similares en cultivos batch de T-ISO e C-ISO, cepa orixinaria do Caribe (Wikfors e Patterson, 1994), que sometidas a 35  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  presentan maior contido de lípidos que de glúcidos en todo o ciclo de crecemento, mentres que unha intensidade luminosa de 250  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  reduce o contido de lípidos na transición da fase expoñencial á estacionaria e na propia fase estacionaria (Nelson *et al.*, 1992). En turbidostato tamén houbo unha resposta positiva da síntese de glúcidos ante o aumento da intensidade luminosa, acompañada do descenso do contido lipídico (Sukenik e Wahnnon, 1991). Á vista destes resultados e dos nosos propios datos, semella que as especies do xénero *Isochrysis* reaccionan ante a baixa dispoñibilidade de luz reducindo a síntese de glúcidos en beneficio dunha maior acumulación de lípidos. O contido de lípidos ou de ácidos graxos non está necesariamente correlacionada coa actividade da acetil CoA carboxilasa e coa síntese lipídica en T-ISO. En quimiostato, ambas mostran unha resposta positiva fronte ao incremento da taxa de crecemento, aínda que o contido lipídico descende nestas condicións. En turbidostato, increméntanse en resposta á intensidade luminosa ata un valor máximo a partir do cal descendén, mentres que o contido lipídico a penas varía dentro dun amplo rango de intensidades luminosas (Sukenik e Livne, 1991).

Nos traballos citados, as microalgas foron cultivadas con aireación pero sen suplementación de  $\text{CO}_2$ . Probablemente un aporte extra de  $\text{CO}_2$  daría lugar a maiores contidos de glúcidos nas células cultivadas con intensidades luminosas elevadas, tal e como se viu no Capítulo 1. En cultivos discontinuos non aireados, moitas veces un incremento na intensidade luminosa produce unicamente pequenos incrementos ou mesmo descensos dos lípidos e glúcidos celulares, probablemente polo déficit de  $\text{CO}_2$  debido á ausencia de aireación (Brown *et al.*, 1993a).

Como consecuencia destas modificacións na composición bioquímica tamén se rexistraron diferencias nas porcentaxes de proteínas, glúcidos e lípidos na fracción orgánica de T-ISO en función da intensidade luminosa. A porcentaxe proteica incrementouse nos dous casos ata a taxa de renovación do 40%, pero o valor máximo foi lixeiramente maior nos cultivos sometidos a 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , un 42% fronte a un 36%. A porcentaxe de glúcidos descendeu coa



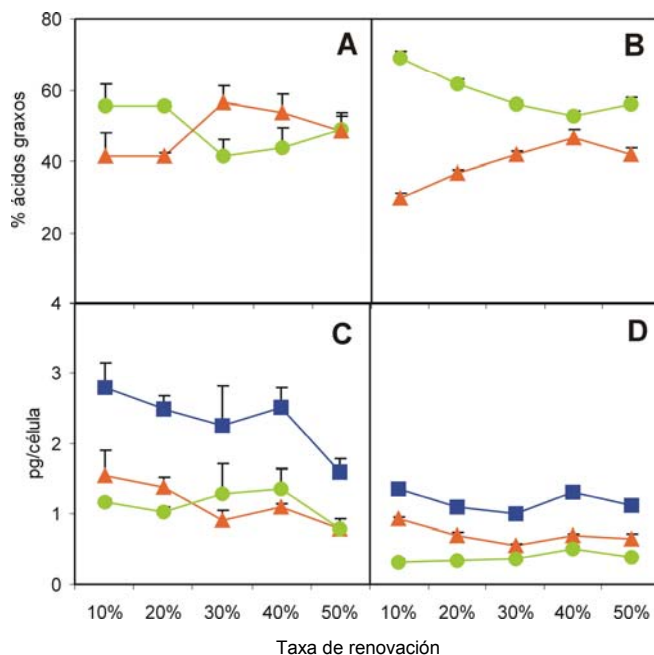
taxa de renovación e foi moito menor nas células cultivadas con 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , cun máximo do 35% e un mínimo do 15%. A fracción lipídica foi a maioritaria nos cultivos de T-ISO sometidos a unha menor radiación lumínica e non sufriu grandes variacións coa taxa de renovación, oscilando entre un 43% e un 49% da fracción orgánica. Nos cultivos sometidos a 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  a porcentaxe de lípidos tampouco variou de forma importante coa taxa de renovación pero os valores que alcanzou foron máis baixos (Figura 6; Táboa 2).



**Figura 6.** Comparación das porcentaxes de proteínas, lípidos e glúcidos na fracción orgánica de T-ISO cultivada con dúas intensidades luminosas diferentes. Esquerda, 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ ; dereita, 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . ■ proteínas; ■ lípidos; ■ glúcidos.

O perfil de ácidos graxos de *Isochrysis galbana* var. T-ISO viuse intensamente afectado pola intensidade luminosa. As células cultivadas cunha radiación de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  contiñan o dobre de ácidos graxos que as cultivadas con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  en tódalas taxas de renovación excepto na do 50%, na que a cantidade de ácidos graxos non chegou a duplicarse. O maior contido debeuse sobre todo aos ácidos graxos poliinsaturados, compoñentes típicos dos lípidos de membrana, suxerindo un incremento da superficie tilacoidal para mellorar a captación de luz. O aumento dos saturados e monoinsaturados foi menor. Estes resultados concordan cos obtidos por Tzovenis *et al.* (2003b), que atopou que en cultivos batch de T-ISO sometidos a ciclos de 12 h luz: 12 h escuridade, intensidades luminosas baixas xeneraban os maiores contidos de ácidos graxos na fase expoñencial. A cantidade de ácidos graxos variou da mesma maneira que os lípidos, descendendo coa taxa de renovación pero experimentando un incremento na taxa de renovación do 40%. En contido

celular, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados descendieron coa taxa de renovación, pasando de 1,54 a 0,77 pg/célula. Os poliinsaturados alcanzaron un valor máximo de 1,35 pg/célula na taxa de renovación do 30%, e o seu valor mínimo foi 0,77 pg/célula na taxa de renovación do 50% (Figura 7; Táboa 3).



**Figura 7.** Evolución dos ácidos graxos totais (-■-), saturados+monoinsaturados (-▲-) e poliinsaturados (-●-) de T-ISO cultivada con dúas intensidades luminosas distintas. A, porcentaxes, 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ ; B, porcentaxes, 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ ; C, pg/célula, 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ ; D, pg/célula, 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

A suma das porcentaxes de ácidos graxos saturados e monoinsaturados mantívose estable nas taxas de renovación do 10% e 20% e experimentou un marcado descenso na taxa de renovación do 30%, pasando de representar un 55% a un 41% dos ácidos graxos totais, e recuperouse nas taxas de renovación superiores chegando ata o 48%. Inversamente, os ácidos graxos poliinsaturados incrementáronse na taxa de renovación do 30% ata o 56% do total de ácidos graxos e descendieron ata o 48% nas taxas de renovación máis altas. Este comportamento contrasta co acontecido nos cultivos sometidos a 162  $\mu\text{moles}$

quanta/m<sup>2</sup>/s, nos que as porcentaxes de ácidos graxos saturados e monoinsaturados descendían de forma case lineal ata a taxa de renovación do 40%, incrementándose novamente na taxa de renovación do 50%. Ademais, a porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados non foi en ningún caso superior á suma dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, mentres que nos cultivos sometidos a 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s os ácidos graxos poliinsaturados superaron notablemente a porcentaxe de saturados e monoinsaturados nas taxas de renovación do 30% e 40% (Figura 7; Táboa 3).

Os ácidos graxos 14:0, 16:0, 16:1 $\omega$ -7, 18:1 $\omega$ -9, 18:2 $\omega$ -6, 18:3 $\omega$ -3, 18:4 $\omega$ -3 e 22:6 $\omega$ -3 (DHA) son os máis abundantes en T-ISO, pero o cultivo cunha intensidade luminosa de 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s provocou cambios nas súas proporcións respecto dos cultivos de T-ISO sometidos a 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s. As porcentaxes de 14:0 e 16:0 foron sensiblemente menores que nas células cultivadas con 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s. 14:0 non seguiu ningunha tendencia clara, oscilando entre o 8,58% e o 13,47%; o contido celular mantívose entre 0,193 e 0,324 pg/célula. O 16:0 descendeu desde o 13,57% e 0,392 pg/célula na taxa de renovación do 10% ata o 8,95% e 0,195 pg/célula na taxa de renovación do 30%, aumentando nas taxas de renovación superiores (Táboa 3).

O 16:1 $\omega$ -7, o 18:1 $\omega$ -9 e o 18:2 $\omega$ -6 mantiveron evolucións e porcentaxes similares nas dúas condicións de iluminación, aínda que os seus respectivos contidos celulares nos cultivos sometidos a 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s aumentaron como consecuencia do incremento do contido total de ácidos graxos. Os ácidos graxos poliinsaturados máis importantes, 18:3 $\omega$ -3, 18:4 $\omega$ -3 e 22:6 $\omega$ -3, presentaron porcentaxes máis elevadas nos cultivos sometidos a 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s, e contidos celulares tamén maiores, que chegaron a triplicarse nalgúns casos. O 18:4 $\omega$ -3 foi o ácido graxo  $\omega$ -3 máis abundante e alcanzou a súa porcentaxe e contido celular máximos na taxa de renovación do 30%, cun 25,04% e 0,583 pg/célula respectivamente. A porcentaxe de DHA foi maior nos cultivos sometidos a 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s pero non experimentou grandes variacións coa taxa de renovación. A porcentaxe e o contido celular máximos alcanzáronse na taxa de renovación do 40% con 15,04% e 0,381 pg/célula, o triple do contido máximo de DHA das células cultivadas con 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s. As taxas de renovación do 10% e 20% tamén rexistraron contidos de DHA superiores aos

0,300 pg/célula, debido á elevada cantidade de ácidos graxos totais e ás porcentaxes de DHA relativamente altas desas células (Táboa 3).

En cultivos batch o DHA presenta correlación positiva coa intensidade luminosa independentemente da fase de crecemento do cultivo e de se a iluminación é continua ou non (Brown *et al.*, 1993a; Tzovenis *et al.*, 1997, 2003b). Sukenik e Wahnon (1991) tamén observaron en turbidostatos un incremento da porcentaxe de DHA en resposta a un incremento da intensidade luminosa no rango de 30 a 300  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . Nos cultivos semicontínuos aconteceu o fenómeno contrario. Unha posible hipótese para a resposta positiva do DHA fronte a incrementos na intensidade luminosa é a súa síntese e acumulación en triacilglicerois en condicións enerxeticamente favorables (Tzovenis *et al.*, 1997, 2003b), xa que unha parte relativamente importante do DHA en T-ISO atópase nos triacilglicéridos (Sukenik e Wahnon, 1991). Esta hipótese podería ser válida para explicar o aumento do DHA en cultivos en quimiostato con baixa densidade celular sometidos a intensidades luminosas elevadas (Sukenik e Wahnon, 1991), pero os cultivos de Tzovenis *et al.*, de 4 l de volume, posiblemente estiveran limitados por luz e reaccionaran ao incremento da intensidade luminosa cun aumento da síntese de ácidos graxos, entre eles DHA. De acordo cos nosos resultados, a proporción de ácidos graxos poliinsaturados en T-ISO increméntase en resposta a un descenso da intensidade luminosa sempre que non se alcancen condicións limitantes, tal como sinalan outros autores (Carvalho e Malcata, 2005).

En condicións de limitación por nutrientes, o incremento da taxa de dilución fai aumentar o contido de ácidos graxos poliinsaturados tanto en quimiostato como en cultivos semicontínuos, e cando a concentración de nutrientes alcanza o nivel de saturación o contido de ácidos graxos poliinsaturados volve a diminuír (Sukenik e Wahnon, 1991; Sukenik *et al.*, 1993; Saoudi-Helis *et al.*, 1994; Otero e Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1997b). En estudos sobre cultivos en quimiostato de *Isochrysis galbana*, Fernández Sevilla *et al.* (1998) concluíron que o contido celular dos ácidos graxos poliinsaturados non depende da radiación incidente ou da intensidade luminosa media no interior do cultivo, senón da taxa de crecemento. Este tipo de experimentos dirixidos á maximización da produtividade de ácidos graxos  $\omega$ -3, especialmente EPA, empregan elevadas concentracións de nitróxeno. Probablemente estes cultivos microalgais están

saturados por nutrientes en todas ou case tódalas condicións de dilución e iluminación probadas, a diferencia dos nosos cultivos semicontínuos, limitados por nutrientes ata a taxa de renovación do 40% como indica a evolución de  $Q_N$  e C:N. En consecuencia, no cultivo semicontinuo as condicións de iluminación influíron de xeito decisivo no perfil de ácidos graxos de T-ISO en tódalas taxas de renovación, incluídas as do 40% e 50%, non limitadas por luz nin por nutrientes. A taxa de renovación determinou a evolución dos ácidos graxos, pero a intensidade luminosa modificou as porcentaxes e o contido celular de cada un deles.

As variacións na composición bioquímica causadas polas diferentes taxas de renovación en T-ISO foron notablemente distintas en función da intensidade luminosa empregada. Podería pensarse que a diferencia na intensidade luminosa á que foron expostos os cultivos fixo variar a forma de aproveitamento da radiación incidente. As células sometidas a unha intensidade luminosa elevada almacenaron gran parte do carbono fixado durante a fotosíntese en forma de glúcidos, e probablemente tamén se produciu a síntese de elevadas cantidades de exopolisacáridos. En cambio, cunha intensidade luminosa menor as células derivaron o carbono fixado á síntese de lípidos preferentemente, e polo tanto o contido celular de glúcidos diminuíu respecto aos cultivos que recibiron a iluminación máis alta. Á vista destes resultados semella que T-ISO e, de acordo coa literatura revisada probablemente tamén outras especies do xénero *Isochrysis*, reacciona fronte á baixa dispoñibilidade de luz reducindo a síntese de glúcidos en beneficio dunha maior acumulación de lípidos. A menor intensidade luminosa fixo variar, ademais do contido lipídico, o perfil de ácidos graxos, e a porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados foi maior nos cultivos sometidos a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  en tódalas taxas de renovación. En cambio, non se rexistraron diferencias significativas nos valores de proteína nin de produtividade. A intensidade luminosa, xunto coa taxa de renovación, constitúe un parámetro de cultivo capaz de producir grandes modificacións na composición bioquímica de T-ISO en réxime semicontinuo e podería resultar moi útil de cara á produción dunha microalga cun perfil bioquímico determinado.

**Táboa 2.** Composición de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en réxime semicontinuo cunha concentración de nitróxeno 4 mM e intensidade luminosa de 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s.

	Taxa de renovación				
	10 %	20 %	30 %	40 %	50%
<b>Densidade celular</b>	63,69	62,49	56,13	35,46	25,45
<b>(10<sup>6</sup> cél/ml<math>\pm</math>std)</b>	$\pm 3,81$	$\pm 5,18$	$\pm 1,01$	$\pm 3,71$	$\pm 1,56$
<b>Produtividade</b>	6,37	12,50	16,84	14,18	12,73
<b>(10<sup>9</sup> células/l/día)</b>					
<b>Proteína (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	3,38 $\pm$ 0,25	3,82 $\pm$ 0,32	3,80 $\pm$ 0,15	5,22 $\pm$ 0,22	3,66 $\pm$ 0,29
<b>Lípidos (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	10,09 $\pm$ 0,41	7,70 $\pm$ 0,27	6,24 $\pm$ 0,29	6,81 $\pm$ 0,21	4,65 $\pm$ 0,25
<b>Glúcidos (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	7,26 $\pm$ 0,75	6,21 $\pm$ 0,31	2,71 $\pm$ 0,29	2,51 $\pm$ 0,43	1,51 $\pm$ 0,16
<b>Total prot+líp+glúc (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	20,73 $\pm$ 1,04	17,72 $\pm$ 0,34	12,73 $\pm$ 0,44	14,54 $\pm$ 0,49	9,82 $\pm$ 0,68
<b>Valor calórico (10<sup>-7</sup> J/cél)</b>	6,04	5,02	3,84	4,37	2,98
<b>% proteína na F. O.</b>	16,30	21,53	29,78	35,90	37,31
<b>% lípidos na F. O.</b>	48,68	43,46	48,95	46,82	47,33
<b>% glúcidos na F. O.</b>	35,02	35,01	21,27	17,28	15,36
<b>Q<sub>N</sub> (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	0,72 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,13	0,87 $\pm$ 0,06	1,07 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,12
<b>Q<sub>C</sub> (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	9,78 $\pm$ 1,07	8,73 $\pm$ 1,16	6,49 $\pm$ 0,49	6,41 $\pm$ 0,60	5,22 $\pm$ 0,75
<b>Relación C:N (átomos)</b>	15,8	10,6	8,6	7,0	7,0

**Táboa 3.** Composición de ácidos graxos de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en réxime semicontínuo cunha concentración de nitróxeno 4 mM e intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta}/\text{m}^2/\text{s}$ , expresada en porcentaxes sobre o total de ácidos graxos e pg/célula.

Ácidos graxos	Taxa de renovación									
	10%		20%		30%		40%		50%	
	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél
<b>14:0</b>	<b>8,58</b>	<b>0,261</b>	<b>12,92</b>	<b>0,324</b>	<b>8,63</b>	<b>0,193</b>	<b>11,05</b>	<b>0,273</b>	<b>13,47</b>	<b>0,210</b>
	±2,15	±0,118	±3,22	±0,103	±0,49	±0,045	±2,51	±0,037	±3,25	±0,031
<b>16:0</b>	<b>13,57</b>	<b>0,392</b>	<b>15,02</b>	<b>0,371</b>	<b>8,95</b>	<b>0,195</b>	<b>10,16</b>	<b>0,252</b>	<b>12,61</b>	<b>0,197</b>
	±2,69	±0,134	±0,81	±0,013	±1,62	±0,012	±1,86	±0,022	±2,70	±0,021
<b>16:1 (ω-9)</b>	<b>0,85</b>	<b>0,025</b>	<b>1,39</b>	<b>0,034</b>	<b>0,96</b>	<b>0,021</b>	<b>1,73</b>	<b>0,043</b>	<b>0,88</b>	<b>0,013</b>
	±1,29	±0,038	±1,04	±0,026	±0,90	±0,018	±0,23	±0,004	±0,79	±0,012
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>5,12</b>	<b>0,142</b>	<b>5,09</b>	<b>0,125</b>	<b>4,33</b>	<b>0,094</b>	<b>3,56</b>	<b>0,088</b>	<b>4,27</b>	<b>0,068</b>
	±1,28	±0,046	±0,91	±0,019	±0,97	±0,014	±0,91	±0,015	±0,89	±0,015
<b>16:2 (ω-6)</b>	<b>0,31</b>	<b>0,011</b>	<b>0,39</b>	<b>0,010</b>	<b>0,47</b>	<b>0,010</b>	<b>0,53</b>	<b>0,013</b>	<b>0,51</b>	<b>0,008</b>
	±0,13	±0,005	±0,07	±0,001	±0,09	±0,001	±0,13	±0,002	±0,09	±0,002
<b>16:2 (ω-4)</b>	<b>0,77</b>	<b>0,021</b>	<b>0,51</b>	<b>0,013</b>	<b>0,42</b>	<b>0,009</b>	<b>0,56</b>	<b>0,014</b>	<b>0,53</b>	<b>0,008</b>
	±0,23	±0,008	±0,05	±0,000	±0,01	±0,002	±0,11	±0,002	±0,05	±0,001
<b>18:0</b>	<b>2,44</b>	<b>0,037</b>	<b>1,13</b>	<b>0,028</b>	<b>1,19</b>	<b>0,026</b>	<b>1,31</b>	<b>0,033</b>	<b>1,89</b>	<b>0,029</b>
	±1,49	±0,010	±0,17	±0,003	±0,29	±0,001	±0,30	±0,011	±0,47	±0,004
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>21,75</b>	<b>0,603</b>	<b>16,98</b>	<b>0,420</b>	<b>15,68</b>	<b>0,346</b>	<b>12,78</b>	<b>0,322</b>	<b>14,21</b>	<b>0,228</b>
	±2,30	±0,110	±0,49	±0,024	±1,72	±0,050	±0,48	±0,045	±2,20	±0,060
<b>18:1 (ω-7)</b>	<b>1,46</b>	<b>0,038</b>	<b>0,88</b>	<b>0,022</b>	<b>1,04</b>	<b>0,024</b>	<b>0,96</b>	<b>0,024</b>	<b>0,89</b>	<b>0,014</b>
	±0,45	±0,010	±0,06	±0,001	±0,19	±0,010	±0,08	±0,005	±0,22	±0,005
<b>18:2 (ω-6)</b>	<b>5,24</b>	<b>0,142</b>	<b>4,17</b>	<b>0,102</b>	<b>6,61</b>	<b>0,146</b>	<b>5,71</b>	<b>0,144</b>	<b>4,06</b>	<b>0,065</b>
	±1,14	±0,023	±0,57	±0,006	±0,62	±0,022	±0,61	±0,027	±0,72	±0,018
<b>18:3 (ω-6)</b>	<b>0,12</b>	<b>0,003</b>	<b>0,27</b>	<b>0,007</b>	<b>0,60</b>	<b>0,014</b>	<b>0,51</b>	<b>0,013</b>	<b>0,37</b>	<b>0,006</b>
	±0,01	±0,000	±0,04	±0,001	±0,07	±0,005	±0,05	±0,002	±0,05	±0,001
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>5,85</b>	<b>0,162</b>	<b>6,36</b>	<b>0,157</b>	<b>9,19</b>	<b>0,209</b>	<b>8,72</b>	<b>0,220</b>	<b>7,32</b>	<b>0,117</b>
	±0,99	±0,010	±0,50	±0,006	±0,57	±0,064	±0,77	±0,037	±0,81	±0,026
<b>18:4 (ω-3)</b>	<b>15,07</b>	<b>0,416</b>	<b>15,47</b>	<b>0,382</b>	<b>25,04</b>	<b>0,583</b>	<b>21,40</b>	<b>0,543</b>	<b>19,84</b>	<b>0,319</b>
	±3,25	±0,032	±1,36	±0,021	±5,53	±0,275	±3,58	±0,145	±3,43	±0,088
<b>20:0</b>	<b>0,25</b>	<b>0,009</b>	<b>0,83</b>	<b>0,021</b>	<b>0,03</b>	<b>0,001</b>	<b>0,30</b>	<b>0,008</b>	<b>0,25</b>	<b>0,003</b>
	±0,21	±0,001	±0,31	±0,008	±0,05	±0,001	±0,31	±0,009	±0,43	±0,006
<b>20:1 (ω-9)</b>	<b>0,27</b>	<b>0,001</b>	<b>0,30</b>	<b>0,007</b>	<b>0,08</b>	<b>0,002</b>	<b>1,43</b>	<b>0,034</b>	<b>0,11</b>	<b>0,002</b>
	±0,36	±0,001	±0,48	±0,012	±0,10	±0,002	±2,48	±0,059	±0,10	±0,002

<b>20:2 (ω-7)</b>	<b>0,20</b> ±0,14	<b>0,007</b> ±0,001	<b>0,14</b> ±0,04	<b>0,004</b> ±0,001	<b>0,35</b> ±0,23	<b>0,007</b> ±0,004	<b>0,03</b> ±0,03	<b>0,001</b> ±0,001	<b>0,23</b> ±0,29	<b>0,004</b> ±0,005
<b>20:3 (ω-6)</b>	<b>0,09</b> ±0,04	<b>0,003</b> ±0,001	<b>0,07</b> ±0,01	<b>0,002</b> ±0,000	<b>0,09</b> ±0,03	<b>0,002</b> ±0,001	<b>0,06</b> ±0,01	<b>0,001</b> ±0,000	<b>0,06</b> ±0,00	<b>0,001</b> ±0,000
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>0,10</b> ±0,05	<b>0,003</b> ±0,001	<b>0,09</b> ±0,01	<b>0,002</b> ±0,000	<b>0,14</b> ±0,03	<b>0,003</b> ±0,001	<b>0,12</b> ±0,02	<b>0,003</b> ±0,001	<b>0,10</b> ±0,01	<b>0,002</b> ±0,000
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>1,25</b> ±0,96	<b>0,033</b> ±0,020	<b>0,69</b> ±0,19	<b>0,017</b> ±0,005	<b>0,75</b> ±0,26	<b>0,017</b> ±0,007	<b>0,76</b> ±0,04	<b>0,019</b> ±0,002	<b>0,75</b> ±0,21	<b>0,012</b> ±0,004
<b>22:0</b>	<b>0,59</b> ±0,31	<b>0,017</b> ±0,007	<b>0,39</b> ±0,04	<b>0,010</b> ±0,001	<b>0,15</b> ±0,02	<b>0,003</b> ±0,000	<b>0,15</b> ±0,04	<b>0,004</b> ±0,002	<b>0,19</b> ±0,06	<b>0,003</b> ±0,001
<b>22:1 (n-9)</b>	<b>0,41</b> ±0,09	<b>0,012</b> ±0,001	<b>0,42</b> ±0,13	<b>0,010</b> ±0,004	<b>0,19</b> ±0,06	<b>0,004</b> ±0,002	<b>0,10</b> ±0,07	<b>0,003</b> ±0,002	<b>0,07</b> ±0,02	<b>0,001</b> ±0,000
<b>22:5 (ω-6)</b>	<b>2,98</b> ±0,30	<b>0,085</b> ±0,012	<b>3,29</b> ±0,28	<b>0,081</b> ±0,002	<b>2,42</b> ±0,35	<b>0,054</b> ±0,013	<b>3,02</b> ±0,27	<b>0,076</b> ±0,015	<b>2,89</b> ±0,33	<b>0,046</b> ±0,010
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>12,59</b> ±0,23	<b>0,363</b> ±0,059	<b>13,21</b> ±1,58	<b>0,329</b> ±0,061	<b>12,69</b> ±1,60	<b>0,284</b> ±0,068	<b>15,04</b> ±2,10	<b>0,381</b> ±0,091	<b>14,50</b> ±2,12	<b>0,229</b> ±0,036
<b>Total</b>		<b>2,787</b> ±0,367		<b>2,476</b> ±0,202		<b>2,248</b> ±0,558		<b>2,513</b> ±0,272		<b>1,587</b> ±0,188
<b>Saturados</b>	<b>25,43</b> ±5,89	<b>0,716</b> ±0,242	<b>30,29</b> ±2,22	<b>0,753</b> ±0,114	<b>18,95</b> ±2,20	<b>0,418</b> ±0,057	<b>22,98</b> ±3,85	<b>0,571</b> ±0,042	<b>28,42</b> ±6,64	<b>0,443</b> ±0,055
<b>Monosaturados</b>	<b>29,87</b> ±2,91	<b>0,821</b> ±0,159	<b>25,05</b> ±1,01	<b>0,619</b> ±0,026	<b>22,29</b> ±2,55	<b>0,492</b> ±0,064	<b>20,57</b> ±2,25	<b>0,514</b> ±0,042	<b>20,42</b> ±1,73	<b>0,326</b> ±0,064
<b>Poliinsaturados</b>	<b>41,57</b> ±6,42	<b>1,164</b> ±0,036	<b>41,37</b> ±1,06	<b>1,023</b> ±0,064	<b>56,34</b> ±4,82	<b>1,285</b> ±0,427	<b>53,42</b> ±5,61	<b>1,352</b> ±0,287	<b>48,27</b> ±4,58	<b>0,771</b> ±0,158
<b>Sat+Mono</b>	<b>55,30</b> ±6,38	<b>1,538</b> ±0,347	<b>55,34</b> ±1,27	<b>1,372</b> ±0,140	<b>41,24</b> ±4,67	<b>0,910</b> ±0,120	<b>43,55</b> ±5,81	<b>1,085</b> ±0,062	<b>48,85</b> ±4,92	<b>0,769</b> ±0,037
<b>ω-3</b>	<b>34,75</b> ±5,37	<b>0,975</b> ±0,016	<b>35,73</b> ±0,39	<b>0,884</b> ±0,068	<b>47,67</b> ±5,62	<b>1,093</b> ±0,399	<b>45,91</b> ±5,25	<b>1,163</b> ±0,261	<b>42,40</b> ±4,01	<b>0,677</b> ±0,136
<b>ω-6</b>	<b>6,05</b> ±1,36	<b>0,162</b> ±0,021	<b>5,13</b> ±0,68	<b>0,123</b> ±0,007	<b>8,25</b> ±0,86	<b>0,175</b> ±0,030	<b>6,96</b> ±0,63	<b>0,175</b> ±0,029	<b>5,34</b> ±1,02	<b>0,082</b> ±0,021
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>5,83</b> ±0,69		<b>7,04</b> ±0,82		<b>5,87</b> ±1,34		<b>6,60</b> ±0,56		<b>8,09</b> ±1,25	
<b>EPA : ARA</b>	<b>13,10</b> ±7,39		<b>7,39</b> ±2,54		<b>5,32</b> ±0,62		<b>6,34</b> ±1,28		<b>7,40</b> ±1,14	
<b>DHA : EPA</b>	<b>15,06</b> ±10,59		<b>20,74</b> ±8,60		<b>17,82</b> ±3,83		<b>20,02</b> ±3,62		<b>20,82</b> ±7,50	



## **Capítulo 4.**

---

### **Cultivo semicontinuo de *Nannochloropsis gadihana* con intensidad luminosa elevada**



## Introducción

As microalgas do xénero *Nannochloropsis* son das máis utilizadas en todo o mundo para a produción e o enriquecemento de rotíferos e apreciadas polo seu elevado contido de proteínas e EPA. Os sistemas de cultivo máis habituais de *Nannochloropsis* son sistemas discontinuos orientados que normalmente se colleitan ao inicio da fase estacionaria, pero estas condicións non son as máis apropiadas para obter os máximos contidos de EPA nin tampouco grandes produtividades. O cultivo semicontinuo en fotobiorreactores pode xerar grandes produtividades de biomasa de *Nannochloropsis* sp. rica en EPA (Fábregas *et al.*, 2004). Modificar a taxa de renovación nos cultivos de *Nannochloropsis gaditana* nos sistemas semicontínuos dá lugar a unha gran variabilidade bioquímica, pero o valor nutritivo das células microalgais obtidas aínda non foi comprobado en organismos filtradores.

## Deseño experimental

A microalga mariña *Nannochloropsis gaditana* CCMP 527 cultivouse en sistema semicontinuo en biorreactores tubulares con 80 ml de volume de cultivo cada un, con ciclo de luz:escuridade 12 h:12 h e unha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . Empregouse unha concentración de nutrientes equivalente a 4 mmoles/l de nitróxeno en forma de  $\text{KNO}_3$ , tal e como se especifica no capítulo de Materiais e métodos.

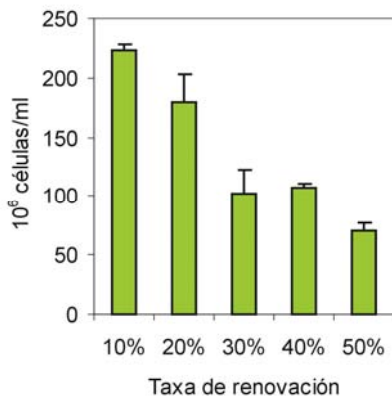
Os cultivos unialgais iniciáronse cunha densidade celular de  $31,75 \times 10^6$  células/ml e deixáronse medrar ata que entraron na fase estacionaria, ao cabo de seis días. Nese momento comezou o réxime semicontinuo con cinco taxas de renovación, retirando diariamente o 10%, 20%, 30%, 40% ou 50% do volume de cultivo. Os cultivos mantivéronse en estado de equilibrio uns quince días, durante os que se recolleron mostras de biomasa para realizar determinacións de peso seco e análises bioquímicas. O último día colleuse todo o volume de cultivo para proceder ao experimento de enriquecemento do rotífero (ver Capítulo 7). Para obter a cantidade de microalga necesaria para o experimento, cultiváronse tres réplicas das taxas de renovación do 10 % e 20 %, catro réplicas da taxa de

renovación do 30%, cinco da taxa de renovación do 50 % e seis réplicas da taxa de renovación do 50%.

## **Resultados e discusión**

A densidade celular media na fase estacionaria foi de  $187,6 \pm 7,6 \times 10^6$  células/ml. No sistema semicontinuo, a densidade de estabilización descende ao incrementarse a taxa de renovación, pero nesta ocasión a densidade celular na taxa de renovación do 30% foi lixeiramente menor que na taxa do 40% (Figura 1), non habendo diferencias significativas entre as dúas. As densidades celulares de estabilización son lixeiramente máis altas que as obtidas en experimentos anteriores con *Nannochloropsis gaditana* empregando o mesmo sistema de cultivo e o medio nutritivo de Fábregas *et al.* (1984) (Maseda, 2002). A densidade celular obtida na taxa de renovación do 10%,  $223,27 \pm 4,15 \times 10^6$  células/ml, foi maior que a alcanzada na fase estacionaria, a pesares da dilución diaria á que foron sometidos os cultivos. *Nannochloropsis* produce substancias inhibitoras que poden deter o crecemento unha vez que se alcanzan concentracións celulares de 6-7 g de peso seco/l (Richmond e Zou, 1999). Rodolfi *et al.* (1993) observaron que a densidade celular non aumentaba aínda que se engadiran novos nutrientes ao medio, pero a dilución diaria dos cultivos semicontínuos puido eliminar parte desas substancias inhibitoras e permitir o aproveitamento dos nutrientes engadidos na renovación. A pesar destas evidencias, non se pode descartar que o medio de cultivo utilizado por nós sexa deficiente nalgún oligoelemento, pois os cultivos batch en fase estacionaria de *N. gaditana* experimentaron un novo crecemento cando se lles engadiron os oligoelementos do Optimal *Haematococcus* Medium (OHM) de Fábregas *et al.* (2000) (Maseda, 2002). A densidade celular obtida na taxa de renovación do 40%,  $108,17 \pm 2,84 \times 10^6$  células/ml, foi superior á obtida nun fotobiorreactor plano de 5 cm de paso de luz e iluminado con  $267 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , probablemente limitado por luz (Fábregas *et al.*, 2002). En cambio, intensidades luminosas de  $220 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  permiten obter densidades lixeiramente superiores ás nosas empregando os mesmos fotobiorreactores tubulares e unha concentración de nitróxeno 2 mM (Fábregas *et al.*, 2004). A pesar de que a concentración de nutrientes é máis baixa, a maior intensidade

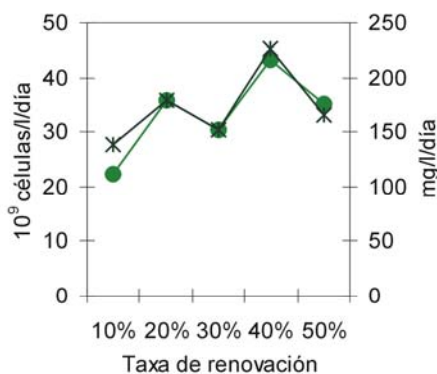
luminosa permite un mellor aproveitamento dos nutrientes de maneira que a densidade celular se mantén elevada.



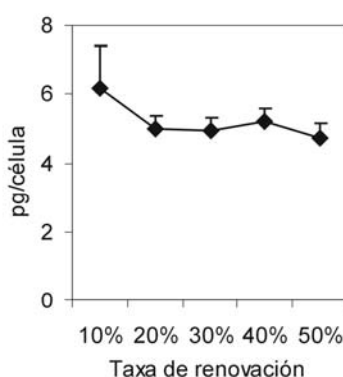
**Figura 1.** Densidades celulares de estabilización de *Nannochloropsis gaditana* en cultivo semicontinuo.

En cultivos continuos moi limitados por nutrientes as densidades celulares son moito máis baixas. En cultivos de *Nannochloropsis* sp. realizados en quimiostato cunha concentración de NaNO<sub>3</sub> 250 μM e nutrientes f/2 a densidade celular alcanzada cunha taxa de dilución de 0,20/día, equivalente a unha taxa de renovación en cultivo semicontinuo do 10 %, foi de  $15 \times 10^6$  células/ml, mentres que cunha taxa de dilución de 0,92/día –equivalente a unha taxa de dilución do 50%- a densidade celular foi  $8 \times 10^6$  células/ml (Sukenik *et al.*, 1993).

A densidade celular inusualmente baixa na taxa de renovación do 30% modificou a evolución característica da produtividade nos sistemas semicontínuos con varias taxas de renovación, polo que a forma parabólica habitual se viu alterada por un descenso da produtividade na taxa de renovación do 30% (Figura 2). A máxima produtividade, tanto en número de células como en peso, obtívese coa taxa de renovación do 40 % ( $43,27 \times 10^9$  células/l/día e 226 mg/l/día respectivamente). A taxa de renovación do 10% xerou a produtividade máis baixa ( $22,33 \times 10^9$  células/l/día e 138 mg/l/día). O peso seco das células diminuíu desde a taxa de renovación do 10% ata a do 20%, pasando de 6,19 a 4,98 pg/célula. A partir da taxa de renovación do 20% o peso seco celular foi bastante semellante en tódalas taxas de renovación (Figura 3).



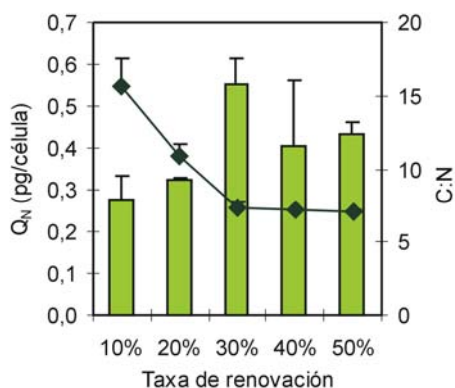
**Figura 2.** Productividade do cultivo semicontinuo de *Nannochloropsis gaditana* en fase de estabilización. -●- células/l/día; -\*- mg/l/día



**Figura 3.** Peso seco (pg/célula) de *Nannochloropsis gaditana* en cultivo semicontinuo.

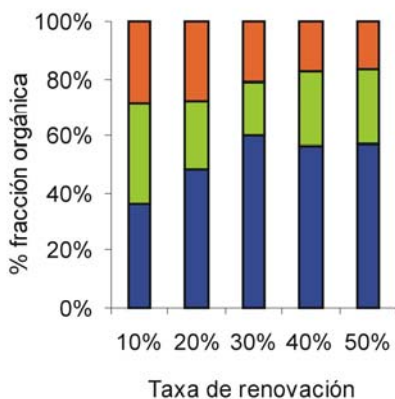
O valor máximo de produtividade referido a peso seco é similar aos obtidos en sistemas semicontínuos tanto con *Nannochloropsis* como con outras microalgas. *Nannochloropsis* sp. xenera unha produtividade de 285,06 mg/l/día en fotobiorreactores tubulares sometidos a unha intensidade de luz de 80  $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$ , concentración de nitróxeno 2 mM e taxa de renovación do 40%. Neste mesmo sistema a produtividade en peso incrementouse cando se utilizaron intensidades luminosas maiores, xa que intensidades de luz elevadas provocan que as células acumulen grandes cantidades de lípidos e glúcidos (Fábregas *et al.*, 2004). En cultivos de *Dunaliella tertiolecta* cunha concentración de nitróxeno 4 mM as taxas de renovación do 20 % e 30 % dan as produtividades máis altas, que se sitúan arredor de 220 mg/l/día (Fábregas *et al.*, 1995). Comparando cultivos semicontínuos con varias taxas de renovación obsérvase que as máximas produtividades se obteñen nas taxas de renovación intermedias, independentemente da especie de microalga (Fábregas *et al.*, 1995; Otero *et al.*, 1995). Aínda que a densidade celular nun cultivo semicontinuo descende ao incrementarse a taxa de renovación, a produtividade segue unha distribución parabólica xa que depende, ademais da densidade celular, do volume retirado por litro de cultivo en cada taxa de renovación. Así, a densidade celular inusualmente baixa da taxa de renovación do 30 % provocou unha alteración no comportamento da produtividade, co resultado dun valor inferior ao agardado.

A cota celular de nitróxeno,  $Q_N$ , incrementouse coa taxa de renovación nos cultivos que experimentaron limitación por nitróxeno, descendendo nas taxas de renovación superiores. A mesma tendencia obsérvase en cultivos continuos cando a taxa de dilución aumenta (Laws and Wong, 1978; Laws and Bannister, 1980). Neste tipo de sistemas  $Q_N$  pode seguir incrementándose mesmo en taxas de dilución elevadas que proporcionan un exceso de nitróxeno no medio (Goldman and Peavey, 1979). O valor máximo de  $Q_N$  coincide co cambio de tendencia da relación C:N, que diminuíu entre a taxas de renovación do 10% e o 30%, estabilizándose a continuación (Figura 4, Táboa 1). A relación C:N está correlacionada linealmente coa taxa de crecemento en condicións de limitación por nitróxeno e tamén fósforo, e diminúe a medida que aumenta a taxa de crecemento ou de dilución (Laws and Bannister, 1980). En cultivos non limitados por nitróxeno a relación C:N mantense estable arredor da relación de Redfield (Goldman, 1979) e independente da taxa de dilución, ou de renovación no caso de sistemas semicontínuos. O punto de inflexión na tendencia de  $Q_N$  e C:N sinala que o nitróxeno deixa de ser un nutriente limitante no medio, polo que  $Q_N$  e C:N considéranse parámetros indicadores do estado nutricional do cultivo. De acordo cos datos aquí expostos, a taxa de renovación do 30% é o punto no que o nitróxeno deixa de ser limitante, sinalado pola estabilización de C:N, o punto de inflexión de  $Q_N$  e o máximo contido de proteína.

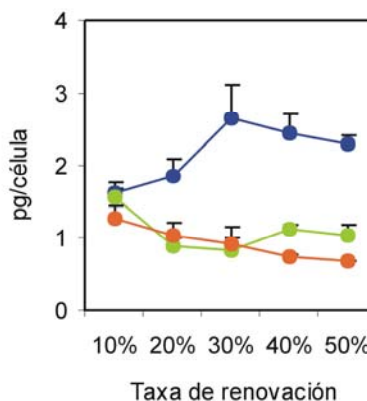


**Figura 4.** Evolución da cota celular de nitróxeno ( $Q_N$ , barras) e da relación C:N (líñas) dependente da taxa de renovación no cultivo semicontinuo de *Nannochloropsis gaditana*.

A cota celular de carbono,  $Q_C$ , mantívose elevada entre as taxas de renovación do 10% ao 30% e diminuíu nas taxas de renovación superiores (Táboa 1). A diminución da cota celular de carbono  $Q_C$  en condicións de saturación por nitróxeno difire dos resultados obtidos por Otero *et al.* (1998) nun cultivo semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* cunha concentración 4 mM de nitróxeno, no que  $Q_C$  experimentou unha evolución parabólica, rexistrando valores mínimos nas taxas de renovación intermedias. En cultivos en quimiostato de *Thalassiosira fluviatilis* limitados por nutrientes, o incremento da taxa de dilución fai que o consumo de carbono na respiración celular aumente de forma lineal, sen embargo a cota celular de carbono mantense practicamente constante nesas condicións, debido a que unha maior dispoñibilidade de nutrientes provoca un incremento da produtividade fotosintética. No caso de que a limitación sexa por luz,  $Q_C$  incrementase coa taxa de dilución (Laws and Bannister, 1980). Laws and Wong (1978) tamén citan un aumento da taxa de respiración en *Thalassiosira allenii*, *Monochrysis lutheri* e *Dunaliella tertiolecta*, pero polo contrario rexistraron unha diminución de  $Q_C$  coa taxa de dilución.



**Figura 5.** Porcentaxes de proteínas, lípidos e glúcidos na fracción orgánica de *Nannochloropsis gaditana*. ■ proteínas; ■ lípidos; ■ glúcidos.



**Figura 6.** Contido celular (pg/célula) de proteínas, lípidos e glúcidos de *Nannochloropsis gaditana*. -●- proteínas; -●- lípidos; -●- glúcidos.

O sistema de cultivo semicontinuo xenerou unha ampla variabilidade na composición bioquímica de *N. gaditana* dependente da taxa de renovación. A



proporción de proteína na fracción orgánica incrementouse ata a taxa de renovación do 30%, na que o nitróxeno deixa de ser un nutriente limitante, pasando do 36,19% ao 60,39%. Nas taxas de renovación superiores mantívose esta elevada porcentaxe de proteína. Paralelamente, houbo descensos nas porcentaxes de lípidos e glúcidos. A fracción lipídica reduciuse á metade, de 35,34% a 18,60%, entre as taxas de renovación do 10 % e do 30 %, recuperándose lixeiramente nas taxas de renovación superiores. A porcentaxe de glúcidos diminuíu ao aumentar a taxa de renovación, desde 28,47% ata 16,71% (Figura 5, Táboa 1). As variacións que experimentan as porcentaxes de proteínas, lípidos e glúcidos na fracción orgánica tamén se manifestan no contido celular, sendo a evolución de cada compoñente paralela á da súa respectiva porcentaxe na fracción orgánica.

A cantidade de proteína por célula aumenta desde 1,60 pg/célula na taxa de renovación do 10% ata 2,65 pg/célula na taxa de renovación do 30%, para descender lixeiramente nas taxas de renovación superiores. Os valores obtidos foron maiores que os de *N. gaditana* cultivada en panel con 4 mM de nitróxeno e taxa de renovación do 40% (Fábregas *et al.*, 2002). A evolución do contido da proteína é paralela á de C:N e  $Q_N$  e altamente dependente da concentración de nitróxeno no medio de cultivo. En condicións de limitación por nitróxeno a cantidade de proteína por célula increméntase seguindo a mesma tendencia que  $Q_N$  e estabilízase cando o fai a relación C:N. A proteína é o compoñente maioritario da fracción orgánica do xénero *Nannochloropsis* (Sukenic and Carmeli, 1990; Volkman *et al.*, 1993; Hu and Gao, 2003), pero contidos de proteína elevados son característicos de microalgas cultivadas con altas concentracións de nitróxeno, como os que se conseguen en sistemas semicontínuos con taxas de renovación altas. Nestes casos a porcentaxe de proteína na fracción orgánica de *Nannochloropsis gaditana* (Fábregas *et al.*, 2002) e *Nannochloropsis* sp. (Fábregas *et al.*, 2004) sobrepasa o 40%.

Os medios de cultivo pobres en nitróxeno reducen o contido proteínico a menos dun 20% do peso seco celular en *Nannochloropsis*, aínda que a proteína segue sendo a fracción orgánica maioritaria (Volkman *et al.*, 1993). A intensidade luminosa tamén exerce un efecto sobre o contido de proteína xa que esta acada o

seu valor máximo en condicións de saturación por luz que permiten converter en proteína o 100 % do nitróxeno dispoñible (Fábregas *et al.*, 2004). Suplementar con CO<sub>2</sub> a aireación dos cultivos incrementa a produción de proteína, mentres que a adición de acetato como fonte de carbono ten un efecto positivo pero menos intenso (Hu and Gao, 2003).

Os lípidos experimentaron unha evolución inversa á das proteínas, diminuíndo de 1,57 pg/célula na taxa de renovación do 10% a 0,82 pg/célula na taxa de renovación do 30%. Nas taxas de renovación máis elevadas a cantidade de lípidos incrementábase ata alcanzar valores arredor de 1 pg/célula. A diminución do contido de lípidos por célula a medida que aumenta a taxa de dilución en quimiostatos limitados por nitróxeno xa foi documentada por Sukenik *et al.* (1993) en *Nannochloropsis* sp. Reboloso-Fuentes *et al.* (2001) rexistran resultados similares en *Nannochloropsis* sp. cultivada en quimiostato con luz continua, cunha diminución da porcentaxe de lípidos sobre o peso seco da microalga acompañada dun incremento da proteína ao aumentar a taxa de dilución, o que suxire que no seu sistema experimental os cultivos están limitados por nutrientes en tódalas taxas de dilución.

O contido de lípidos de *Nannochloropsis gaditana* nas taxas de renovación con saturación de nitróxeno (1,12±0,06 e 1,04±0,12 pg/célula nas taxas de renovación do 40% e 50% respectivamente) foi menor que o obtido en *N. gaditana* cultivada en panel cunha taxa de renovación do 40%, no que a concentración residual de nitrato no medio de cultivo era 2 mM (Fábregas *et al.*, 2002). É posible que no cultivo en panel a menor dispoñibilidade de luz inducira na microalga un aumento da síntese de ácidos graxos poliinsaturados e pigmentos fotosintéticos para incrementar a superficie de membrana tilacoidal e mellorar o aproveitamento da escasa luz incidente. Sen embargo, o aumento do contido lipídico nas taxas de renovación con exceso de nutrientes, nas que se produce unha saturación por luz debido á baixa densidade celular, non pode explicarse por un incremento no contido de triacilglicéridos, fosfolípidos ou galactolípidos, xa que a cantidade de ácidos graxos saturados e monoinsaturados redúcese a menos da metade cando desaparece a limitación por nutrientes e esta diminución non se compensa co incremento dos poliinsaturados (Figura 7B; Táboa 2). É posible que

o exceso de luz inducirá un aumento da síntese de esterois ou de carotenoides, que teñen a finalidade de protexer os sistemas fotosintéticos da fotooxidación. *Nannochloropsis gaditana* acumula carotenoides, especialmente cantaxantina, na fase de crecemento expoñencial en cultivos con concentracións de nitróxeno relativamente altas (2 mM) e intensidades luminosas elevadas, entre 83-110  $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$  (Lubián *et al.*, 1986). Se hai dispoñibilidade de nutrientes, *Nannochloropsis* sp. sintetiza máis lípidos con maiores intensidades de luz, pero este incremento na síntese lipídica detense cando a luz alcanza intensidades inhibitorias (Sukenik *et al.*, 1989; 1993). En condicións de limitación por nitróxeno, sen embargo, a proporción de lípidos na fracción orgánica experimenta só un lixeiro incremento ao duplicarse a intensidade luminosa de 220 a 480  $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$  (Fábregas *et al.*, 2004).

O comportamento da fracción lipídica en sistemas semicontínuos varía segundo a especie de microalga. Xa se observou que en T-ISO o contido de lípidos descende ao aumentar a taxa de renovación ata o punto de saturación por nitróxeno, estabilizándose ou descendendo a continuación, mentres que *Isochrysis galbana* evoluciona igual que *Nannochloropsis gaditana*, xa que o seu contido lipídico aumenta novamente cando hai un exceso de nitróxeno (Otero *et al.*, 1997). En *Phaeodactylum tricornutum* prodúcese un descenso continuo dos lípidos coa taxa de renovación (Fábregas *et al.*, 1998). Polo contrario, en *Tetraselmis suecica* cultivada con concentracións de nitrato 2 e 4 mM o porcentaxe de lípidos na fracción orgánica incrementase coa taxa de renovación ata o punto de saturación por nitróxeno (Otero e Fábregas, 1997).

No caso dos glúcidos o contido celular redúcese á metade a medida que a taxa de renovación aumenta, disminuíndo linealmente de 1,26 pg/célula na taxa de renovación do 10% a 0,67 pg/célula na taxa de renovación do 50% (Figura 6, Táboa 1). Os glúcidos son os constituíntes da fracción orgánica presentes en menor cantidade en *Nannochloropsis gaditana*. No xénero *Nannochloropsis* o contido celular de glúcidos descende de forma lineal en resposta a un incremento na dispoñibilidade de nitróxeno, tanto en sistemas semicontínuos como o aquí descrito como en quimiostatos con iluminación continua (Sukenik *et al.*, 1993). As cantidades de glúcidos obtidas nas taxas de renovación máis altas,  $0,74 \pm 0,03$  e

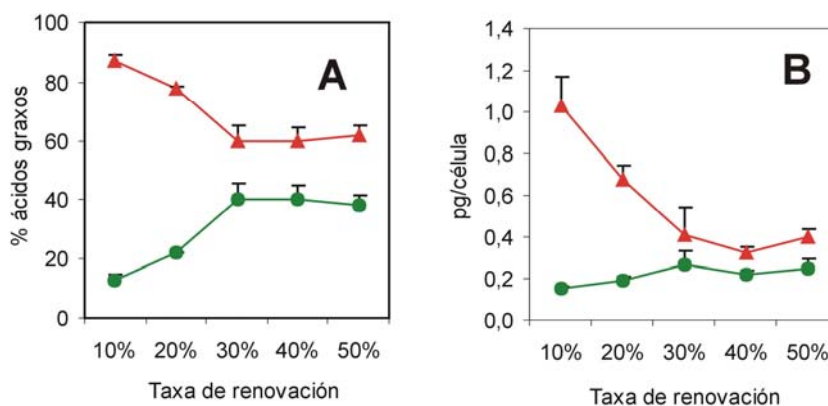
0,67±0,01 pg/célula nas taxas de renovación do 40% e 50% respectivamente, son lixeiramente maiores que as obtidas por Fábregas *et al.* (2002) nun cultivo semicontinuo en panel saturado por nitróxeno. En condicións de saturación por nutrientes, as células de *Nannochloropsis sp.* incrementan o seu contido de glúcidos en resposta a un aumento na intensidade luminosa, mesmo se esta alcanza valores que poden causar fotoinhibición (Sukenik *et al.*, 1989). A resposta é similar en cultivos limitados por nitróxeno: a fracción glucídica en *Nannochloropsis sp.* incrementábase con intensidades luminosas elevadas (Fábregas *et al.*, 2004).

Outras especies microalgais responden do mesmo xeito cando se cultivan en réxime semicontinuo. En *Tetraselmis suecica* cultivada cunha concentración de nitróxeno 2 mM, o contido celular de glúcidos redúcese de 100 pg/célula coa taxa de renovación do 10% a soamente 20 pg/célula coa taxa de renovación do 50 % (Otero and Fábregas, 1997). A porcentaxe de glúcidos na fracción orgánica de *Phaeodactylum tricornutum* diminúe coa taxa de renovación cando os cultivos están limitados por nitróxeno, e estabilízase cando o nitróxeno deixa de ser limitante (Fábregas *et al.*, 1996). O mesmo comportamento dos glúcidos en relación á dispoñibilidade de nitróxeno rexístrase en *Isochrysis galbana* (Otero *et al.*, 1997a).

A diminución de lípidos e glúcidos non foi compensada co incremento no contido proteico, polo que se produciu unha redución do contido orgánico celular, expresado como a suma de proteínas, lípidos e glúcidos. Polo contrario, a porcentaxe orgánica das células, expresada como a suma das porcentaxes sobre o peso seco celular de proteína, lípidos e glúcidos sobre o peso seco celular, incrementouse coa taxa de renovación en condicións de limitación por nitróxeno. En condicións de saturación por nitróxeno, a porcentaxe orgánica diminuíu lixeiramente (Táboa 1).

As variacións ocasionadas polo cultivo semicontinuo no contido lipídico de *Nannochloropsis gaditana* van acompañadas de intensas modificacións no seu perfil de ácidos graxos, tanto nas porcentaxes sobre o total dos ácidos graxos como no contido celular dos mesmos. O efecto da taxa de renovación sobre o

contido de ácidos graxos de *N. gaditana* foi moito máis marcado que en T-ISO cultivada coa mesma intensidade luminosa (Capítulo 2). Os ácidos graxos totais descendieron ata a taxa de renovación do 40%, pasando de 1,18 a 0,54 pg/célula, e incrementáronse lixeiramente na taxa de renovación do 50%. Esta diminución debeuse a un forte descenso do contido dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados a medida que aumentou a taxa de renovación en condicións de limitación por nitróxeno, que estivo acompañado dun incremento do contido de ácidos graxos poliinsaturados ata a taxa de renovación do 30%. En porcentaxes, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados pasaron de representar o 78% dos ácidos graxos totais na taxa de renovación do 10% ao 60% a partir da taxa de renovación do 30%, e os poliinsaturados incrementáronse do 22% ao 40% nas mesmas condicións. A partir da taxa de renovación do 30%, na que o nitróxeno deixa de ser un nutriente limitante, as porcentaxes dos distintos ácidos graxos estabilízanse (Figuras 7A, 7B; Táboa 2).



**Figura 7.** Evolución do contido de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de *Nannochloropsis gaditana* en cultivo semicontinuo. A: expresado en porcentaxe sobre o total dos ácidos graxos. B: expresado en pg de ácido graxo por célula. -▲-, ácidos graxos saturados + monoinsaturados; -●-, ácidos graxos poliinsaturados.

Os ácidos graxos máis abundantes en *Nannochloropsis gaditana* son o ácido palmítico (ácido hexadecanoico, 16:0), o ácido palmitoleico (ácido 9-hexadecenoico, 16:1 $\omega$ -7) e o ácido eicosapentaenoico, 20:5 $\omega$ -3 (EPA). Aínda que o contido de cada un deles variou fortemente en función da taxa de renovación, a

suma dos tres constituíu en tódolos casos arredor do 75% do total dos ácidos graxos. Os ácidos mirístico (ácido tetradecanoico, 14:0), oleico (ácido 9-octadecenoico, 18:1 $\omega$ -9) e araquidónico (ácido eicosatetraenoico, 20:4 $\omega$ -6) son tamén relativamente abundantes en *N. gaditana*, aínda que en ningún caso superaron o 10% do total. Estes son tamén os ácidos graxos máis abundantes noutras especies do xénero *Nannochloropsis*: *N. salina* e *N. oculata* (Volkman *et al.*, 1993) e *Nannochloropsis* sp. (Sukenik *et al.*, 1993). As súas proporcións relativas, sen embargo, varían enormemente en función das condicións de cultivo, sendo os principais factores desa variación a dispoñibilidade de nutrientes e a intensidade luminosa. Os demais ácidos graxos de *Nannochloropsis gaditana* son minoritarios e agás o ácido linoleico (ácido 9,12-octadecadienoico, 18:2 $\omega$ -6) ningún se presentou en porcentaxes maiores do 3% (Táboa 2).

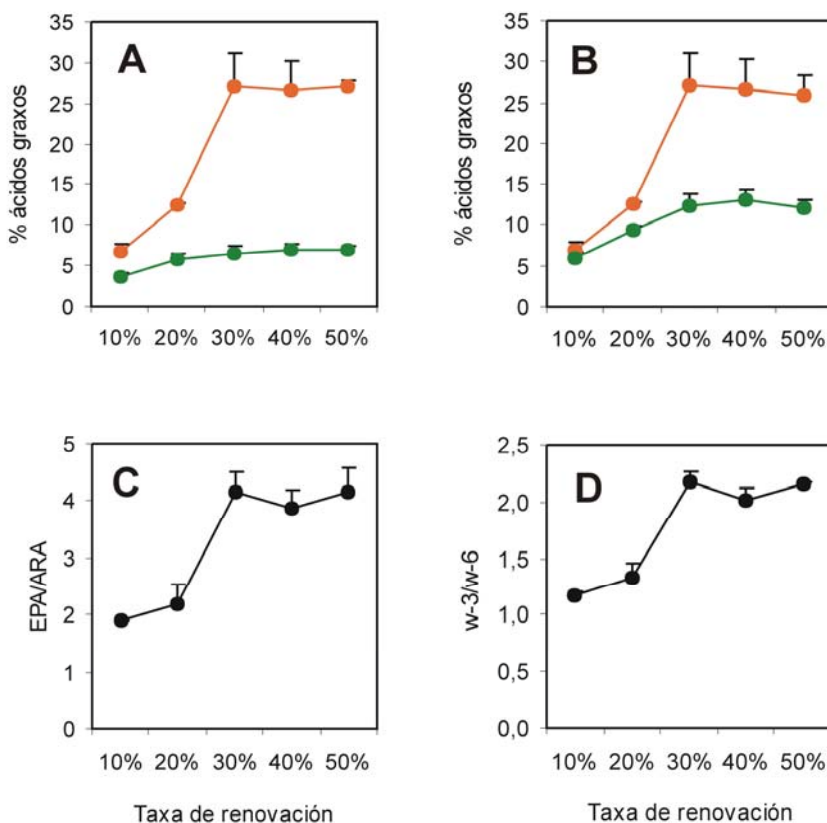
O efecto da concentración de nutrientes sobre a composición de ácidos graxos en microalgas está amplamente estudado tanto en cultivos discontinuos (Dunstan *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996) como en continuos (Sukenik *et al.*, 1993; López Alonso *et al.*, 2000) e semicontínuos (Dunstan *et al.*, 1993; Fábregas *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 1995; Otero *et al.*, 1997a; Otero *et al.*, 1997b; Reitan *et al.*, 1994). A carencia de nutrientes debida a unha taxa de dilución baixa en cultivos continuos e semicontínuos provoca unha diminución da proporción de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente  $\omega$ -3, polo que a relación  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 diminúe en condicións de limitación por nutrientes, de maneira similar ao que acontece nos cultivos discontinuos en fase estacionaria. O esgotamento dos nutrientes fai que as células deixen de dividirse e deriven a enerxía captada á síntese de produtos de reserva, principalmente triacilglicerois, nos que predominan os ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Algúns autores sinalan unha correlación positiva entre a proporción de triacilglicerois e a de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e entre a proporción de lípidos polares e a de ácidos graxos poliinsaturados (Brown *et al.*, 1996). En *Nannochloropsis* sp., os ácidos graxos 20:5 $\omega$ -3 e o 20:4 $\omega$ -6 atópanse case exclusivamente localizados en galactolípidos, que tamén presentan 16:0 e 16:1, mentres que os lípidos neutros presentan 16:0 e 16:1 e cantidades menores de 14:0 e 18:0, e os fosfolípidos conteñen 16:1, 18:1 e 18:4, ausente en *N. gaditana* (Sukenik *et al.*, 1989).

As porcentaxes de 16:0 e 16:1 $\omega$ -7 descenderon coa taxa de renovación en condicións de limitación por nitróxeno, estabilizándose a partir da taxa de renovación do 30 %. O 16:0 pasou de representar o 36,27% do total de ácidos graxos na taxa de renovación do 10 % a un 22,88% na taxa de renovación do 30%. A proporción de 16:1 $\omega$ -7 descendeu do 31,59% ao 24,35% entre as taxas de renovación do 10% e do 30 %. O 18:1 $\omega$ -9 diminuíu a medida que aumentaba a taxa de renovación en condicións de limitación por nitróxeno, pasando do 10,18% ao 2,92% na taxa de renovación do 30%, e incrementándose lixeiramente nas taxas de renovación superiores.

As variacións que experimentou o contido celular de cada un destes ácidos graxos debido ao cultivo semicontinuo foron aínda maiores. O 16:0 experimentou o descenso máis drástico, pois a cantidade por célula diminuíu entre 3 e 3,5 veces, de 0,429 pg/célula na taxa de renovación do 10% a 0,122 pg/célula na taxa de renovación do 40%. A diminución do contido de 16:1 $\omega$ -7 foi algo menor, baixando de 0,374 pg/célula na taxa de renovación do 10% a 0,132 pg/célula na taxa de renovación do 40%. O contido celular de 18:1 $\omega$ -9 diminuíu de 0,120 a 0,020 pg/célula. O 14:0 non segue a tendencia xeral dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados e a súa porcentaxe mantívose practicamente constante en tódalas taxas de renovación, aínda que o seu contido celular se reduciu á metade ao incrementarse a taxa de renovación (Táboa 2).

No que se refire aos ácidos graxos poliinsaturados, a porcentaxe de EPA (20:5 $\omega$ -3) cuadruplicouse, aumentando do 6,76% na taxa de renovación do 10% ao 27,11% na taxa de renovación do 30%. A pesares de que a porcentaxe de EPA sobre o total dos ácidos graxos se multiplicou por catro, o contido celular nas taxas de renovación máis altas –nas que o nitróxeno está en exceso no medio de cultivo– respecto á taxa de renovación do 10% soamente se duplicou, pasando de 0,079 pg/célula a un máximo de 0,179 pg/célula (Figuras 8A, 8B; Táboa 2). Unha evolución semellante dáse en *Phaeodactylum tricornutum*, no que a porcentaxe de EPA se incrementa coa taxa de renovación en cultivos semicontínuos con diferentes concentracións de nutrientes, e se estabiliza ao redor dun 25%, coincidindo coas taxas de renovación nas que hai un exceso de nitróxeno no medio (Otero *et al.*, 1995). O ARA (20:4 $\omega$ -6) duplicouse entre as taxas de renovación do 10% e o 30%, pasando dun 3,56% a un 6,55% e mantívose

constante nas taxas de renovación superiores, aínda que o contido por célula case non variou, entre 0,037 e 0,049 pg/célula (Figura 8A, 8B; Táboa 2).



**Figura 8.** Ácidos graxos poliinsaturados de *Nannochloropsis gaditana*. A: evolución do contido de EPA (—●—) e ARA (—●—) en función da taxa de renovación. B: evolución do contido de ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ -3 (—●—) e  $\omega$ -6 (—●—). C e D: relacións EPA/ARA e  $\omega$ -3/ $\omega$ -6.

As porcentaxes dos distintos ácidos graxos que se mostran neste traballo son semellantes ás rexistradas por Dunstan *et al.* (1993) en *Nannochloropsis oculata* tanto en réxime semicontínuo como en fase estacionaria, aínda que *N. oculata* presentou unha proporción de 20:5 $\omega$ -3 sensiblemente maior e cantidades de ácidos graxos saturados e monoinsaturados lixeiramente menores en tódalas condicións e fases de cultivo probadas. Dado que outros autores non rexistran porcentaxes de 20:5 $\omega$ -3 superiores ao 30% do total dos ácidos graxos no xénero



*Nannochloropsis*, a proporción tan elevada sinalada por Dunstan podería deberse a algunha particularidade no método de determinación dos ácidos graxos.

O incremento do contido de ácidos graxos poliinsaturados coa taxa de renovación reflexouse tanto no grupo dos ácidos graxos  $\omega$ -3 como no grupo dos  $\omega$ -6. A porcentaxe dos  $\omega$ -3 multiplicouse por catro debido ao forte incremento do contido en EPA entre as taxas de renovación do 10% e o 30%, mentres que a proporción de  $\omega$ -6 soamente se duplicou. Desta maneira, a relación  $\omega$ -3: $\omega$ -6 aumentou de 1,26 a 2,29 (Figura 8D). A relación EPA:ARA tamén se duplicou, pasando de 1,90 na taxa de renovación do 10% a 4,14 na taxa de renovación do 30% (Figura 8C; Táboa 2).

En definitiva, o cultivo semicontinuo causou unha ampla variabilidade bioquímica en *Nannochloropsis gaditana*. Os efectos máis interesantes de cara á utilización desta microalga como base da cadea alimentaria no cultivo larvario de peixes son os incrementos no contido de proteína e de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente EPA, en condicións de saturación por nitróxeno no medio. A influencia que estas modificacións poidan ter sobre o valor nutritivo da microalga para a súa utilización no cultivo ou enriquecemento de *Brachionus plicatilis* permitirán definir as condicións óptimas de cultivo para *Nannochloropsis gaditana*.

**Táboa 1.** Composición de *Nannochloropsis gaditana* cultivada en réxime semicontinuo cunha concentración de nitróxeno 4 mM.

	Taxa de renovación				
	10 %	20 %	30 %	40 %	50%
<b>Densidade celular</b>	223,27	179,83	101,83	108,17	70,08
<b>(10<sup>6</sup> cél/ml±std)</b>	±4,15	±22,73	±20,79	±2,84	±7,39
<b>Produtividade</b>					
<b>(10<sup>9</sup> células/l/día)</b>	22,33	35,97	30,55	43,27	35,04
<b>(mg/l/día)</b>	138	179	152	226	165
<b>Peso seco (pg/cél±std)</b>	6,19±1,20	4,98±0,37	4,96±0,36	5,23±0,37	4,71±0,43
<b>Proteína (pg/cél±std)</b>	1,60±0,08	1,84±0,25	2,65±0,46	2,45±0,24	2,28±0,12
<b>Lípidos (pg/cél±std)</b>	1,57±0,20	0,89±0,10	0,82±0,17	1,12±0,06	1,04±0,12
<b>Glúcidos (pg/cél±std)</b>	1,26±0,19	1,04±0,16	0,92±0,23	0,74±0,03	0,67±0,01
<b>Total prot+líp+glúc</b>					
<b>(pg/cél±std)</b>	4,43±0,47	3,77±0,51	4,38±0,84	4,31±0,33	3,99±0,24
<b>Valor calórico</b>					
<b>(10<sup>-7</sup> J/cél)</b>	1,22	0,97	1,11	1,15	1,07
<b>% proteína</b>	25,93	36,94	53,39	46,86	48,54
<b>% lípidos</b>	25,33	17,92	16,44	21,37	22,13
<b>% glúcidos</b>	20,41	20,87	18,57	14,21	14,18
<b>Total orgánico</b>	71,67	75,73	88,40	82,44	84,85
<b>% proteína na F. O.</b>	36,19	48,77	60,39	56,83	57,21
<b>% lípidos na F. O.</b>	35,34	23,67	18,60	25,92	26,08
<b>% glúcidos na F. O.</b>	28,47	27,56	21,01	17,24	16,71
<b>Q<sub>N</sub> (pg/cél±std)</b>	0,276±0,058	0,326±0,001	0,551±0,063	0,403±0,157	0,436±0,025
<b>Q<sub>C</sub> (pg/cél±std)</b>	3,557±0,565	2,920±0,278	3,501±0,434	2,471±0,965	2,252±0,716
<b>Relación C:N (átomos)</b>	15,7	10,8	7,4	7,2	7,1

**Táboa 2.** Composición de ácidos graxos de *Nannochloropsis gaditana* cultivada en réxime semicontínuo cunha concentración de nitróxeno 4 mM, expresada en porcentaxes sobre o total de ácidos graxos e pg/célula.

Ácido graxo	Taxa de renovación									
	10%		20%		30%		40 %		50%	
	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél
<b>12:0</b>	<b>0,17</b>	<b>0,002</b>	<b>0,40</b>	<b>0,003</b>	<b>0,13</b>	<b>0,001</b>	<b>0,49</b>	<b>0,003</b>	<b>0,25</b>	<b>0,003</b>
	±0,17	±0,002	±0,05	±0,001	±0,23	±0,002	±0,08	±0,000	±0,35	±0,002
<b>14:0</b>	<b>7,37</b>	<b>0,087</b>	<b>7,44</b>	<b>0,064</b>	<b>8,00</b>	<b>0,053</b>	<b>7,16</b>	<b>0,039</b>	<b>6,89</b>	<b>0,047</b>
	±1,82	±0,067	±0,008	±1,95	±0,018	±1,32	±0,008	±0,91	±0,009	
<b>16:0</b>	<b>36,27</b>	<b>0,429</b>	<b>32,15</b>	<b>0,277</b>	<b>22,88</b>	<b>0,156</b>	<b>22,66</b>	<b>0,122</b>	<b>23,93</b>	<b>0,156</b>
	±0,88	±0,052	±0,27	±0,028	±2,01	±0,054	±1,92	±0,013	±0,71	±0,014
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>31,59</b>	<b>0,374</b>	<b>28,37</b>	<b>0,245</b>	<b>24,35</b>	<b>0,164</b>	<b>24,42</b>	<b>0,132</b>	<b>23,90</b>	<b>0,160</b>
	±1,20	±0,058	±1,01	±0,029	±2,87	±0,052	±1,81	±0,012	±0,86	±0,015
<b>16:2 (ω-6)</b>	<b>0,10</b>	<b>0,001</b>	<b>0,18</b>	<b>0,002</b>	<b>0,47</b>	<b>0,003</b>	<b>0,41</b>	<b>0,002</b>	<b>0,34</b>	<b>0,002</b>
	±0,03	±0,000	±0,07	±0,00	±0,13	±0,001	±0,05	±0,000	±0,06	±0,001
<b>16:2 (ω-4)</b>	<b>0,04</b>	<b>0,001</b>	<b>0,10</b>	<b>0,001</b>	<b>0,38</b>	<b>0,002</b>	<b>0,20</b>	<b>0,001</b>	<b>0,22</b>	<b>0,002</b>
	±0,04	±0,000	±0,02	±0,000	±0,16	±0,000	±0,05	±0,000	±0,01	±0,000
<b>18:0</b>	<b>1,14</b>	<b>0,013</b>	<b>1,19</b>	<b>0,010</b>	<b>0,84</b>	<b>0,006</b>	<b>0,77</b>	<b>0,004</b>	<b>0,90</b>	<b>0,005</b>
	±0,18	±0,003	±0,17	±0,002	±0,22	±0,003	±0,08	±0,000	±0,14	±0,001
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>10,18</b>	<b>0,120</b>	<b>7,83</b>	<b>0,068</b>	<b>2,92</b>	<b>0,020</b>	<b>3,81</b>	<b>0,021</b>	<b>3,57</b>	<b>0,022</b>
	±1,65	±0,024	±1,35	±0,014	±0,72	±0,010	±0,25	±0,001	±0,25	±0,003
<b>18:1 (ω-7)</b>	<b>0,44</b>	<b>0,005</b>	<b>0,48</b>	<b>0,004</b>	<b>0,66</b>	<b>0,004</b>	<b>0,50</b>	<b>0,003</b>	<b>0,34</b>	<b>0,002</b>
	±0,07	±0,000	±0,03	±0,001	±0,11	±0,001	±0,04	±0,000	±0,41	±0,002
<b>18:2 (ω-6)</b>	<b>1,45</b>	<b>0,017</b>	<b>2,33</b>	<b>0,020</b>	<b>3,30</b>	<b>0,022</b>	<b>3,61</b>	<b>0,019</b>	<b>2,91</b>	<b>0,019</b>
	±0,23	±0,003	±0,08	±0,002	±0,45	±0,005	±0,44	±0,002	±0,04	±0,002
<b>18:3 (ω-6)</b>	<b>0,32</b>	<b>0,004</b>	<b>0,56</b>	<b>0,005</b>	<b>1,50</b>	<b>0,010</b>	<b>1,74</b>	<b>0,009</b>	<b>1,74</b>	<b>0,012</b>
	±0,05	±0,001	±0,05	±0,001	±0,19	±0,002	±0,09	±0,000	±0,14	±0,001
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>0,07</b>	<b>0,001</b>	<b>0,12</b>	<b>0,001</b>	<b>0,04</b>	-	<b>0,14</b>	<b>0,001</b>	<b>0,13</b>	<b>0,001</b>
	±0,07	±0,001	±0,02	±0,000	±0,08	-	±0,09	±0,000	±0,03	±0,000
<b>20:0</b>	<b>0,09</b>	<b>0,001</b>	<b>0,09</b>	<b>0,001</b>	<b>0,06</b>	-	<b>0,05</b>	-	<b>0,06</b>	-
	±0,02	±0,000	±0,02	±0,000	±0,03	-	±0,01	-	±0,01	-

<b>20:1 (ω-9)</b>	<b>0,05</b> ±0,04	<b>0,001</b> ±0,00	<b>0,08</b> ±0,02	<b>0,001</b> ±0,00	<b>0,19</b> ±0,14	<b>0,001</b> ±0,001	<b>0,07</b> ±0,02	-	<b>0,08</b> ±0,04	-
<b>20:3 (ω-6)</b>	<b>0,39</b> ±0,07	<b>0,005</b> ±0,001	<b>0,61</b> ±0,08	<b>0,005</b> ±0,001	<b>0,60</b> ±0,15	<b>0,004</b> ±0,002	<b>0,55</b> ±0,13	<b>0,003</b> ±0,001	<b>0,75</b> ±0,01	<b>0,004</b> ±0,001
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>3,56</b> ±0,51	<b>0,042</b> ±0,003	<b>5,70</b> ±0,68	<b>0,049</b> ±0,008	<b>6,55</b> ±0,93	<b>0,044</b> ±0,016	<b>6,87</b> ±0,83	<b>0,037</b> ±0,005	<b>6,90</b> ±0,47	<b>0,041</b> ±0,011
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>6,76</b> ±0,93	<b>0,079</b> ±0,006	<b>12,37</b> ±0,31	<b>0,107</b> ±0,010	<b>27,11</b> ±3,96	<b>0,179</b> ±0,048	<b>26,55</b> ±3,70	<b>0,143</b> ±0,020	<b>27,09</b> ±0,77	<b>0,166</b> ±0,031
<b>Total ác. graxos</b>		<b>1,181</b> ±0,138		<b>0,862</b> ±0,092		<b>0,670</b> ±0,195		<b>0,539</b> ±0,020		<b>0,641</b> ±0,077
	<b>45,03</b> ±2,40	<b>0,532</b> ±0,068	<b>41,26</b> ±0,65	<b>0,356</b> ±0,037	<b>31,92</b> ±3,16	<b>0,216</b> ±0,072	<b>31,13</b> ±3,21	<b>0,168</b> ±0,002	<b>32,03</b> ±1,68	<b>0,211</b> ±0,025
<i><b>Saturados</b></i>										
<b>Monoinsaturados</b>	<b>42,26</b> ±1,64	<b>0,500</b> ±0,074	<b>36,76</b> ±0,44	<b>0,317</b> ±0,037	<b>28,12</b> ±2,22	<b>0,190</b> ±0,061	<b>28,79</b> ±1,67	<b>0,155</b> ±0,011	<b>27,89</b> ±2,04	<b>0,184</b> ±0,013
<b>Sat+mono</b>	<b>87,29</b> ±1,74	<b>1,032</b> ±0,013	<b>78,02</b> ±0,32	<b>0,673</b> ±0,019	<b>60,03</b> ±5,39	<b>0,406</b> ±0,072	<b>59,92</b> ±4,84	<b>0,323</b> ±0,026	<b>59,91</b> ±3,46	<b>0,396</b> ±0,046
<b>Poliinsaturados</b>	<b>12,71</b> ±1,74	<b>0,149</b> ±0,036	<b>21,98</b> ±0,32	<b>0,189</b> ±0,073	<b>39,97</b> ±5,39	<b>0,264</b> ±0,132	<b>40,08</b> ±4,84	<b>0,216</b> ±0,031	<b>40,09</b> ±3,46	<b>0,246</b> ±0,038
<b>Total ω-3</b>	<b>6,84</b> ±0,97	<b>0,080</b> ±0,007	<b>12,49</b> ±0,34	<b>0,108</b> ±0,010	<b>27,15</b> ±3,49	<b>0,179</b> ±0,048	<b>26,70</b> ±3,70	<b>0,144</b> ±0,020	<b>27,22</b> ±2,37	<b>0,167</b> ±0,0032
<b>Total ω-6</b>	<b>5,44</b> ±0,81	<b>0,064</b> ±0,007	<b>8,77</b> ±0,57	<b>0,076</b> ±0,011	<b>11,83</b> ±1,87	<b>0,079</b> ±0,025	<b>12,63</b> ±1,10	<b>0,068</b> ±0,006	<b>11,90</b> ±1,15	<b>0,073</b> ±0,0015
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>1,26</b> ±0,03		<b>1,42</b> ±0,12		<b>2,29</b> ±0,09		<b>2,11</b> ±0,11		<b>2,29</b> ±0,01	
<b>EPA : ARA</b>	<b>1,90</b> ±0,01		<b>2,17</b> ±0,33		<b>4,14</b> ±0,37		<b>3,87</b> ±0,32		<b>3,92</b> ±0,42	

## **Capítulo 5.**

---

**Enriquecimiento de *Brachionus plicatilis* durante 24 h con *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en sistema semicontinuo con intensidad luminosa elevada**



## **Introdución**

As técnicas de enriquecemento para incrementar a concentración de ácidos graxos poliinsaturados nos rotíferos inclúen a utilización de emulsións lipídicas, micropartículas ou microalgas durante un periodo comprendido xeralmente entre 8 e 24 horas. As microalgas presentan unha serie de vantaxes sobre os outros tipos de alimento: diminúen a proliferación de bacterias nos cultivos de rotíferos e evitan a perda de calidade da auga nos tanques de cultivo larvario que provocan os residuos das dietas artificiais introducidos cos rotíferos. A produción de microalgas supón unha gran parte dos custos de explotación nas instalacións de acuicultura, polo que na actualidade se están desenvolvendo produtos para o enriquecemento de rotíferos a base de microalgas concentradas ou liofilizadas. Pero a pesar do papel esencial das microalgas na acuicultura, non se presta moita atención ás condicións de cultivo e a produtividade e composición bioquímica dos cultivos microalgais non sempre son as óptimas.

T-ISO é unha especie frecuentemente utilizada para o enriquecemento de rotíferos polo seu contido en DHA. Neste experimento os rotíferos foron enriquecidos durante 24 h con T-ISO cultivada en sistema semicontínuo (Capítulo 2), e observouse o efecto da taxa de renovación da microalga sobre a composición bioquímica do rotífero.

## **Deseño experimental**

Neste experimento empregáronse rotíferos (*Brachionus plicatilis*) inicialmente cultivados en botellóns de 6 l, que se mantiveron privados de alimento as 12 horas anteriores ao inicio do experimento co fin de baleirar o tubo dixestivo e evitar así a interferencia da alimentación anterior ao experimento nos resultados do mesmo. Para o enriquecemento, os rotíferos transferíronse a botellas. Engadiuse o volume de cultivo de *Isochrysis galbana* var. T-ISO cultivada con cinco taxas de renovación e unha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Capítulo 2) necesario para aportar 27.000 células/rotífero e completouse ata 700 ml con auga de mar autoclavada. A densidade de rotíferos

nas botellas foi de 200 individuos/ml. Aplicouse aireación suave para manter o alimento e os rotíferos distribuídos uniformemente por toda a columna de auga. Ás 24 horas os rotíferos recolléronse e distribuíronse da seguinte maneira: 100 ml recolléronse para determinar peso seco, 80 ml recolléronse nunha malla de 40  $\mu\text{m}$  de luz e foron conxelados para a posterior determinación de ácidos graxos e os rotíferos restantes recolléronse nunha malla, laváronse con auga destilada, transferíronse a tubos de vidro e foron conxelados e posteriormente liofilizados para realizar análises de proteínas, lípidos, glúcidos, e análise elemental. Antes de iniciar o experimento recolleuse do botellón unha cantidade de rotíferos como mostra control.

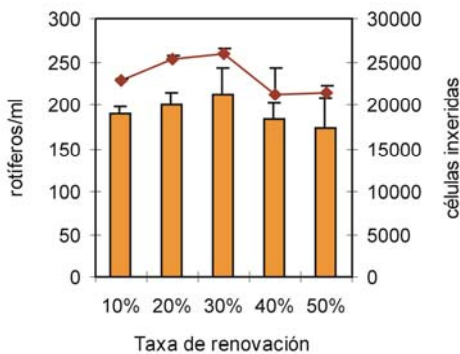
## **Resultados e discusión**

Despois das 24 horas de alimentación a densidade nos cultivos de rotíferos variou respecto á densidade inicial. A densidade máxima obtívose nos cultivos alimentados con T-ISO cultivada cunha taxa de renovación do 30%, e diminuíu progresivamente nos grupos alimentados con microalgas das taxas de renovación inferiores e superiores; a diminución foi máis marcada nos cultivos alimentados coas taxas de renovación do 40% e 50% (Figura 1, Táboa 1). A diminución do número de rotíferos respecto da densidade inicial na maioría das condicións probadas pode deberse a que a ausencia de alimento nas 12 horas previas ao experimento provocou un incremento da mortalidade que non foi compensado co nacemento de novos individuos. O peso inicial dos rotíferos foi moi baixo, indicando que a poboación se atopaba en malas condicións de alimentación.

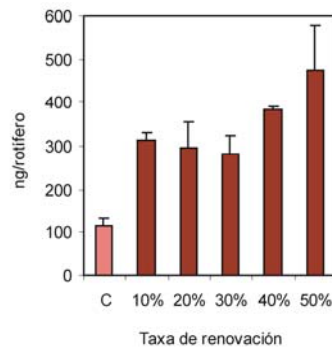
A ración de microalga por rotífero foi calculada en base aos resultados de Patiño (1995), que concluíu que unha ración de 2.000 *Tetraselmis suecica* por rotífero é consumida case por completo en 24 horas e asegura unha taxa de inxestión constante, evitando a alternancia de periodos de saturación do sistema dixestivo e periodos de redución da actividade filtradora. Experimentos de enriquecemento con distintas cantidades de microalga confirmaron que racións maiores non dan lugar a mellores resultados no incremento do contido de



proteínas ou ácidos graxos poliinsaturados (Capítulo 8). O peso seco medio das racións de T-ISO, uns 470 ng/rotífero, equivale ao peso de 2.000 *T. suecica*, considerando un peso seco para *T. suecica* de 200-220 pg/célula. O recuento das células de T-ISO sobrantes indica que a inxestión de microalga se incrementou desde as 22.800 células consumidas por rotífero na taxa de renovación do 10% a case 26.000 células na taxa de renovación do 30%, mentres que nas taxas de renovación do 40% e 50% o consumo foi moito menor, algo máis de 21.000 células/rotífero (Figura 1; Táboa 1). Porén, debe terse en conta que as células microalgais introducidas nos cultivos de rotífero puideron seguir dividíndose, especialmente aquelas que foran cultivadas cunha taxa de renovación alta e polo tanto eran células xóvenes e en boas condicións fisiolóxicas. Este feito pode levar a subestimar o consumo de células de T-ISO por parte dos rotíferos nas taxas de renovación do 40% e 50%.



**Figura 1.** Densidade de rotíferos (■) e número de células ingeridas (-◆-) despois do enriquecemento de 24 h con *Isochrysis aff. galbana* T-ISO.



**Figura 2.** Peso seco dos rotíferos control (C) e dos sometidos a enriquecemento con T-ISO.

Os rotíferos enriquecidos alcanzaron un peso seco entre 2,5 e 4 veces superior ao dos rotíferos control (115,30±16,28 ng/rotífero). O peso seco diminuíu desde a taxa de renovación do 10%, con 312 ng/rotífero ata a taxa de renovación do 30% con 282 ng/rotífero, pero os pesos máis elevados rexistráronse nas taxas de renovación do 40% e 50%, chegando a 475 ng/rotífero nos individuos que recibiron microalga da taxa de renovación do 50% (Figura 2; Táboa 2). Tendo en conta a densidade de rotíferos ao final do experimento e o

peso seco individual, obsérvase que a produción neta de biomasa foi practicamente igual nos grupos alimentados con microalgas das taxas de renovación entre o 10% e o 30%, mentres que nas taxas de renovación superiores se rexistrou un forte incremento. Non se determinou a relación ovo/rotífero, pero é probable que o peso dos rotíferos alimentados con microalgas das taxas de renovación do 40% e 50% se debara a unha elevada produción de ovos. O peso do ovo depende da cepa de rotífero, pero tamén varía coa especie de microalga empregada como alimento (Yúfera *et al.*, 1993), e contribúe de forma importante á biomasa do cultivo, existindo unha alta correlación positiva entre a relación ovo/rotífero e o peso seco por individuo (Scott e Baynes, 1978; Yúfera *et al.*, 1983).

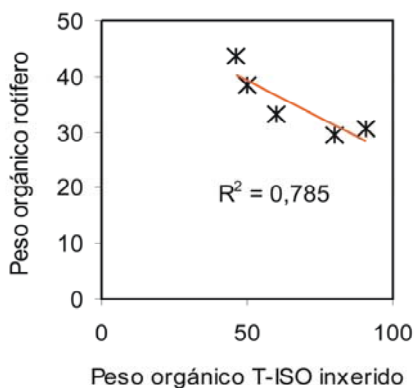


Figura 3. Correlación entre o peso orgánico de T-ISO inxerido e o peso orgánico de rotífero (µg/ml).

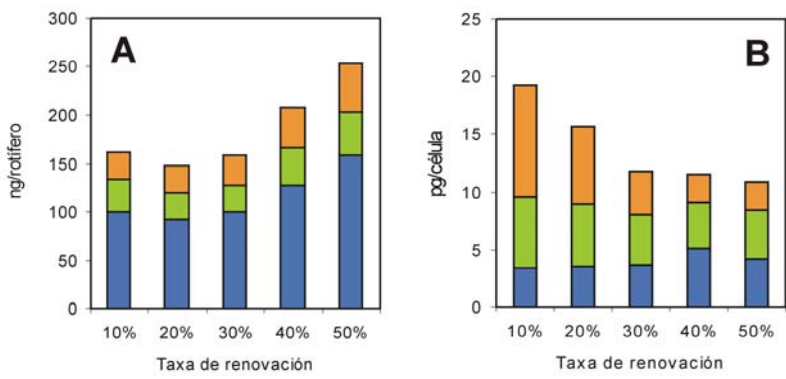
O aumento do peso individual compensou o menor número de rotíferos por ml, especialmente nos alimentados con microalgas das taxas de renovación de 40% e 50%. Polo tanto, a FCR, calculada como a relación entre o peso inxerido de T-ISO e a produción neta de biomasa de rotífero por ml diminuíu coa taxa de renovación, pasando de 2,6 a 1,3 nas taxas de renovación do 40% e 50%. Se a FCR se calcula a partir do peso total de T-ISO subministrado por ml, a tendencia é a mesma (Táboa 1). O peso orgánico dos rotíferos seguiu a mesma evolución que o peso seco. Xa que o contido orgánico de T-ISO descendía coa taxa de renovación (Capítulo 2), a FCR orgánica experimentou un descenso de forma completamente lineal, e en consecuencia houbo correlación negativa ( $R^2=0,78$ ) entre a biomasa orgánica de T-ISO inxerida e a biomasa orgánica de rotífero por

ml (Figura 3). A redución da FCR coa taxa de renovación, xa foi observado en *Artemia* sp. alimentada con *Tetraselmis suecica*, así como un incremento da produtividade e do peso seco individual de *Artemia* (Fábregas *et al.*, 2001).

A composición bioquímica dos rotíferos resultou afectada polos cambios na composición de T-ISO debidos á taxa de renovación dos cultivos. Os tres compoñentes orgánicos rexistraron fortes incrementos respecto aos rotíferos control recollidos antes do enriquecemento. O contido de proteína mantívose máis ou menos constante, arredor de 100 ng/rotífero, nos rotíferos que recibiron T-ISO cultivada con taxas de renovación do 10% ao 30%, a mesma tendencia observada na microalga. Coas taxas de renovación máis altas a proteína incrementouse ata os 158 ng/rotífero nos alimentados coa taxa de renovación do 50%, a pesares de que nestas condicións o contido de proteína da microalga diminuíu (Figura 4; Táboa 1; Táboa 2). Os contidos proteicos da microalga e do rotífero presentaron unha correlación positiva elevada ( $R^2=0,914$ ) ata a taxa de renovación do 40%. A existencia de correlación positiva entre a porcentaxe de proteína de varias especies de microalgas e a porcentaxe de proteína do rotífero alimentado con elas é citada por algúns autores (Frolov *et al.*, 1991). A porcentaxe de proteína nos rotíferos está comprendida nun rango entre o 28% e o 59% aproximadamente (Scott e Baynes, 1978; Ben-Amotz *et al.*, 1987; Frolov *et al.*, 1991), e constitúe o compoñente orgánico maioritario dos rotíferos independentemente do tipo de alimento que reciban, pero o contido de proteína por individuo é moi variable e incrementase sensiblemente cando os rotíferos son alimentados con dietas ricas en proteína (Øie *et al.*, 1997; Øie e Olsen, 1997), como acontece no noso caso.

Os lípidos diminuíron lixeiramente desde 34 ng/rotífero na taxa de renovación do 10% ata os 28 ng/rotífero nos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 30%, e despois incrementáronse ata 45 ng/rotífero nos alimentados coa taxa de renovación máis alta (Figura 4; Táboa 2). Non existe correlación entre o contido lipídico de T-ISO e dos rotíferos, aínda que outros autores citan a existencia de correlación en experimentos de cultivo de rotíferos (Frolov *et al.*, 1991). A porcentaxe de lípidos no peso seco que se obtén cando os rotíferos se alimentan con microalgas é menor que cando se utilizan emulsións (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1994; Scott and Baynes, 1978; Whyte *et al.*, 1994), aínda que un enriquecemento

durante 24 horas produce grandes incrementos do contido lipídico –ata un 100%- tanto se se empregan emulsións como dietas artificiais completas (Øie and Olsen, 1997).



**Figura 4.** Composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* (A) e T-ISO empregada como alimento (B), expresada en ng/individuo e pg/célula respectivamente. ■, proteínas; ■, lípidos; ■, glicidos.

Os glicidos mantivéronse estables arredor de 28 pg/rotífero nas taxas de renovación do 10% e 20% e despois incrementáronse de forma lineal ata alcanzar os 50 ng nos rotíferos alimentados con T-ISO cultivada coa taxa de renovación do 50% (Figura 4; Táboa 2). Esta evolución é totalmente contraria á experimentada pola microalga, de xeito que a correlación entre a cantidade de glicidos de T-ISO e do rotífero é negativa ( $R^2=0,82$ ). O contido de glicidos dos rotíferos non soe ser superior ao 15% do peso seco (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Carić *et al.*, 1992; Whyte *et al.*, 1994) e tende a diminuír a medida que aumenta o tempo de alimentación (Fernández-Reiriz *et al.*, 1993).

A suma das cantidades de proteínas, lípidos e glicidos, é dicir, o contido orgánico dos rotíferos aumentou coa taxa de renovación, comportándose do xeito inverso ao do contido orgánico de T-ISO, que diminuíu a medida que se incrementaba coa taxa de renovación (Figura 4; Táboa 2). A porcentaxe do peso total dos rotíferos correspondente ao contido orgánico non dependeu da taxa de renovación, e oscilou entre o 50% e o 56%. As porcentaxes de proteínas, lípidos e glicidos na fracción orgánica case non variaron entre as distintas taxas de

renovación, con valores entre o 62% e o 65% no caso das proteínas, 17% e 21% para os lípidos e 17% e 20% para os glúcidos (Táboa 2). A evolución da proteína no rotífero reflectiu a evolución da proteína na microalga, pero o comportamento dos lípidos e dos glúcidos, independente e contrario respectivamente da tendencia rexistrada en T-ISO, indican que a comunmente aceptada afirmación de que os rotíferos reflicten a composición bioquímica do seu alimento non é totalmente correcta en experimentos de enriquecemento curto.

A incorporación da proteína aportada pola dieta oscilou entre o 58% e o 72% nas taxas de renovación do 10% ao 40%, pero foi case total na taxa de renovación do 50%. No caso dos lípidos, a incorporación á biomasa do rotífero mantense entre o 13% e o 15% nas taxas de renovación do 10% ao 30%, e incrementase ata o 27% nas taxas de renovación superiores. A incorporación dos glúcidos aumentou drasticamente coa taxa de renovación, pasando do 7,7% na taxa de renovación do 10% a case o 55% na taxa de renovación do 50% (Táboa 1).

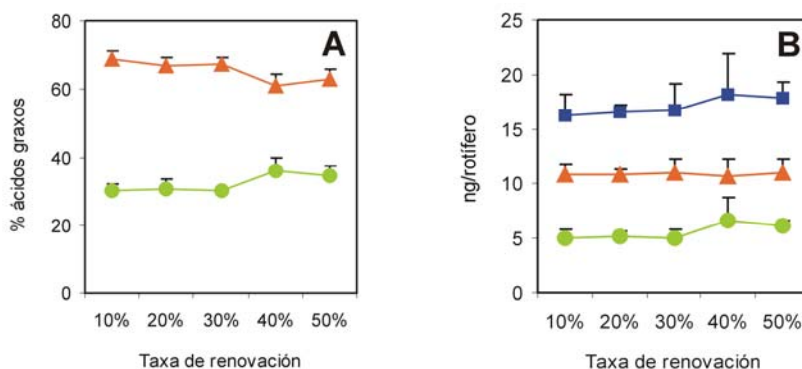
Existe unha tendencia a manter unha composición bioquímica constante mentres os rotíferos son alimentados con T-ISO cultivada en condicións de deficiencia de nitróxeno, independentemente da taxa de renovación empregada e dos cambios ocasionados por esta na composición bioquímica da microalga. Ademais, as porcentaxes de incorporación de proteínas e lípidos foron similares nos tres grupos alimentados con microalgas limitadas por nitróxeno, é dicir, as taxas de renovación do 10% ao 30% (Capítulo 2). Unha vez que se superou a limitación por nitróxeno nos cultivos de T-ISO, a incorporación dos nutrientes da microalga ao rotífero aumentou coa taxa de renovación aínda que o contido dos mesmos xa se estabilizara ou mesmo disminuía.

As variacións experimentadas pola composición bioquímica individual son comparables ás da biomasa de rotífero recuperada por ml de cultivo. A evolución da biomasa orgánica de rotífero por ml pode explicarse por unha mellora da dixestión e asimilación producida pola diminución da materia orgánica inxerida, tal e como indica a evolución da FCR orgánica. En cambio, o contido orgánico por individuo non está directamente relacionado coa cantidade de T-ISO ou de

materia orgánica consumida por rotífero nin coa evolución de ningún dos compoñentes da fracción orgánica da microalga. A diminución das substancias de reserva de T-ISO co aumento da taxa de renovación non favoreceu por si soa a asimilación de proteínas ou lípidos nos rotíferos alimentados con microalgas procedentes dos cultivos limitados por nitróxeno. Scott (1980) observou que os rotíferos mantidos en quimiostato presentaban unha eficiencia máxima no aproveitamento enerxético da microalga usada –*Brachiomonas submarina*– como alimento cando as relacións proteína:lípidos:glúcidos se aproximaban a 1:1:1. Nos nosos cultivos de T-ISO as relacións proteína:lípidos e proteína:glúcidos foron superiores a 1 en condicións de saturación por nitróxeno coincidindo cos máximos aproveitamentos dos tres compoñentes orgánicos, pero alcanzaron os seus valores máximos, 1,86 e 1,20 respectivamente, na taxa de renovación do 40%, polo que a relación entre estes índices e a asimilación dos nutrientes da microalga tampouco é directa.

A evolución do perfil de ácidos graxos do rotífero reflectiu con máis exactitude a composición de T-ISO, xa que a maioría das tendencias observadas tiveron o seu punto de inflexión na taxa de renovación do 40% que marcou a saturación por nitróxeno nos cultivos de microalga. Porén, as modificacións no perfil de ácidos graxos dos rotíferos foron menores que as provocadas en T-ISO pola taxa de renovación. O contido de ácidos graxos nos rotíferos enriquecidos duplicou o dos rotíferos control e experimentou a mesma evolución que os lípidos, incrementándose lixeiramente nos rotíferos alimentados con microalga das taxas de renovación do 40% e 50%. Porén foi moi similar en tódolos grupos, entre 16,3 e 18,1 ng/individuo. Tampouco se obtiveron grandes cambios nas proporcións de ácidos graxos saturados e insaturados do rotífero. A porcentaxe de ácidos graxos saturados e mais monoinsaturados descendeu ata a taxa de renovación do 40%, pasando do 68,83% ao 61,18%. O contido por rotífero non variou coa taxa de renovación, manténdose entre 10,6 e 11,0 ng/rotífero. Os ácidos graxos poliinsaturados incrementáronse en porcentaxe e pasaron do 30,06% na taxa de renovación do 10% ao 35,90% na taxa de renovación do 40%. En contido mantivéronse arredor dos 5 ng/rotífero nas taxas de renovación do 10% ao 30%, e incrementáronse ata 6,6 ng/rotífero na taxa de renovación do

40%, descendendo a 6,1 ng/rotífero na taxa de renovación do 50% (Táboa 3, Figura 5).

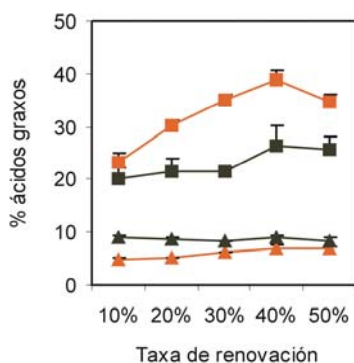


**Figura 5.** Evolución do contido de ácidos graxos totais, saturados + monoinsaturados e poliinsaturados de *Brachionus plicatilis*, expresados en porcentaxe (A) ou en ng de ácido graxo por rotífero (B). -▲-, ácidos graxos saturados + monoinsaturados; -●-, ácidos graxos poliinsaturados; -■-, ácidos graxos totais.

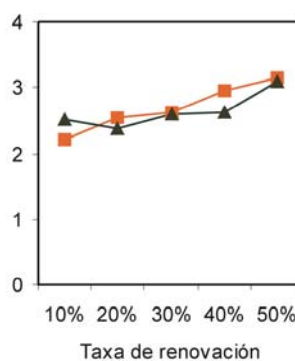
Os ácidos graxos máis abundantes nos rotíferos enriquecidos foron 14:0, 16:0, 18:1 $\omega$ -9 e 18:4 $\omega$ -3, todos presentes en porcentaxes superiores ao 10% en tódalas taxas de renovación. Tamén se atoparon cantidades importantes de 16:1 $\omega$ -7, 18:2 $\omega$ -6, 18:3 $\omega$ -3 e 22:6 $\omega$ -3 (DHA), de maneira que o perfil de ácidos graxos dos rotíferos reflectiu o de T-ISO. O 14:0 e o 16:1 $\omega$ -7 incrementáronse coa taxa de renovación tanto en porcentaxe como en contido por rotífero, mentres que o contido e a porcentaxe de 18:1 $\omega$ -9 descendieron. As porcentaxes de 16:0 e 18:2 $\omega$ -6 descendieron lixeiramente, pero os seus respectivos contidos por individuo mantivéronse bastante constantes en tódalas taxas de renovación (Táboa 3).

Os ácidos graxos poliinsaturados 18:3 $\omega$ -3, 18:4 $\omega$ -3 e 22:6 $\omega$ -3 incrementáronse coa taxa de renovación en porcentaxe e contido por rotífero (Táboa 3). O 18:4 $\omega$ -3, o ácido graxo poliinsaturado máis abundante nos rotíferos enriquecidos con T-ISO, pasou de representar o 9,79% dos ácidos graxos na taxa de renovación do 10% ao 14,35% na taxa de renovación do 40%, e o seu contido pasou de 1,61 a 2,66 ng/rotífero. A porcentaxe de DHA foi sensiblemente menor, e incrementouse de 3,42% a 5,06% entre as taxas de renovación do 10% e o

40%. O contido de DHA incrementouse en cambio de forma continua, e dos 0,70 ng/rotífero na taxa de renovación do 10% pasou a 0,90 ng/rotífero na taxa de renovación do 50%. En conxunto, os ácidos graxos  $\omega$ -3 incrementáronse desde o 20% na taxa de renovación do 10% ao 26,5% na taxa de renovación do 40%, pero estes incrementos son notablemente inferiores aos obtidos na microalga (Figura 6; Táboa 3). Polo contrario, as porcentaxes de  $\omega$ -6, entre o 8% e o 9%, foron superiores no rotífero. Dado que non sufriron case modificacións coa taxa de renovación, a relación  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 incrementouse coa taxa de renovación, pasando de 2,22 nos rotíferos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 10% a 3,14 nos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 50%. A relación EPA:ARA mantívose constante, entre 2,05 e 2,14, e a relación DHA:EPA incrementouse lixeiramente coa taxa de renovación, de 2,51 a 3,10 (Figura 7).



**Figura 6.** Evolución das porcentaxes de ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 en T-ISO e *Brachionus plicatilis*. -■-,  $\omega$ -3 en T-ISO; -■-,  $\omega$ -3 en *B. plicatilis*; -▲-,  $\omega$ -6 en T-ISO; -▲-,  $\omega$ -6 en *B. plicatilis*.



**Figura 7.** Evolución das relacións  $\omega$ -3: $\omega$ -6 e DHA:EPA en *Brachionus plicatilis*. -■-,  $\omega$ -3: $\omega$ -6; -▲-, DHA:EPA.

A marcada influencia do perfil de ácidos graxos de T-ISO no perfil de ácidos graxos no rotífero maniféstase na existencia de correlacións lixeiramente positivas para as porcentaxes de  $\omega$ -3 e DHA (Figura 8), xa observadas por Rodríguez Rainuzzo *et al.* (1989) en rotíferos enriquecidos con distintas dietas durante 24 horas. A correlación entre as porcentaxes da suma de ácidos graxos saturados e monoinsaturados foi tamén relativamente elevada,  $R^2=0,61$ . No caso



dos ácidos graxos poliinsaturados reduciuse a  $R^2=0,52$ , e non houbo correlación entre as porcentaxes de  $\omega$ -6 de T-ISO e do rotífero.

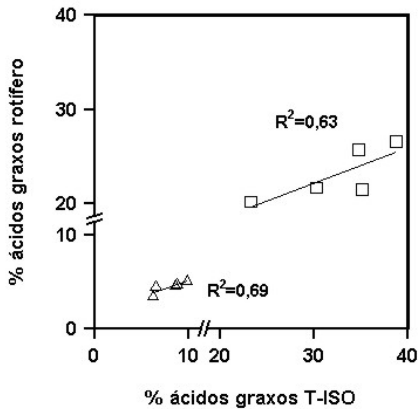


Figura 8. Correlacións entre a porcentaxe de  $\omega$ -3 ( $\square$ ) e DHA ( $\Delta$ ) en T-ISO e *B. plicatilis*.

Os resultados obtidos poñen de manifesto a importancia das condicións de cultivo da microalga, neste caso T-ISO, para obter rotíferos cunha composición bioquímica apropiada para ser empregado como alimento vivo no cultivo larvario de peixes ou crustáceos. T-ISO procedente de cultivos limitados por nitróxeno deu lugar a rotíferos cun contido de proteínas e ácidos graxos  $\omega$ -3 e un valor calórico baixos, independentemente do grado de limitación por nutrientes ao que estiveran sometidos os cultivos de microalga. A sobreesaturación por nitróxeno nos cultivos de T-ISO da taxa de renovación do 50% non deu lugar a unha diminución do valor nutritivo da microalga senón que favoreceu a asimilación dos nutrientes por parte do rotífero. Non se atopou unha explicación clara para este fenómeno, pero debe terse en conta á hora de establecer un sistema de cultivo para obter unha biomasa microalgal coa maior calidade nutritiva posible.

**Táboa 1.** Aporte de alimento, valor calórico e eficiencia de conversión en *Brachionus plicatilis* enriquecido con *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada con cinco taxas de renovación.

	<b>Taxa de renovación</b>				
	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	<b>40%</b>	<b>50%</b>
<b>T-ISO subministrada (µg/ml)</b>	110,20	104,71	78,27	78,67	96,78
<b>T-ISO consumida (µg/ml)</b>	92,94	97,79	75,17	61,77	76,76
<b>Peso orgánico consumido (µg/ml)</b>	91,38	79,99	60,33	50,37	46,19
<b>Células consumidas/rot</b>	22.800	25.200	25.900	21.200	21.400
<b>Rotíferos/ml ás 24 h</b>	189,67	199,67	212	184,67	172,67
<b>Produtividade neta rotífero (µg/ml)</b>	36,19	36,19	36,64	47,86	58,89
<b>Produtividade orgánica neta rotífero (µg/ml)</b>	18,81	18,16	20,74	25,92	32,16
<b>FCR (Biomasa T-ISO subministrada/ incremento biomasa de rotífero)</b>	3,1	2,9	2,1	1,6	1,6
<b>FCR (Biomasa T-ISO inxerida/ incremento biomasa de rotífero)</b>	2,6	2,7	2,1	1,3	1,3
<b>FCR orgánica (Biomasa orgánica T-ISO inxerida/ incremento biomasa orgánica de rotífero)</b>	4,9	4,4	2,9	1,9	1,4
<b>Valor calórico consumido/rot (10<sup>-3</sup> J)</b>	11,61	10,44	8,22	7,02	6,64
<b>Valor calórico/rot</b>	4,20	3,78	4,00	5,29	6,40
<b>Composición de T-ISO</b>					
<b>Proteína (pg/célula)</b>	3,41	3,63	3,48	5,01	4,16
<b>Lípidos (pg/célula)</b>	6,47	5,32	4,23	4,18	4,22
<b>Glúcidos (pg/célula)</b>	10,19	6,91	3,92	2,69	2,54
<b>Total orgánico</b>	20,07	15,86	11,83	11,88	10,91
<b>% proteína recuperada</b>	67,52	58,15	72,33	63,86	95,07
<b>% lípido recuperado</b>	13,00	13,01	15,02	23,48	26,68
<b>% glúcido recuperado</b>	7,70	11,50	24,94	45,44	54,82

**Táboa 2.** Composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* enriquecido coa microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en réxime semicontinuo con cinco taxas de renovación diferentes e unha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

	Taxa de renovación					
	Control	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %
<b>Peso seco (ng/rotífero<math>\pm</math>std)</b>	115,30 $\pm$ 16,28	312,38 $\pm$ 18,81	296,76 $\pm$ 59,49	281,62 $\pm$ 41,62	384,06 $\pm$ 5,67	474,63 $\pm$ 104,62
<b>Proteína (ng/rotífero<math>\pm</math>std)</b>	34,67 $\pm$ 1,65	100,22 $\pm$ 12,94	91,76 $\pm$ 10,01	98,78 $\pm$ 1,80	128,22 $\pm$ 11,91	158,36 $\pm$ 9,90
<b>Lípidos (ng/rotífero<math>\pm</math>std)</b>	9,73 $\pm$ 1,76	33,68 $\pm$ 1,85	28,45 $\pm$ 4,55	28,31 $\pm$ 3,83	38,43 $\pm$ 2,36	44,94 $\pm$ 12,11
<b>Glúcidos (ng/rotífero<math>\pm</math>std)</b>	5,47 $\pm$ 1,01	27,81 $\pm$ 3,06	26,96 $\pm$ 2,52	30,37 $\pm$ 1,71	41,21 $\pm$ 2,39	49,02 $\pm$ 2,25
<b>Peso orgánico (ng/rotífero)</b>	49,87	161,08	147,17	157,46	207,86	252,32
<b>Valor calórico (<math>10^{-3}</math> J/rotífero)</b>	1,31	4,20	3,78	4,00	5,28	6,39
<b>% proteína</b>	30,07	32,25	31,36	35,54	33,42	34,44
<b>% lípidos</b>	8,44	10,78	9,59	10,05	10,01	9,47
<b>% glúcidos</b>	4,74	8,96	9,22	11,00	10,73	10,70
<b>Total orgánico</b>	43,25	51,99	50,17	56,59	54,16	54,61
<b>% proteína na F. O.</b>	69,52	62,03	62,51	62,80	61,71	63,08
<b>% lípidos na F. O.</b>	19,51	20,73	19,11	17,76	18,48	17,34
<b>% glúcidos na F. O.</b>	10,96	17,23	18,38	19,44	19,81	19,59

**Táboa 3.** Composición de ácidos graxos de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en réxime semicontinuo con cinco taxas de renovación diferentes.

Ácido graxo	Taxa de renovación											
	Control		10%		20%		30%		40%		50%	
	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot
<b>12:0</b>	<b>1,06</b>	<b>0,083</b>	<b>0,61</b>	<b>0,098</b>	<b>0,55</b>	<b>0,094</b>	<b>0,84</b>	<b>0,146</b>	<b>1,10</b>	<b>0,189</b>	<b>2,01</b>	<b>0,365</b>
			±0,15	±0,012	±0,42	±0,075	±0,49	±0,098	±0,40	±0,039	±0,99	±0,186
<b>14:0</b>	<b>7,36</b>	<b>0,580</b>	<b>12,14</b>	<b>1,991</b>	<b>12,42</b>	<b>2,066</b>	<b>14,51</b>	<b>2,474</b>	<b>12,25</b>	<b>2,198</b>	<b>15,78</b>	<b>2,831</b>
			±1,46	±0,363	±2,10	±0,355	±2,50	±0,720	±1,05	±0,261	±2,10	±0,355
<b>16:0</b>	<b>22,46</b>	<b>1,770</b>	<b>16,85</b>	<b>2,725</b>	<b>15,56</b>	<b>2,583</b>	<b>15,77</b>	<b>2,633</b>	<b>13,47</b>	<b>2,411</b>	<b>14,59</b>	<b>2,618</b>
			±2,61	±0,097	±1,37	±0,147	±1,05	±0,236	±1,37	±0,247	±0,53	±0,118
<b>16:1 (ω-9)</b>	<b>1,84</b>	<b>0,145</b>	<b>3,67</b>	<b>0,636</b>	<b>3,65</b>	<b>0,628</b>	<b>1,53</b>	<b>0,242</b>	<b>0,99</b>	<b>0,173</b>	<b>1,58</b>	<b>0,288</b>
			±4,11	±0,755	±4,52	±0,793	±0,98	±0,115	±0,24	±0,011	±0,60	±0,119
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>14,24</b>	<b>1,122</b>	<b>6,23</b>	<b>0,985</b>	<b>6,10</b>	<b>0,994</b>	<b>8,46</b>	<b>1,427</b>	<b>7,97</b>	<b>1,448</b>	<b>8,83</b>	<b>1,586</b>
			±4,51	±0,717	±4,48	±0,719	±0,53	±0,267	±0,10	±0,318	±0,72	±0,155
<b>16:2 (ω-6)</b>	<b>0,09</b>	<b>0,007</b>	<b>0,21</b>	<b>0,035</b>	<b>0,29</b>	<b>0,049</b>	<b>0,36</b>	<b>0,061</b>	<b>0,33</b>	<b>0,060</b>	<b>0,38</b>	<b>0,068</b>
			±0,02	±0,007	±0,04	±0,007	±0,03	±0,013	±0,02	±0,015	±0,03	±0,001
<b>16:2 (ω-4)</b>	<b>0,92</b>	<b>0,072</b>	<b>0,90</b>	<b>0,147</b>	<b>0,59</b>	<b>0,099</b>	<b>0,40</b>	<b>0,067</b>	<b>0,49</b>	<b>0,079</b>	<b>0,41</b>	<b>0,075</b>
			±0,04	±0,020	±0,04	±0,008	±0,03	±0,012	±0,38	±0,056	±0,26	±0,047
<b>18:0</b>	<b>8,35</b>	<b>0,658</b>	<b>4,64</b>	<b>0,744</b>	<b>4,02</b>	<b>0,669</b>	<b>3,95</b>	<b>0,647</b>	<b>3,75</b>	<b>0,672</b>	<b>3,45</b>	<b>0,622</b>
			±1,39	±0,135	±0,38	±0,062	±1,08	±0,076	±0,37	±0,074	±0,30	±0,098
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>14,02</b>	<b>1,105</b>	<b>16,99</b>	<b>2,782</b>	<b>15,32</b>	<b>2,545</b>	<b>13,62</b>	<b>2,263</b>	<b>12,54</b>	<b>2,276</b>	<b>10,83</b>	<b>1,946</b>
			±0,43	±0,358	±0,66	±0,084	±1,65	±0,094	±0,25	±0,478	±1,13	±0,221
<b>18:1 (ω-7)</b>	<b>6,82</b>	<b>0,537</b>	<b>2,48</b>	<b>0,422</b>	<b>4,38</b>	<b>0,728</b>	<b>4,07</b>	<b>0,682</b>	<b>4,25</b>	<b>0,771</b>	<b>1,68</b>	<b>0,321</b>
			±1,36	±0,254	±0,15	±0,032	±0,14	±0,085	±0,06	±0,153	±2,02	±0,400
<b>18:2 (ω-6)</b>	<b>3,93</b>	<b>0,310</b>	<b>6,94</b>	<b>1,137</b>	<b>6,74</b>	<b>1,121</b>	<b>6,34</b>	<b>1,062</b>	<b>6,65</b>	<b>1,215</b>	<b>6,01</b>	<b>1,080</b>
			±0,24	±0,154	±0,20	±0,042	±0,24	±0,116	±0,35	±0,321	±0,52	±0,107
<b>18:3 (ω-6)</b>	<b>0,75</b>	<b>0,059</b>	<b>0,61</b>	<b>0,090</b>	<b>0,18</b>	<b>0,029</b>	<b>0,34</b>	<b>0,058</b>	<b>0,59</b>	<b>0,104</b>	<b>0,55</b>	<b>0,100</b>
			±0,77	±0,107	±0,04	±0,008	±0,05	±0,015	±0,14	±0,016	±0,09	±0,020
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>2,19</b>	<b>0,172</b>	<b>4,48</b>	<b>0,734</b>	<b>4,99</b>	<b>0,830</b>	<b>4,84</b>	<b>0,814</b>	<b>5,94</b>	<b>1,100</b>	<b>5,46</b>	<b>0,979</b>
			±0,28	±0,118	±0,27	±0,064	±0,13	±0,128	±0,84	±0,394	±0,45	±0,075
<b>18:4 (ω-3)</b>	<b>2,08</b>	<b>0,164</b>	<b>9,79</b>	<b>1,864</b>	<b>11,20</b>	<b>1,878</b>	<b>11,15</b>	<b>1,878</b>	<b>14,35</b>	<b>2,659</b>	<b>13,64</b>	<b>2,445</b>
			±0,62	±0,266	±0,66	±0,151	±0,52	±0,323	±2,20	±0,975	±0,92	±0,105

<b>20:0</b>	<b>0,25</b>	<b>0,020</b>	<b>0,15</b> ±0,03	<b>0,025</b> ±0,003	<b>0,06</b> ±0,06	<b>0,011</b> ±0,010	<b>0,11</b> ±0,03	<b>0,018</b> ±0,002	<b>0,11</b> ±0,01	<b>0,019</b> ±0,002	<b>0,10</b> ±0,01	<b>0,017</b> ±0,003
<b>20:1 (ω-9)</b>	<b>1,95</b>	<b>0,154</b>	<b>2,30</b> ±0,08	<b>0,377</b> ±0,048	<b>2,30</b> ±0,44	<b>0,382</b> ±0,075	<b>2,17</b> ±0,15	<b>0,363</b> ±0,029	<b>2,15</b> ±0,10	<b>0,392</b> ±0,100	<b>1,86</b> ±0,36	<b>0,334</b> ±0,062
<b>20:2 (ω-9)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,039</b>	<b>0,21</b> ±0,20	<b>0,036</b> ±0,037	<b>0,27</b> ±0,13	<b>0,045</b> ±0,021	<b>0,15</b> ±0,00	<b>0,026</b> ±0,003	<b>0,26</b> ±0,10	<b>0,049</b> ±0,030	<b>0,21</b> ±0,16	<b>0,037</b> ±0,026
<b>20:3 (ω-6)</b>	<b>0,72</b>	<b>0,057</b>	<b>0,29</b> ±0,25	<b>0,050</b> ±0,044	<b>0,28</b> ±0,03	<b>0,047</b> ±0,005	<b>0,26</b> ±0,00	<b>0,044</b> ±0,006	<b>0,30</b> ±0,02	<b>0,056</b> ±0,015	<b>0,26</b> 0,04	<b>0,047</b> ±0,008
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>1,94</b>	<b>0,153</b>	<b>0,80</b> ±0,06	<b>0,132</b> ±0,023	<b>0,75</b> ±0,08	<b>0,125</b> ±0,016	<b>0,72</b> ±0,01	<b>0,121</b> ±0,016	<b>0,80</b> ±0,05	<b>0,147</b> ±0,040	<b>0,78</b> ±0,10	<b>0,140</b> ±0,019
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>3,80</b>	<b>0,300</b>	<b>1,65</b> ±0,15	<b>0,271</b> ±0,054	<b>1,61</b> ±0,29	<b>0,268</b> ±0,049	<b>1,52</b> ±0,03	<b>0,256</b> ±0,033	<b>1,72</b> ±0,19	<b>0,316</b> ±0,103	<b>1,61</b> ±0,21	<b>0,288</b> ±0,034
<b>22:0</b>	<b>0,53</b>	<b>0,042</b>	<b>0,06</b> ±0,05	<b>0,011</b> ±0,009	<b>0,25</b> ±0,15	<b>0,041</b> ±0,027	<b>0,30</b> ±0,17	<b>0,053</b> ±0,033	<b>0,27</b> ±0,18	<b>0,043</b> ±0,027	<b>0,25</b> ±0,18	<b>0,047</b> ±0,035
<b>22:1 (ω-9)</b>	<b>0,21</b>	<b>0,016</b>	<b>0,41</b> ±0,04	<b>0,067</b> ±0,014	<b>0,20</b> ±0,19	<b>0,033</b> ±0,030	<b>0,12</b> ±0,01	<b>0,020</b> ±0,002	<b>0,19</b> ±0,13	<b>0,037</b> ±0,034	<b>0,23</b> ±0,22	<b>0,040</b> ±0,037
<b>22:5 (ω-6)</b>	<b>0,00</b>	<b>0,000</b>	<b>4,18</b> ±1,12	<b>0,563</b> ±0,119	<b>3,85</b> ±1,14	<b>0,739</b> ±0,118	<b>3,82</b> ±0,47	<b>0,777</b> ±0,282	<b>4,49</b> ±0,48	<b>0,911</b> ±0,140	<b>5,01</b> ±1,02	<b>0,807</b> ±0,082
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>4,01</b>	<b>0,316</b>	<b>3,42</b> ±0,35	<b>0,698</b> ±0,254	<b>4,43</b> ±0,52	<b>0,642</b> ±0,197	<b>4,66</b> ±0,91	<b>0,668</b> ±0,128	<b>5,06</b> ±0,42	<b>0,825</b> ±0,263	<b>4,49</b> ±0,28	<b>0,898</b> ±0,172
<b>Total</b>		<b>7,88</b>		<b>16,364</b> ±1,864		<b>16,632</b> ±0,680		<b>16,798</b> ±2,345		<b>18,150</b> ±3,816		<b>17,979</b> ±1,403
<b>Saturados</b>	<b>40,01</b>	<b>3,15</b>	<b>36,75</b> ±3,73	<b>5,592</b> ±0,196	<b>35,16</b> ±2,50	<b>5,463</b> ±0,475	<b>37,64</b> ±1,05	<b>5,971</b> ±0,968	<b>33,10</b> ±3,26	<b>5,533</b> ±0,514	<b>38,04</b> ±2,65	<b>6,501</b> ±0,669
<b>Monoinsaturados</b>	<b>39,07</b>	<b>3,08</b>	<b>32,08</b> ±1,60	<b>5,268</b> ±0,840	<b>31,94</b> ±0,71	<b>5,310</b> ±0,140	<b>29,97</b> ±2,42	<b>4,996</b> ±0,329	<b>28,09</b> ±0,25	<b>5,098</b> ±1,068	<b>25,02</b> ±1,76	<b>4,515</b> ±0,681
<b>Sat+mono</b>	<b>79,09</b>	<b>6,23</b>	<b>68,83</b> ±2,41	<b>10,861</b> ±0,933	<b>67,10</b> ±2,33	<b>10,773</b> ±0,454	<b>67,61</b> ±1,93	<b>10,967</b> ±1,295	<b>61,18</b> ±3,26	<b>10,630</b> ±1,582	<b>63,06</b> ±2,82	<b>11,016</b> ±1,213
<b>Poliinsaturados</b>	<b>20,91</b>	<b>1,65</b>	<b>30,06</b> ±2,14	<b>4,940</b> ±0,873	<b>30,76</b> ±2,72	<b>5,120</b> ±0,540	<b>30,04</b> ±0,70	<b>5,054</b> ±0,788	<b>35,90</b> ±3,65	<b>6,609</b> ±2,100	<b>34,31</b> ±2,93	<b>6,156</b> ±0,494
<b>ω-3</b>	<b>12,07</b>	<b>0,95</b>	<b>20,10</b> ±2,01	<b>3,312</b> ±0,686	<b>21,65</b> ±2,35	<b>3,605</b> ±0,454	<b>21,46</b> ±0,75	<b>3,616</b> ±0,607	<b>26,49</b> ±3,62	<b>4,900</b> ±1,731	<b>25,71</b> ±2,48	<b>4,611</b> ±0,380
<b>ω-6</b>	<b>7,92</b>	<b>0,62</b>	<b>9,06</b> ±0,48	<b>1,481</b> ±0,175	<b>8,51</b> ±0,36	<b>1,416</b> ±0,078	<b>8,18</b> ±0,20	<b>1,372</b> ±7,001	<b>8,93</b> ±0,42	<b>1,631</b> ±0,425	<b>8,19</b> ±0,73	<b>1,471</b> ±0,143
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>1,52</b>	<b>1,52</b>	<b>2,22</b> ±0,23	<b>2,222</b> ±0,226	<b>2,54</b> ±0,19	<b>2,539</b> ±0,186	<b>2,63</b> ±0,13	<b>2,626</b> ±0,128	<b>2,96</b> ±0,26	<b>2,959</b> ±0,265	<b>3,14</b> ±0,08	<b>3,139</b> ±0,082
<b>EPA : ARA</b>	<b>1,96</b>	<b>1,96</b>	<b>2,05</b> ±0,06	<b>2,051</b> ±0,064	<b>2,13</b> ±0,14	<b>2,130</b> ±0,143	<b>2,11</b> ±0,05	<b>2,112</b> ±0,052	<b>2,14</b> ±0,13	<b>2,139</b> ±0,128	<b>2,07</b> ±0,08	<b>2,069</b> ±0,083
<b>DHA : EPA</b>	<b>1,05</b>	<b>1,05</b>	<b>2,51</b> ±0,50	<b>2,514</b> ±0,497	<b>2,36</b> ±0,36	<b>2,356</b> ±0,357	<b>2,60</b> ±0,18	<b>2,598</b> ±0,179	<b>2,62</b> ±0,03	<b>2,616</b> ±0,030	<b>3,10</b> 0,25	<b>3,098</b> ±0,248



## **Capítulo 6.**

---

**Enriquecimiento de *Brachionus plicatilis*  
durante 24 h con *Nannochloropsis gaditana*  
cultivada en sistema semicontinuo  
con intensidad luminosa elevada**





## **Introdución**

No capítulo 5 observouse que o enriquecemento durante 24 h con T-ISO cultivada en réxime semicontínuo con diferentes taxas de renovación xeraba unha gran variabilidade na composición bioquímica de *Brachionus plicatilis*. A porcentaxe de incorporación dos compoñentes orgánicos da microalga por unidade de volume de cultivo de rotíferos incrementouse coa taxa de renovación, pero por individuo o incremento do contido orgánico unicamente se produciu coas microalgas cultivadas con suficiencia de nutrientes, que deron tamén lugar aos máximos contidos de DHA.

As microalgas do xénero *Nannochloropsis* son frecuentemente utilizadas para o enriquecemento de rotíferos debido principalmente ao seu contido de EPA. Dado que a taxa de renovación no cultivo semicontínuo produciu grandes modificacións na composición bioquímica de *N. gaditana*, neste experimento estudouse o efecto da taxa de renovación sobre a composición dos rotíferos enriquecidos durante 24 h con esta microalga.

## **Deseño experimental**

Os rotíferos da especie *Brachionus plicatilis* mantivéronse en botellóns de 6 l privados de alimento durante 12 horas. Transcorrido ese período filtráronse a través dunha malla de 40  $\mu\text{m}$  de luz, laváronse con auga destilada e transferíronse a botellas que contiñan o volume de cultivo de *Nannochloropsis gaditana* cultivada con cinco taxas de renovación e unha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Capítulo 4) necesario para o aporte de 85.700 células/rotífero. Engadiuse auga de mar autoclavada ata completar 700 ml, sendo a densidade de 200 rotíferos por mililitro. Aplicouse aireación suave para que tanto o alimento como os rotíferos se distribuíran uniformemente por toda a columna de auga. Antes de comezar o experimento recolleuse unha cantidade de rotíferos que constitúe a mostra control.

Transcorridas 24 horas, os rotíferos que foran alimentados recolléronse. Os 700 ml de cultivo distribuíronse da seguinte maneira: 100 ml recolléronse para

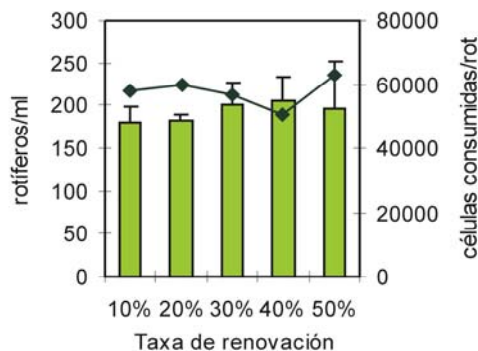
determinación de peso seco, 80 ml recolléronse nunha malla de 40 µm de luz e conxeláronse para análise dos ácidos graxos e 520 ml recolléronse nunha malla, pasáronse a tubos de vidro, conxeláronse e posteriormente liofilizáronse para realizar determinacións de proteínas, lípidos, glúcidos e análise elemental de carbono, nitróxeno, xofre, hidróxeno e metais.

## **Resultados e discusión**

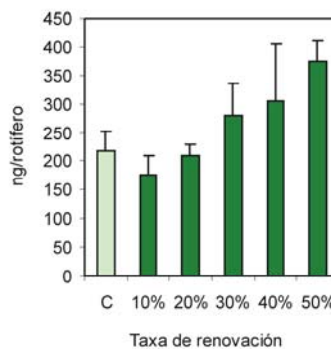
Igual que aconteceu no enriquecemento con T-ISO, transcorridas as 24 h a densidade de rotíferos por ml de cultivo variou respecto á inicial (Figura 1; Táboa 1). Porén, houbo unha diferenza importante, xa que a densidade soamente descendeu nos cultivos que recibiron *N. gaditana* limitada por nitróxeno, é dicir, das taxas de renovación do 10% e do 20%. A densidade nos cultivos que recibiron microalga da taxa de renovación do 50% foi de 195,3 rotíferos/ml, pero é probable que a media descendera debido a unha mala manipulación dunha das réplicas. O peso seco dos rotíferos control recollidos antes de comezar o experimento,  $217,53 \pm 34,27$  ng/individuo (Figura 2; Táboa 2), foi o dobre dos rotíferos control do Capítulo 5, polo que o seu estado fisiolóxico foi mellor e non sufriron unha mortalidade tan grande.

A cantidade de *Nannochloropsis gaditana* empregada neste experimento calculouse en base aos datos de Patiño (1995) para subministrar unha cantidade de microalga por rotífero equivalente en peso a 2.000 *Tetraselmis suecica*, considerando un peso medio de 5 pg/célula para *N. gaditana*. Así, a cantidade media de microalga por rotífero foi de 428 ng, que pode considerarse suficiente dada a presenza de células sobrantes no medio de cultivo despois de 24 horas de alimentación. O recuento destas células amosa un descenso no consumo ata a taxa de renovación do 40%, de 58.000 a 50.000 células/rotífero, e un incremento ata as 63.000 células/rotífero na taxa de renovación do 50% (Figura 1). Porén, Rothhaupt (1995) observou que a baixa calidade nutricional do alimento non afectaba á taxa de inxestión de *Brachionus rubens*, así que tal e como xa se describiu para T-ISO (Capítulo 5) non se pode descartar que algunhas células de *Nannochloropsis* procedentes de taxas de renovación elevadas se dividisen nos cultivos de rotíferos, o que nos levaría a subestimar o consumo.

O peso seco dos rotíferos duplicouse, incrementándose linealmente, entre as taxas de renovación do 10% e o 50%, pero o peso seco dos alimentados con microalgas das taxas de renovación do 10% e 20% foi menor que o peso dos rotíferos control (Figura 2, Táboa 2). O peso seco dos rotíferos amosa unha tendencia case inversa á de *N. gaditana* en cultivo semicontínuo, que diminuíu de peso a medida que aumentaba a taxa de renovación (Capítulo 4), pero ambos parámetros non están linealmente correlacionados ( $R^2=0,413$ ). A produción neta de biomasa tamén se incrementou coa taxa de renovación. En consecuencia, a FCR (relación entre o peso inxerido de *N. gaditana* e a produción neta de biomasa de rotífero por ml) diminuíu coa taxa de renovación. O descenso da biomasa de rotífero respecto da inicial nas taxas de renovación do 10% e do 20% dá lugar a valores negativos. Isto significa que os rotíferos non foron capaces de asimilar estas microalgas, ou ben o fixeron de maneira moi limitada, o que provocou un descenso do peso individual, ademais de mortalidades. Entre as taxas de renovación do 30% e o 50%, a FCR diminuíu de 4,5 a 2,0, e a FCR orgánica pasou de 4,0 a 1,8 (Táboa 1).



**Figura 1.** Densidade de rotíferos (■) e número de células inxeridas (-◆-) despois do enriquecemento durante 24 h con *N. gaditana*.



**Figura 2.** Peso seco dos rotíferos control (C) e dos alimentados con *N. gaditana* cultivada en réxime semicontínuo con distintas taxas de renovación.

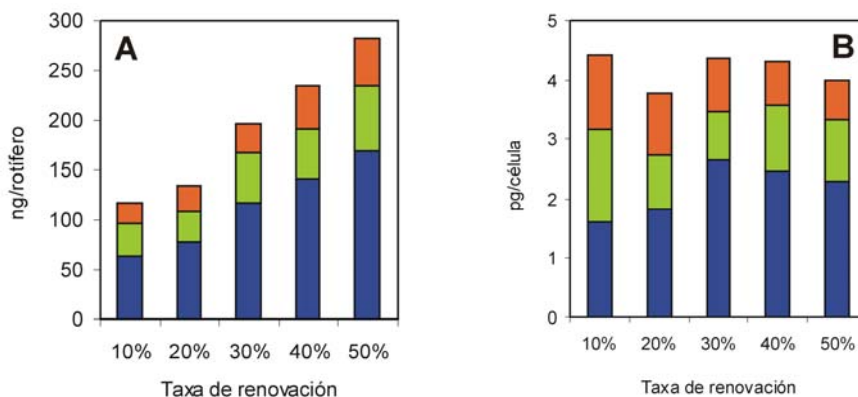
As células de *N. gaditana* cultivadas en condicións de limitación por nitróxeno conteñen elevadas cantidades de glúcidos e ácidos graxos saturados, que compoñen a grosa parede celular e os lípidos de reserva. A evolución de peso seco dos rotíferos debeuse probablemente a unha dixestión ineficiente destas

células. Esta hipótese podería confirmarse atendendo aos datos dos rotíferos alimentados coas microalgas das taxas de renovación do 20% e 30%. Os dous tipos de microalgas pesan practicamente o mesmo, 4,98 pg/célula as cultivadas coa taxa de renovación do 20% e 4,96 pg/célula as cultivadas con taxa de renovación do 30%, pero a dispoñibilidade de nitróxeno foi distinta en cada cultivo, sendo limitante na taxa de renovación do 20% e non limitante na taxa de renovación do 30%. Isto dá lugar a que a composición das microalgas sexa moi diferente no tocante á cantidade de proteína e á composición de ácidos graxos. Os dous grupos de rotíferos, aínda que dispuxeron da mesma cantidade de alimento tanto en peso seco como en número de células, alcanzaron pesos diferentes, o que parece indicar que *Nannochloropsis gaditana* cultivada cunha taxa de renovación do 30% foi mellor asimilada. A redución do contido de glúcidos nas microalgas procedentes das taxas de renovación maiores podería favorecer unha dixestión aínda mellor, a pesar de que o contido de lípidos aumenta lixeiramente e a cantidade de proteína diminúe con respecto á taxa de renovación do 30%.

Da mesma maneira pode explicarse o incremento lineal dos tres compoñentes da fracción orgánica, proteínas, lípidos e glúcidos, a medida que aumenta a taxa de renovación da microalga que serve de alimento, confirmando os resultados obtidos nos rotíferos enriquecidos con T-ISO nos que o incremento da taxa de renovación tamén deu lugar a un incremento do contido orgánico (Capítulo 5).

A proteína foi en tódolos casos o compoñente maioritario. O contido proteico dos rotíferos incrementouse coa taxa de renovación de xeito moito máis marcado que no enriquecemento con T-ISO, multiplicándose por 2,6 desde a taxa de renovación do 10% ata a do 50% e pasando de 64,12 a 169,74 ng/rotífero (Figura 3). Nos rotíferos alimentados coas microalgas cultivadas con taxas de renovación do 10% e 20%, o contido de proteína foi lixeiramente menor que nos rotíferos control, igual que aconteceu co peso seco (Táboa 1), pero nos alimentados coas taxas de renovación superiores a incorporación de proteína aumentou do 29% ao 75%. Estas porcentaxes de recuperación de proteína foron menores que os obtidos no enriquecemento con T-ISO. En *N. gaditana*, o contido

de proteína incrementouse ata a taxa de renovación do 30% e en taxas de renovación superiores experimentou un lixeiro descenso (Figura 3). Así, aínda que a cantidade de proteína presente na dieta se estabiliza na taxa de renovación do 30 %, o contido proteico por rotífero aumenta de forma continua.



**Figura 3.** Composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* (A) e *Nannochloropsis gaditana* (B), expresada en ng/individuo e pg/célula respectivamente. ■, proteína; ■, lípidos; ■, glicidos.

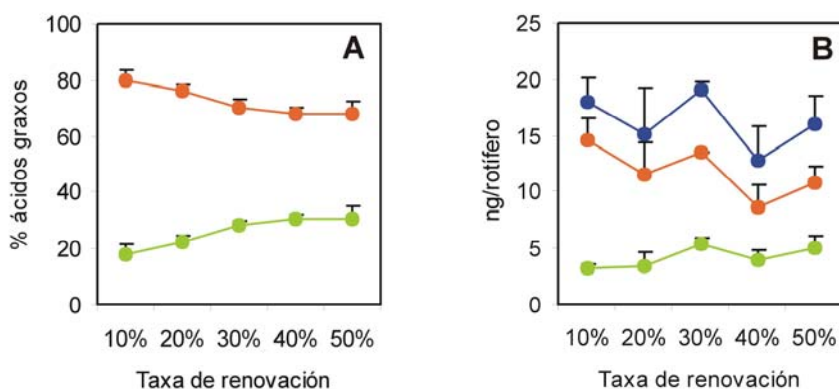
O contido de proteína dun rotífero pode ser incrementado de diferentes maneiras: empregando un alimento rico en proteína (Øie *et al.*, 1997), aumentando a ración (Øie e Olsen, 1997) ou prolongando o período de alimentación (Scott e Baynes, 1978); este último procedemento dá lugar a fortes correlacións positivas entre as porcentaxes de proteína do rotífero e o alimento. A utilización de *Nannochloropsis gaditana* cun alto contido proteico —cultivada en sistema semicontínuo con taxas de renovación altas— incrementou a cantidade de proteína por rotífero en máis do 160% respecto aos rotíferos alimentados con *N. gaditana* cultivada cunha taxa de renovación do 10% (Táboa 2). A pesar de que o peso seco da microalga subministrada diminuíu coa taxa de renovación e polo tanto a cantidade total de alimento foi menor (Capítulo 4, Táboa 1), o aumento do contido proteico dos rotíferos foi notablemente maior do que pode conseguirse multiplicando por seis a cantidade de alimento diario (Øie e Olsen, 1997).

A evolución do contido lipídico de *B. plicatilis* tampouco se correspondeu coa de *N. gaditana*. En *N. gaditana* produciuse un descenso dos lípidos desde a

taxa de renovación do 10% ata a taxa de renovación do 30%, e un novo incremento nas taxas de renovación superiores (Figura 3). Nos rotíferos existíuse un incremento desde 18,92 ng/rotífero nos rotíferos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 10% ata 42,84 ng/rotífero nos que recibiron microalgas cultivadas a unha taxa de renovación do 50% (Figura 3). Isto deu lugar a unha total ausencia de correlación entre a cantidade de lípidos na dieta e nos rotíferos. Tódolos grupos de rotíferos alimentados presentaron maior cantidade de lípidos que o grupo control e polo tanto existíuse recuperación con tódalas taxas de renovación probadas, aínda que nos rotíferos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 10% foi moi baixa, 1,4%. A porcentaxe de recuperación alcanzou o seu valor máximo, 44,6%, na taxa de renovación do 50%. Este valor foi notablemente maior que o máximo obtido con T-ISO.

Os glúcidos comportáronse de maneira totalmente inversa no rotífero e en *N. gaditana*, confirmando os datos obtidos no enriquecemento con T-ISO. Mentres que na microalga o contido de glúcidos descendía coa taxa de renovación, o contido de glúcidos por rotífero multiplicouse por 2,5 desde a taxa de renovación do 10% á de 50%, pasando de 20,31 a 47,19 ng/rotífero (Figura 3). A correlación entre o contido de glúcidos na dieta e o contido de glúcidos por rotífero foi polo tanto negativa e moi forte,  $R^2=0,94$ , superior á obtida nos rotíferos enriquecidos con T-ISO. A cantidade de glúcidos por rotífero no grupo control foi de 23,12 ng. A incorporación de glúcidos tivo lugar a partir da taxa de renovación do 20%, e incrementouse coa taxa de renovación do 4,8% ao 67,5%, que supera o valor máximo obtido nos rotíferos enriquecidos con T-ISO.

O contido orgánico (suma de proteínas, lípidos e glúcidos) dos rotíferos enriquecidos con *N. gaditana*, igual que aconteceu cos enriquecidos con T-ISO, incrementouse coa taxa de renovación da microalga. Cando proteínas, lípidos e glúcidos se representan como porcentaxes da fracción orgánica (suma das cantidades de proteínas, lípidos e mais glúcidos) as diferenzas entre as distintas taxas de renovación son en cambio moi leves, a pesar das grandes variacións ocorridas no contido orgánico dos rotíferos. A porcentaxe de proteína na fracción orgánica oscilou entre o 62% e o 65,4%, a de lípidos entre o 15% e o 18,7% e a de glúcidos entre o 18% e o 20,4% (Táboa 2), uns valores moi similares aos observados nos rotíferos enriquecidos con T-ISO.



**Figura 4.** Evolución do contido de ácidos graxos totais, saturados+monoinsaturados e poliinsaturados de *Brachionus plicatilis*. A: expresado en porcentaxe sobre o total dos ácidos graxos. B: expresado en ng de ácido graxo por individuo. -●-, ácidos graxos totais; -●-, ácidos graxos saturados+monoinsaturados; -●-, ácidos graxos poliinsaturados.

As diferencias ocasionadas pola taxa de renovación no perfil de ácidos graxos do rotífero son moito menos marcadas que as causadas na propia microalga, tanto en *N. gaditana* como en T-ISO. A pesar disto, as variacións do perfil de ácidos graxos do rotífero reflectiron con moita máis fidelidade que o resto da fracción orgánica os cambios ocasionados en *N. gaditana* polas diferentes taxas de renovación, aínda que a variedade de ácidos graxos presentes en *B. plicatilis* é maior que na microalga. En conxunto, produciuse un descenso da porcentaxe da suma de ácidos graxos saturados+monoinsaturados a medida que aumentou a taxa de renovación, pasando de 80,13% na taxa de renovación do 10% a 67,5% na taxa de renovación do 40%, estabilizándose nese punto. Os ácidos graxos poliinsaturados comportáronse de maneira inversa, incrementándose —de 18,09% a 30,79%— coa taxa de renovación (Figura 4; Táboa 3). O contido total de ácidos graxos non amosou unha tendencia clara, e alcanzou o seu valor mínimo nos rotíferos alimentados coa taxa de renovación do 40%, con 12,75 ng/rotífero e o valor máximo coa taxa de renovación do 30%, con 19,14 ng/rotífero (Figura 4; Táboa 3). Estes valores foron similares aos conseguidos co enriquecemento con T-ISO. O contido de ácidos graxos saturados +monoinsaturados tendeu a descender ata a taxa de renovación do 40% de 14,49 a 8,64 ng/rotífero, aínda que se rexistrou un valor anormalmente elevado na taxa de renovación do 30%. O

contido de ácidos graxos poliinsaturados tendeu en cambio a incrementarse ata a taxa de renovación do 50%, de 3,23 a 4,97 ng/rotífero (Figura 4; Táboa 3).

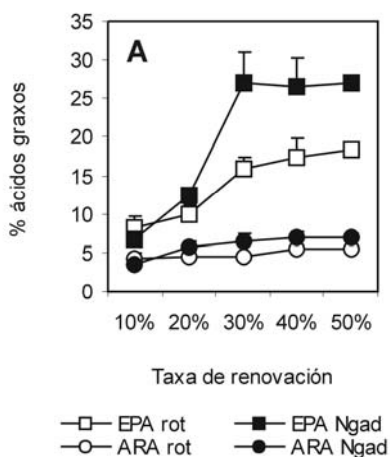
Igual que acontecía en *N. gaditana*, os ácidos graxos máis abundantes en *B. plicatilis* foron 16:0, 16:1 $\omega$ -7 e 20:5 $\omega$ -3 (EPA). A suma dos tres constituíu aproximadamente un 60% do total de ácidos graxos en tódalas taxas de renovación. Varios outros ácidos graxos foron tamén relativamente abundantes e aparecen en porcentaxes superiores ao 4%: 14:0, 18:0, 18:1 $\omega$ -9, 18:1 $\omega$ -7, 18:2 $\omega$ -6 e 20:4 $\omega$ -6 (ácido araquidónico, ARA).

As porcentaxes de 16:0 e 16:1 $\omega$ -7 descenderon lixeiramente coa taxa de renovación, pasando do 25,11% e 24,61% na taxa de renovación do 10% a 22,12% e 20,71% na taxa de renovación do 50% respectivamente. O descenso do contido por rotífero destes ácidos graxos foi máis acusado, aínda que se rexistrou un pequeno incremento na taxa de renovación do 50%. O contido de 16:0 descendeu de 4,55 ng/rotífero na taxa de renovación do 10% a 2,82 ng/rotífero na taxa de renovación do 40%, incrementándose ata 3,52 ng/rotífero na taxa de renovación do 50%. O 16:1 $\omega$ -7 pasou de 4,44 a 2,70 ng/rotífero, aumentando ata 3,33 ng/rotífero na taxa de renovación do 50%. Os ácidos graxos 14:0 e 18:0 non rexistraron variacións dependentes da taxa de renovación e tanto as porcentaxes como o contido por individuo fluctuaron lixeiramente (Táboa 3). Os dous ácidos graxos 18:1 evolucionaron de maneiras opostas. O 18:1 $\omega$ -9 descendeu tanto en porcentaxe como en contido por rotífero desde a taxa de renovación do 10% ata a do 30%. A porcentaxe incrementouse novamente ata a taxa de renovación do 50%, pero o contido por individuo mantívose. Polo contrario, o 18:1 $\omega$ -7 incrementouse entre as taxas de renovación do 10% e 30% e diminuíu nas taxas de renovación superiores; o contido por rotífero experimentou a mesma evolución. A evolución do 18:2 $\omega$ -6 foi igual ao do 18:2 $\omega$ -6 (Táboa 3).

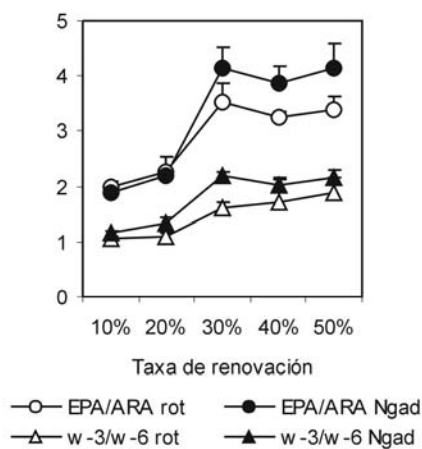
A proporción de EPA duplicouse, pasando dun 8,25 % na taxa de renovación do 10% a un 18,33% na taxa de renovación do 50%. O contido de EPA por rotífero tamén se multiplicou por dous, incrementándose de 1,47 a 2,95 ng/rotífero. A porcentaxe de ácido araquidónico incrementouse lixeiramente coa taxa de renovación, pasando de 4,16% a 5,39%, mentres que o contido de ARA



por rotífero case non experimentou variacións, situándose entre os 0,69 e os 0,86 ng/rotífero. Por tanto, a tendencia destes dous ácidos graxos en *B. plicatilis* foi similar á rexistrada en *N. gaditana*, pero as porcentaxes máximas de EPA foron notablemente máis baixas no rotífero que na microalga (Figura 5; Táboa 3). A relación EPA:ARA pasou de 2,00 a 3,41 (Figura 6; Táboa 3). A evolución dos grupos de ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 foi moi similar ao observado en *N. gaditana*. Os ácidos  $\omega$ -3 experimentaron un forte crecemento desde a taxa de renovación do 10% á do 30%, aumentando lixeiramente nas taxas de renovación superiores, mentres que os  $\omega$ -6 incrementáronse en moito menor grado ata a taxa de renovación do 40%. En consecuencia, A relación  $\omega$ -3: $\omega$ -6 case se duplicou e pasou de 1,05 na taxa de renovación do 10% a 1,88 na taxa de renovación do 50%, experimentando o maior incremento entre as taxas de renovación do 10% e o 30% (Figura 6; Táboa 3).



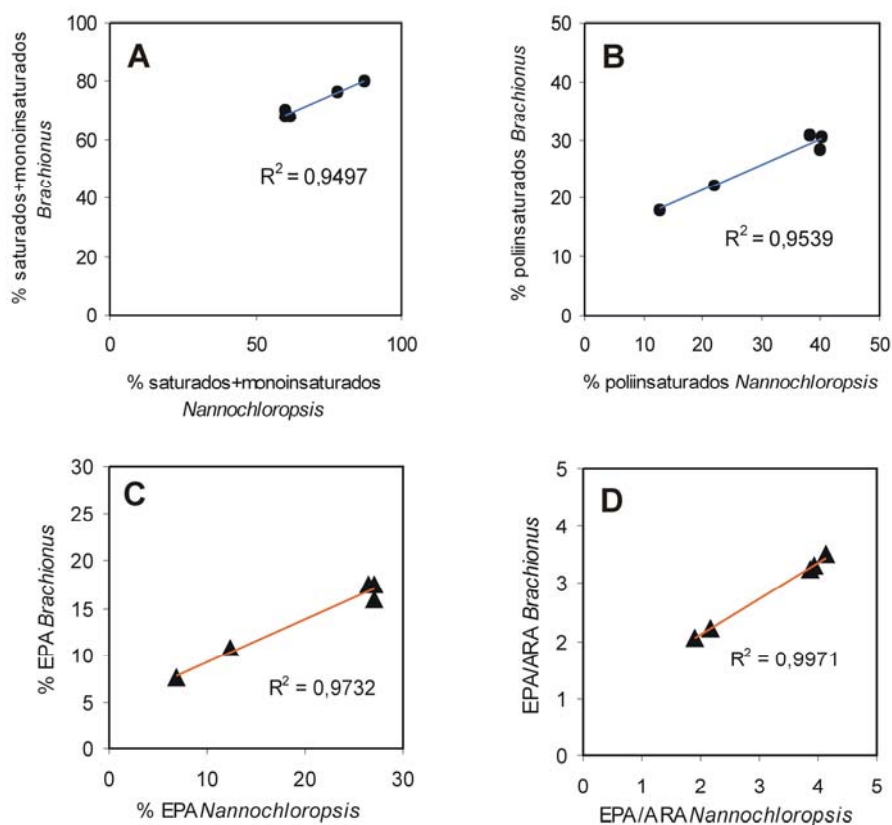
**Figura 5.** Comparación entre as porcentaxes de EPA e ARA en *Nannochloropsis gaditana* e *Brachionus plicatilis*.



**Figura 6.** Comparación entre as relacións EPA:ARA e  $\omega$ -3: $\omega$ -6 en *Nannochloropsis gaditana* e *Brachionus plicatilis*.

Por último, calculáronse as correlacións existentes entre distintas fraccións dos ácidos graxos (suma de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, ácidos graxos poliinsaturados, EPA e relacións EPA:ARA) de *N. gaditana* e *B. plicatilis*. As correlacións resultaron ser positivas e moi elevadas ( $R^2$  superior a 0,9) en tódolos casos, poñéndose de manifesto a gran influencia da microalga no

perfil de ácidos grasos do rotífero (Figura 7). O perfil de ácidos grasos da dieta inflúe no perfil dos rotíferos, pero unhas correlacións tan elevadas non se atoparon na literatura revisada en experimentos de enriquecemento curto (Rodríguez Rainuzzo *et al.*, 1989) nin en experimentos de cultivo de rotíferos de varios días de duración (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Frolov *et al.*, 1991), aínda que si se observaron en *Artemia* (Fábregas *et al.*, 2001).



**Figura 7.** Correlacións entre a composición de ácidos grasos de *Nannochloropsis gaditana* e *Brachionus plicatilis*. A: ácidos grasos saturados+monoinsaturados. B: ácidos grasos poliinsaturados. C: porcentaxes de EPA. D: relacións EPA/ARA.

Os resultados obtidos nos experimentos de enriquecemento de rotíferos con *N. gaditana* e T-ISO son comparables e permiten extraer unha serie de conclusións:

O enriquecemento con microalgas cultivadas en condicións de deficiencia de nutrientes dá lugar a rotíferos cun peso seco e un contido orgánico baixos, independentemente da taxa de renovación e polo tanto do grado de limitación. Este feito manifestouse de maneira distinta nos dous experimentos, probablemente debido ao diferente estado inicial dos rotíferos. Os rotíferos enriquecidos con T-ISO limitada por nutrientes gañaron peso e contido orgánico respecto aos rotíferos control non enriquecidos, pero non houbo diferencias no contido orgánico dos rotíferos causadas pola taxa de renovación, e as variacións do peso seco foron pequenas. Nos rotíferos enriquecidos con *N. gaditana* en condicións de limitación o peso e o contido orgánico incrementáronse lixeiramente coa taxa de renovación pero foron menores que os dos rotíferos control. As microalgas cultivadas con suficientes nutrientes deron lugar a grandes incrementos tanto do peso seco como do contido orgánico do rotífero, que aumentaron coa taxa de renovación.

Nos rotíferos enriquecidos con *Nannochloropsis gaditana* os contidos de proteínas, lípidos e glúcidos incrementáronse coa taxa de renovación á que foi cultivada a microalga, mentres que nos enriquecidos con T-ISO os contidos das tres fraccións orgánicas unicamente se incrementaron nas taxas de renovación saturadas por nitróxeno. Nos dous casos o aumento do contido de proteínas, lípidos e glúcidos nos rotíferos foi independente da evolución dos tres compoñentes nas microalgas.

A produtividade dos cultivos de rotíferos experimentou a mesma evolución que o peso e o contido orgánico individual. A FCR e a FCR orgánica diminuíron co aumento da taxa de renovación. A incorporación dos compoñentes orgánicos da microalga tamén foi en xeral máis eficiente canto maior a taxa de renovación.

O perfil de ácidos graxos do rotífero reflexa o da microalga empregada no enriquecemento e obsérvase a existencia de correlacións positivas, nalgúns casos moi elevadas, entre algunhas fraccións do perfil de ácidos graxos do rotífero e da microalga, especialmente nos ácidos graxos  $\omega$ -3.

Resumindo, confírmase a extrema importancia de controlar as condicións de cultivo das microalgas que vaian ser utilizadas para o enriquecemento de rotíferos, xa que soamente os cultivos microalgais con altas taxas de crecemento e dispoñibilidade de nutrientes son apropiados para mellorar a súa composición bioquímica. Ademais, os cultivos semicontínuos con estas características xeneran elevadas produtividades, o que permitiría, actuando unicamente sobre os parámetros de cultivo da microalga, aumentar o rendemento dos fotobiorreactores, mellorar a composición bioquímica da microalga e enriquecer os rotíferos en proteínas e ácidos graxos  $\omega$ -3, o que posiblemente incrementaría o éxito dos cultivos larvários de peixes.

**Táboa 1.** Aporte de alimento, valor calórico e eficiencia de conversión en *Brachionus plicatilis* enriquecido con *Nannochloropsis gaditana* cultivada con cinco taxas de renovación.

	Taxa de renovación				
	10%	20%	30%	40%	50%
<b><i>N. gaditana</i> subministrada (µg/ml)</b>	106,10	85,36	85,01	89,46	80,73
<b><i>N. gaditana</i> consumida (µg/ml)</b>	74,98	61,54	55,69	52,10	59,81
<b>Peso orgánico consumido (µg/ml)</b>	51,30	44,94	49,41	43,70	50,27
<b>Células consumidas/rot</b>	57.900	59.600	56.400	50.700	63.000
<b>Rotíferos/ml ás 24 h</b>	180,7	183,3	201,5	205	195,3
<b>Produtividade neta rotífero (µg/ml)</b>	- <sup>1</sup>	-	12,64	19,08	29,71
<b>Produtividade orgánica neta rotífero (µg/ml)</b>	-	-	12,35	20,26	26,85
<b>FCR (Biomasa <i>N. gaditana</i> subministrada/ incremento biomasa de rotífero)</b>	-	-	6,72	4,70	2,72
<b>FCR (Biomasa <i>N. gaditana</i> consumida/ incremento biomasa de rotífero)</b>	-	-	4,46	2,85	1,95
<b>FCR orgánica (Biomasa orgánica consumida/ incremento biomasa orgánica de rotífero)</b>	-	-	4,03	2,21	1,83
<b>Valor calórico consumido/rot (10<sup>-3</sup> J)</b>	11,61	10,44	8,22	7,02	6,64
<b>Proteína (pg/célula)</b>	1,60	1,84	2,65	2,45	2,28
<b>Lípidos (pg/célula)</b>	1,57	0,89	0,82	1,12	1,04
<b>Glúcidos (pg/célula)</b>	1,26	1,04	0,92	0,74	0,67
<b>Total orgánico</b>	4,43	3,77	4,38	4,31	3,99
<b>% proteína recuperada</b>	-	-	29,09	61,05	74,92
<b>% lípido recuperado</b>	1,37	9,93	38,27	30,71	44,60
<b>% glúcido recuperado</b>	-	4,86	14,22	61,38	67,52

<sup>1</sup>: valores negativos

**Táboa 2.** Composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* enriquecido con *Nannochloropsis gaditana* cultivada en réxime semicontinuo con cinco taxas de renovación diferentes.

	Taxa de renovación					
	Control	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %
<b>Peso seco (ng/rotífero±std)</b>	217,53 ±34,27	175,52 ±35,12	209,28 ±19,87	278,65 ±58,08	361,83 ±18,63	374,85 ±35,12
<b>Proteína (ng/rotífero±std)</b>	78,32 ±0,57	64,12 ±15,95	77,02 ±6,96	116,66 ±1,57	140,83 ±11,80	169,74 ±10,64
<b>Lípidos (ng/rotífero±std)</b>	18,03 ±0,49	18,92 ±3,06	22,03 ±2,21	33,56 ±1,71	32,37 ±7,99	42,84 ±6,57
<b>Glicidos (ng/rotífero±std)</b>	23,12 ±1,34	20,31 ±0,63	25,40 ±0,85	29,64 ±0,75	42,18 ±0,33	47,19 ±7,56
<b>Total orgánico (prot+líp+glic)</b>	119,46	102,91	124,42	180,00	218,91	259,51
<b>Valor calórico (10<sup>-3</sup> J/rotífero)</b>	2,98	2,62	3,14	4,62	5,36	6,56
<b>% proteína</b>	36,00	36,53	36,80	41,87	38,92	45,28
<b>% lípidos</b>	8,29	10,53	10,51	12,09	9,92	11,36
<b>% glicidos</b>	10,63	11,57	12,14	10,64	11,66	12,59
<b>Total orgánico</b>	54,92	58,63	59,45	64,60	60,50	69,23
<b>% proteína na F. O.</b>	65,55	62,04	61,89	64,86	65,39	65,34
<b>% lípidos na F. O.</b>	15,09	18,31	17,70	18,66	15,03	16,49
<b>% glicidos na F. O.</b>	19,35	19,65	20,41	16,48	19,58	18,16

**Táboa 3.** Composición de ácidos graxos de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis gaditana* cultivada en réxime semicontinuo con cinco taxas de renovación diferentes.

Ácidos graxos	Taxa de renovación											
	Control		10%		20%		30%		40%		50 %	
	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot
<b>12:0</b>	<b>0,47</b>	<b>0,04</b>	<b>0,74</b>	<b>0,14</b>	<b>0,40</b>	<b>0,06</b>	<b>0,42</b>	<b>0,08</b>	<b>0,22</b>	<b>0,03</b>	<b>0,59</b>	<b>0,09</b>
			±0,55	±0,12	±0,18	±0,04	±0,06	±0,01	±0,19	±0,03	±0,13	±0,01
<b>14:0</b>	<b>6,85</b>	<b>0,61</b>	<b>7,90</b>	<b>1,45</b>	<b>6,69</b>	<b>1,00</b>	<b>7,40</b>	<b>1,41</b>	<b>6,64</b>	<b>0,86</b>	<b>6,68</b>	<b>1,07</b>
			±2,29	±0,58	±0,78	±0,24	±1,05	±0,16	±0,91	±0,27	±1,14	±0,22
<b>16:0</b>	<b>21,23</b>	<b>1,90</b>	<b>25,11</b>	<b>4,55</b>	<b>23,54</b>	<b>3,52</b>	<b>21,91</b>	<b>4,19</b>	<b>21,97</b>	<b>2,82</b>	<b>22,12</b>	<b>3,52</b>
			±1,94	±0,84	±1,24	±0,83	±0,83	±0,03	±1,94	±0,80	±2,13	±0,21
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>20,70</b>	<b>1,85</b>	<b>24,61</b>	<b>4,44</b>	<b>24,52</b>	<b>3,66</b>	<b>23,47</b>	<b>4,49</b>	<b>21,15</b>	<b>2,70</b>	<b>20,71</b>	<b>3,33</b>
			±2,13	±0,55	±1,59	±0,82	±0,02	±0,13	±0,93	±0,65	±0,14	±0,52
<b>16:2 (ω-6)</b>	<b>0,19</b>	<b>0,02</b>	<b>0,15</b>	<b>0,03</b>	<b>0,20</b>	<b>0,03</b>	<b>0,31</b>	<b>0,06</b>	<b>0,23</b>	<b>0,03</b>	<b>0,23</b>	0,04
			±0,03	±0,01	±0,05	±0,01	±0,01	±0,00	±0,02	±0,01	±0,02	±0,01
<b>16:2 (ω-4)</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,11</b>	<b>0,02</b>	<b>0,31</b>	<b>0,06</b>	<b>0,22</b>	<b>0,03</b>	<b>0,28</b>	<b>0,05</b>
			±0,08	±0,01	±0,05	±0,01	±0,11	±0,02	±0,06	±0,00	±0,08	±0,02
<b>18:0</b>	<b>3,53</b>	<b>0,32</b>	<b>4,45</b>	<b>0,81</b>	<b>4,01</b>	<b>0,62</b>	<b>3,63</b>	<b>0,69</b>	<b>4,67</b>	<b>0,61</b>	<b>4,19</b>	<b>0,67</b>
			±0,56	±0,17	±0,52	±0,24	±0,25	±0,03	±0,46	±0,21	±0,58	±0,08
<b>18:1 (ω-12)</b>	<b>1,79</b>	<b>0,16</b>	<b>1,26</b>	<b>0,22</b>	<b>1,41</b>	<b>0,21</b>	<b>1,38</b>	<b>0,26</b>	<b>1,21</b>	<b>0,14</b>	<b>1,25</b>	<b>0,20</b>
			±0,31	±0,04	±0,10	±0,05	±0,01	±0,01	±0,57	±0,05	±0,12	±0,04
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>7,71</b>	<b>0,69</b>	<b>8,82</b>	<b>1,58</b>	<b>8,08</b>	<b>1,22</b>	<b>4,88</b>	<b>0,93</b>	<b>6,50</b>	<b>0,83</b>	<b>5,88</b>	<b>0,93</b>
			±1,03	±0,15	±0,27	±0,37	±0,05	±0,04	±0,13	±0,19	±0,91	±0,11
<b>18:1 (ω-7)</b>	<b>6,10</b>	<b>0,55</b>	<b>4,43</b>	<b>0,79</b>	<b>4,98</b>	<b>0,75</b>	<b>5,08</b>	<b>0,97</b>	<b>2,84</b>	<b>0,32</b>	<b>3,66</b>	<b>0,61</b>
			±0,69	±0,05	±0,13	±0,20	±0,08	±0,04	±2,40	±0,20	±2,03	±0,36
<b>18:2 (ω-6)</b>	<b>4,28</b>	<b>0,38</b>	<b>3,01</b>	<b>0,54</b>	<b>4,03</b>	<b>0,62</b>	<b>3,93</b>	<b>0,75</b>	<b>3,41</b>	<b>0,46</b>	<b>3,00</b>	<b>0,50</b>
			±0,52	±0,05	±0,50	±0,24	±0,17	±0,05	±2,39	±0,34	±2,17	±0,40
<b>18:3 (ω-6)</b>	<b>0,57</b>	<b>0,05</b>	<b>0,47</b>	<b>0,08</b>	<b>0,61</b>	<b>0,09</b>	<b>0,83</b>	<b>0,16</b>	<b>0,94</b>	<b>0,12</b>	<b>0,94</b>	<b>0,15</b>
			±0,09	±0,01	±0,01	±0,02	±0,12	±0,03	±0,25	±0,02	±0,12	±0,04
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>1,79</b>	<b>0,16</b>	<b>0,67</b>	<b>0,12</b>	<b>0,89</b>	<b>0,13</b>	<b>0,74</b>	<b>0,14</b>	<b>0,83</b>	<b>0,10</b>	<b>0,73</b>	<b>0,12</b>
			±0,14	±0,01	±0,30	±0,02	±0,05	±0,01	±0,06	±0,02	±0,06	±0,03
<b>18:4 (ω-3)</b>	<b>1,34</b>	<b>0,12</b>	<b>0,31</b>	<b>0,06</b>	<b>0,57</b>	<b>0,09</b>	<b>0,61</b>	<b>0,12</b>	<b>0,69</b>	<b>0,09</b>	<b>0,61</b>	<b>0,10</b>
			±0,29	±0,05	±0,13	±0,04	±0,04	±0,01	±0,07	±0,03	±0,08	±0,03

<b>20:0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,01</b>	<b>0,14</b>	<b>0,03</b>	<b>0,12</b>	<b>0,02</b>	<b>0,10</b>	<b>0,02</b>	<b>0,15</b>	<b>0,02</b>	<b>0,16</b>	<b>0,03</b>
			±0,03	±0,01	±0,03	±0,01	±0,01	±0,00	±0,01	±0,01	±0,04	±0,00
<b>20:1 (ω-9)</b>	<b>2,41</b>	<b>0,22</b>	<b>2,15</b>	<b>0,38</b>	<b>2,09</b>	<b>0,32</b>	<b>1,96</b>	<b>0,37</b>	<b>2,13</b>	<b>0,27</b>	<b>2,01</b>	<b>0,32</b>
			±0,45	±0,06	±0,35	±0,13	±0,49	±0,08	±0,29	±0,07	±0,14	±0,03
<b>20:2 (ω-6)</b>	<b>0,24</b>	<b>0,02</b>	<b>0,31</b>	<b>0,06</b>	<b>0,30</b>	<b>0,05</b>	<b>0,15</b>	<b>0,03</b>	<b>0,23</b>	<b>0,03</b>	<b>0,22</b>	<b>0,03</b>
			±0,06	±0,01	±0,13	±0,03	±0,01	±0,00	±0,03	±0,01	±0,07	±0,01
<b>20:3 (ω-6)</b>	<b>0,72</b>	<b>0,06</b>	<b>0,71</b>	<b>0,13</b>	<b>0,90</b>	<b>0,14</b>	<b>0,94</b>	<b>0,18</b>	<b>1,18</b>	<b>0,15</b>	<b>1,06</b>	<b>0,17</b>
			±0,18	±0,02	±0,13	±0,06	±0,03	±0,01	±0,14	±0,03	±0,06	±0,03
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>3,09</b>	<b>0,28</b>	<b>4,16</b>	<b>0,74</b>	<b>4,48</b>	<b>0,69</b>	<b>4,52</b>	<b>0,86</b>	<b>5,36</b>	<b>0,68</b>	<b>5,39</b>	<b>0,86</b>
			±0,90	±0,11	±0,66	±0,28	±0,01	±0,02	±0,71	±0,19	±0,48	±0,13
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>9,01</b>	<b>0,81</b>	<b>8,25</b>	<b>1,47</b>	<b>10,04</b>	<b>1,55</b>	<b>15,89</b>	<b>3,05</b>	<b>17,41</b>	<b>2,20</b>	<b>18,33</b>	<b>2,95</b>
			±1,43	±0,14	±1,22	±0,59	±1,58	±0,39	±2,40	±0,54	±1,13	±0,59
<b>22:0</b>	<b>5,03</b>	<b>0,45</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,13</b>	<b>0,02</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,01</b>	<b>0,23</b>	<b>0,04</b>
			±0,02	±0,00	±0,13	±0,01	±0,03	±0,01	±0,04	±0,01	±0,17	±0,04
<b>22:1 (ω-9)</b>	<b>0,21</b>	<b>0,02</b>	<b>0,47</b>	<b>0,08</b>	<b>0,37</b>	<b>0,06</b>	<b>0,19</b>	<b>0,04</b>	<b>0,31</b>	<b>0,04</b>	<b>0,48</b>	<b>0,07</b>
			±0,03	±0,01	±0,20	±0,04	±0,21	±0,04	±0,27	±0,04	±0,25	±0,03
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>2,65</b>	<b>0,24</b>	<b>1,78</b>	<b>0,33</b>	<b>1,56</b>	<b>0,23</b>	<b>1,30</b>	<b>0,25</b>	<b>1,66</b>	<b>0,21</b>	<b>1,26</b>	<b>0,21</b>
			±0,89	±0,20	±0,44	±0,07	±0,52	±0,11	±0,57	±0,11	±0,50	±0,12
<b>Total á. g.</b>		<b>8,96</b>		<b>18,05</b>		<b>15,09</b>		<b>19,14</b>		<b>12,75</b>		<b>16,05</b>
				±2,07		±4,17		±0,58		±3,12		±2,46
<b>Saturados</b>	<b>31,83</b>	<b>4,72</b>	<b>38,40</b>	<b>6,99</b>	<b>34,88</b>	<b>5,23</b>	<b>33,51</b>	<b>6,41</b>	<b>33,70</b>	<b>4,34</b>	<b>33,97</b>	<b>5,41</b>
			±4,78	±1,67	±1,58	±1,31	±2,22	±0,23	±3,04	±1,30	±3,11	±0,49
<b>Monoinsaturados</b>	<b>38,91</b>	<b>1,05</b>	<b>41,73</b>	<b>7,50</b>	<b>41,44</b>	<b>6,22</b>	<b>36,96</b>	<b>7,07</b>	<b>34,15</b>	<b>4,30</b>	<b>33,98</b>	<b>5,46</b>
			±2,41	±0,43	±1,28	±1,60	±0,17	±0,18	±2,44	±0,75	±1,94	±0,91
<b>Sat+mono</b>	<b>70,74</b>	<b>5,77</b>	<b>80,13</b>	<b>14,49</b>	<b>76,32</b>	<b>11,46</b>	<b>70,46</b>	<b>13,48</b>	<b>67,85</b>	<b>8,64</b>	<b>67,95</b>	<b>10,87</b>
			±3,20	±2,10	±2,16	±2,90	±2,39	±0,05	±1,93	±2,04	±4,34	±1,39
<b>Poliinsaturados</b>	<b>21,23</b>	<b>2,54</b>	<b>18,09</b>	<b>3,23</b>	<b>22,12</b>	<b>3,40</b>	<b>28,24</b>	<b>5,41</b>	<b>30,50</b>	<b>3,90</b>	<b>30,79</b>	<b>4,97</b>
			±3,36	±0,36	±2,47	±1,26	±1,87	±0,52	±1,36	±1,03	±3,93	±1,23
<b>ω-3</b>	<b>12,14</b>	<b>1,09</b>	<b>9,24</b>	<b>1,65</b>	<b>11,50</b>	<b>1,76</b>	<b>17,24</b>	<b>3,30</b>	<b>18,93</b>	<b>2,40</b>	<b>19,67</b>	<b>3,17</b>
			±1,68	±0,19	±1,13	±0,63	±1,67	±0,42	±2,41	±0,59	±1,24	±0,65
<b>ω-6</b>	<b>9,09</b>	<b>0,81</b>	<b>8,81</b>	<b>1,57</b>	<b>10,51</b>	<b>1,62</b>	<b>10,69</b>	<b>2,05</b>	<b>11,35</b>	<b>1,47</b>	<b>10,84</b>	<b>1,76</b>
			±1,69	±0,18	±1,33	±0,62	±0,30	±0,12	±1,47	±0,50	±2,70	±0,60
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>1,34</b>		<b>1,05</b>		<b>1,10</b>		<b>1,61</b>		<b>1,71</b>		<b>1,88</b>	
			±0,03		±0,06		±0,11		±0,44		±0,42	
<b>EPA : ARA</b>	<b>2,91</b>		<b>2,00</b>		<b>2,25</b>		<b>3,52</b>		<b>3,25</b>		<b>3,41</b>	
			±0,09		±0,06		±0,36		±0,10		±0,24	



## **Capítulo 7.**

---

**Cultivo de *Brachionus plicatilis* con *Isochrysis*  
aff. *galbana* Clon T-ISO cultivada  
en sistema semicontinuo  
con intensidad luminosa moderada**



## Introdución

As modificacións na composición bioquímica ocasionados pola variación da taxa de dilución dan lugar a grandes cambios no valor nutritivo das microalgas (Scott, 1980; Taub 1980). Os cultivos semicontínuos de microalgas demostraron ter unha elevada calidade nutritiva cano se empregaron como alimento para *Artemia* (Fábregas et al., 1996b; 1998; 2001). A biomasa microalgal obtida neste tipo de cultivos tamén resulta moi apropiadas para o enriquecemento de rotíferos (Capítulos 5 e 6). Aínda que existen traballos sobre o cultivo de rotíferos con microalgas, en xeral están centrados en buscar diferencias na calidade nutritiva das distintas especies probadas e non prestan atención ás condicións de cultivo das microalgas. Neste experimento comprobouse o efecto da taxa de renovación dos cultivos de T-ISO sobre o crecemento e a composición bioquímica do rotífero *Brachionus plicatilis*.

## Deseño experimental

Os rotíferos da especie *Brachionus plicatilis* mantivéronse inicialmente en botellóns de 6 l con auga de mar cunha salinidade do 35 ‰ alimentados con microalgas de diversas especies. Dous días antes do experimento filtráronse por mallas de 300 e 40  $\mu\text{m}$  de luz co fin de eliminar a materia orgánica particulada e ciliados, respectivamente. Para o experimento de cultivo os rotíferos foron transferidos a botellas de 1 l de capacidade con auga de mar autoclavada e o volume de T-ISO cultivada con cinco taxas de renovación e unha intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Capítulo 3) necesario para aportar unha ración diaria de 33.000 células/rotífero. Engadíronse os rotíferos e completouse con auga de mar ata 500 ml. A densidade inicial de rotíferos foi 50 individuos/ml, e o número de ovos por femia foi 0,18.

Diariamente fixéronse recontos da densidade de rotíferos por mililitro e do número de ovos por femia, e engadíronse 33.000 células de T-ISO/rotífero. Enrasouse con auga de mar autoclavada co fin de que todas as botellas tivesen o mesmo volume final, xa que o volume de cultivo microalgal engadido variou segundo a densidade celular. Cando foi necesario filtrouse unha parte do cultivo

para reducir o volume; esta operación realizouse dúas veces no transcurso do experimento.

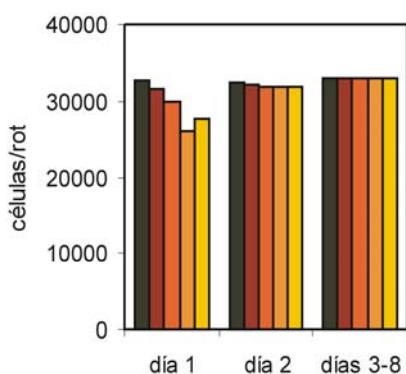
Os cultivos mantivéronse durante nove días e o derradeiro día recolléronse os rotíferos. 5 ml de cultivo destináronse a reconto da densidade de rotíferos, 100 ml para determinación de peso seco, 50 ml recolléronse nun filtro de malla de 40  $\mu\text{m}$  e conxeláronse para determinación de ácidos graxos e o resto filtrouse, conxelouse e posteriormente liofilizouse para realizar determinacións de proteínas, glúcidos, lípidos e oligoelementos.

## **Resultados e discusión**

Os dous primeiros días non houbo crecemento das poboacións de rotífero. Durante este período detectáronse células de T-ISO sobrantes nos cultivos de rotífero 24 h despois de alimentar, pero a partir do terceiro día a microalga foi consumida completamente (Figura 1). Dado que houbo máis microalga sobrante o primeiro día que o segundo, pode pensarse que a manipulación provocou nos rotíferos un certo grado de estrés que os induciu a non consumir toda a microalga, e a medida que se foron adaptando ao novo medio aumentaron a súa taxa de alimentación. A ración de 27.000 células de T-ISO/rotífero demostrou ser suficiente para un enriquecemento de 24 h (Capítulo 5), pero consideramos que unha poboación en crecemento podería precisar unha cantidade de alimento maior, que de feito foi consumida por completo cando os rotíferos se adaptaron ao novo sistema de cultivo. Canto maior foi a taxa de renovación, ata o 40%, menos microalgas foron consumidas. A taxa de renovación coa que se cultivou a microalga puido ter efecto na inxestión, pero algunhas células de T-ISO, especialmente as cultivadas a maiores taxas de renovación, puideron conservar a capacidade de dividirse nos cultivos de rotífero, o que dificultaría establecer con seguridade o consumo de microalga por parte de *Brachionus*, ao igual que sucedía nos experimentos de enriquecemento (Capítulos 5 e 6).

A taxa de crecemento dos rotíferos está relacionada coa cantidade de alimento, e dependendo do tipo de dieta a cantidade requerida para alcanzar o

crecemento máximo pode ser maior ou menor (Yúfera e Pascual 1983; Lubzens *et al.*, 1995). Os datos existentes sobre as taxas de inxestión dos rotíferos son moi variados e dependen entre outros factores da concentración e tipo de alimento. Navarro (1999) estima que *B. plicatilis* inxire entre un 60% e un 90% do seu peso seco cando é alimentado con *Nannochloropsis oculata*, mentres que Nagata (1985) obtén taxas de inxestión equivalentes ao 240% do peso seco do rotífero con *Chlorella saccharophila*. O peso seco dun rotífero é moi variable pero na literatura atópanse con maior frecuencia valores entre 300 e 600 ng, polo que a ración diaria de T-ISO debeu satisfacer as necesidades dos rotíferos.



**Figura 1.** Consumo de T-ISO por *Brachionus plicatilis* en función da taxa de renovación do cultivo microalgal.

Os dous primeiros días foron un período de adaptación nos que as poboacións de rotífero non medraron. A evolución do cultivo durante ese tempo fai supoñer que se produciu a eclosión dos ovos iniciais (0,18 ovos/rotífero) pero que esta estivo acompañada da morte de rotíferos adultos, probablemente debida en parte á manipulación do comezo do experimento. A partir do terceiro día de cultivo a densidade de rotíferos comezou a aumentar (Figura 2). A calidade do alimento foi decisiva, pois a taxa de crecemento e a densidade final incrementáronse coa taxa de renovación á que foi cultivada T-ISO. A produción media de ovos ao longo do periodo de cultivo aumentou con taxas de renovación crecentes, estabilizándose en 0,33 ovos/femia en condicións de saturación por nitróxeno, é dicir nas taxas de renovación do 40% e 50% (Figura 2; Táboa 1). T-ISO cultivada cunha taxa de renovación do 10% non foi capaz de manter a produción de ovos, que diminuíu progresivamente a partir do cuarto día de

cultivo, mentres que os demais grupos experimentaron dous picos de produción de ovos. Non houbo diferencias significativas (test U de Mann-Whitney) entre as densidades finais dos cultivos que recibiron microalgas das taxas de renovación do 40% e 50%, 183 e 190 rotíferos/ml respectivamente, que case duplicaron o valor alcanzado polos que recibiron microalgas da taxa de renovación do 10%, 105 rotíferos/ml (Figura 2; Táboa 1).

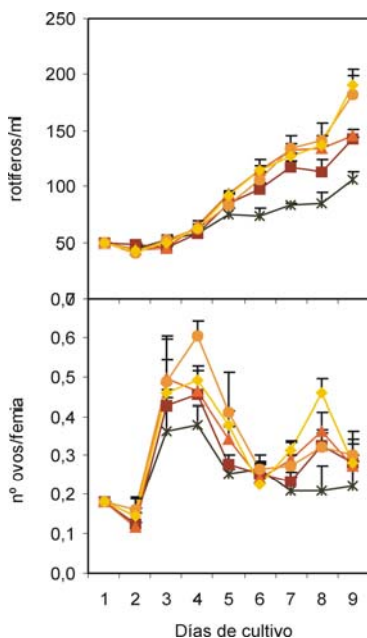


Figura 2. Evolución da densidade de rotíferos (arriba) e da produción de ovos (abaixo) en función da taxa de renovación de T-ISO.

As condicións de cultivo das microalgas determinan a supervivencia, o tamaño, a evolución da metamorfose ou a taxa de reprodución dos animais filtradores alimentadas con elas. A taxa de renovación, a concentración de nutrientes ou o efecto combinado dos dous parámetros en cultivos semicontínuos dan lugar a grandes diferencias no valor nutritivo de *Tetraselmis suecica* e *Phaeodactylum tricornutum* para *Artemia* sp., de maneira que a supervivencia, o crecemento e a produción de nauplios presentan unha relación positiva co incremento da concentración de nutrientes ata 8 mM de nitrato e coa taxa de renovación ata o 50% (Fábregas *et al.*, 1996b; 1998). Polo contrario, cultivos microalgais con concentracións de nutrientes e taxas de renovación baixas

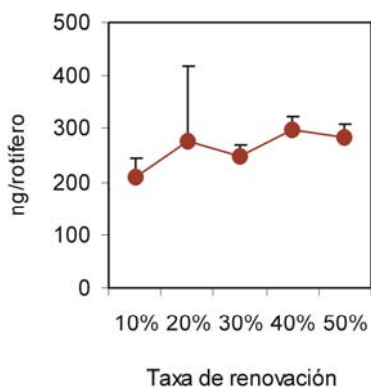
presentan unha calidade nutricional moi inferior. Na maioría dos casos os mellores resultados están relacionados co alto contido proteico da microalga obtida con esas condicións de cultivo (Fábregas *et al.*, 1995a, 1995b), pero a proteína non é o único factor que determina o valor nutritivo da microalga e suponse que outros parámetros bioquímicos como o valor calórico, as relacións proteína/lípidos e proteína/glúcidos ou o contido de ácidos graxos  $\omega$ -3 tamén inflúen na calidade da microalga como alimento.

Os valores da taxa de crecemento  $r$ , foron 0,09, 0,13, 0,13, 0,16 e 0,17 para os cultivos alimentados con T-ISO das taxas de renovación do 10%, 20%, 30%, 40% e 50% respectivamente (Táboa 1). Algúns autores rexistraron taxas de crecemento máis altas en cultivos de rotífero alimentados con outras especies de microalgas (Scott e Baynes, 1978; Yúfera e Pascual, 1983; Carić *et al.*, 1993), e a maioría dos resultados sinalaron un efecto da especie de microalga utilizada, aínda que nalgún caso non se chegou a esta conclusión (Scott e Baynes, 1978). Porén estes traballos unicamente citan as cantidades de microalga empregadas, sen aportar datos sobre a súa composición bioquímica ou estado fisiolóxico.

O peso seco dos rotíferos incrementouse coa taxa de renovación dos cultivos de T-ISO ata o punto de saturación por nitróxeno, obténdose o peso seco máis baixo na taxa de renovación do 10% con 207,86 ng/individuo e o máis elevado na taxa de renovación do 40% de T-ISO, con 296,92 ng/individuo. Non houbo diferencias no peso seco dos rotíferos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 40% e 50% (Figura 3; Táboa 2). O valor de peso seco obtido coa taxa de renovación do 20%, estrañamente alto e que rompe a tendencia marcada polos demais datos, pode deberse a erros na manipulación das mostras xa que a desviación estándar entre as réplicas manexadas foi tamén moito máis elevada que a atopada nos demais grupos de rotíferos.

A taxa da renovación á que foi cultivada T-ISO tivo efectos na composición dos rotíferos, pero a pesares da gran variabilidade bioquímica que a distintas taxas de renovación causaron na microalga, as diferencias de composición entre os distintos grupos de rotíferos foron menores que as rexistradas nos rotíferos sometidos a un enriquecemento con T-ISO durante 24 h

(Capítulo 5). Porén, o maior número de rotíferos por ml a medida que se incrementa a taxa de renovación permite apreciar que o contido de proteínas e lípidos se duplicou e o de glúcidos se triplicou se se considera a composición bioquímica por unidade de volume e non por individuo.



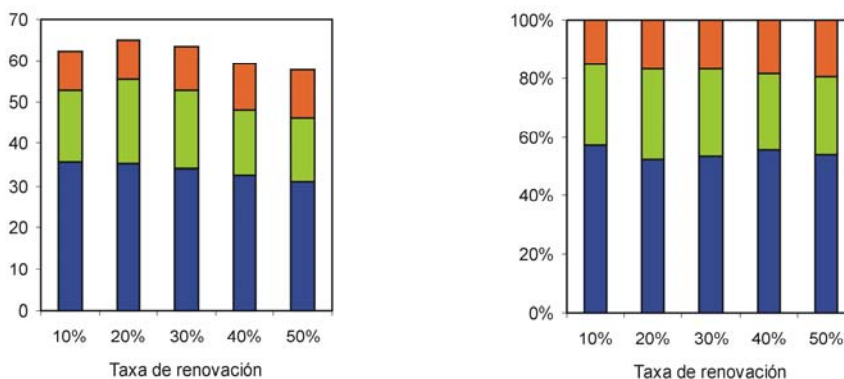
**Figura 3.** Peso seco de *B. plicatilis* alimentados con T-ISO de distintas taxas de renovación.

A porcentaxe orgánica dos rotíferos cultivados foi lixeiramente maior que a dos rotíferos sometidos a enriquecemento (Capítulo 5). Os valores máximos obtivéronse coas taxas de renovación limitadas por nitróxeno, entre o 62% e o 65% do peso seco. Os rotíferos alimentados con T-ISO das taxas de renovación do 40% e o 50% presentaron un contido orgánico algo menor, un 58% ou 59% do peso seco. A porcentaxe de proteínas descendeu coa taxa de renovación, pasando do 35,60% na taxa de renovación do 10% ao 30,91% na taxa de renovación do 50%. A porcentaxe de lípidos foi máxima na taxa de renovación do 20%, un 20,43%, e descendeu nas taxas de renovación superiores, mentres que a porcentaxe de glúcidos incrementouse coa taxa de renovación, de 9,37% a 11,38% (Figura 4; Táboa 2).

Cando proteínas, lípidos e glúcidos se expresaron como porcentaxes da fracción orgánica tampouco se observaron grandes diferencias entre taxas de renovación. A porcentaxe de proteína oscilou entre o 52% e o 57%. A porcentaxe de lípidos descendeu desde a taxa de renovación do 20%, con 30,5% e descendeu ata case o 27% na taxa de renovación do 50%. A porcentaxe de



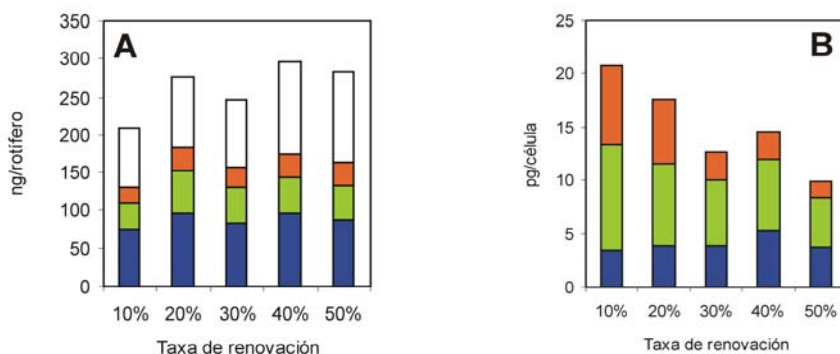
glúcidos na fracción orgánica incrementouse lixeiramente coa taxa de renovación, pasando do 15% na taxa de renovación do 10% a case o 20% na taxa de renovación do 50% (Figura 4; Táboa 2).



**Figura 4.** Composición bioquímica de *B. plicatilis* cultivado con T-ISO de distintas taxas de renovación. Esquerda, porcentaxes sobre o total do peso seco. Dereita, porcentaxes da fracción orgánica. ■ proteínas; ■ lípidos; ■ glúcidos.

É moi probable que a sobreestimación do peso seco nos rotíferos alimentados con T-ISO da taxa de renovación do 20% provocara á súa vez a sobreestimación do contido orgánico neste grupo, pero omitindo este dato obsérvase que o contido orgánico dos rotíferos aumentou coa taxa de renovación da microalga ata o punto de saturación por nitróxeno, na taxa de renovación do 40% (Figura 5). Esta evolución é diferente da experimentada polos rotíferos sometidos a un enriquecemento de 24 h, no que o contido orgánico se incrementaba de xeito lineal coa taxa de renovación, inversamente ao que acontecía co contido orgánico da microalga. Os contidos por individuo máis baixos dos tres compoñentes orgánicos, igual que o peso seco, corresponderon aos rotíferos alimentados con T-ISO procedente da taxa de renovación do 10%. As células de T-ISO cultivadas con taxas de renovación baixas, escasas en proteínas e ácidos graxos poliinsaturados e ricas en polisacáridos e lípidos de reserva, presentan características similares ás procedentes dos cultivos batch en fase estacionaria (Brown *et al.*, 1993b; Dunstan *et al.*, 1993) que son os máis utilizados na produción de alimento vivo e no cultivo de bivalvos.

Os contidos de proteína, lípidos e glúcidos incrementáronse ata a taxa de renovación do 40%, en condicións de limitación por nitróxeno, e reducíronse ou estabilizáronse na taxa de renovación do 50% (Figura 5; Táboa 2). Esta evolución contrasta co observado nos experimentos de enriquecemento (Capítulos 5 e 6), nos que os contidos das tres fraccións orgánicas aumentaban coa taxa de renovación independentemente da condición nutricional das microalgas. A cantidade de proteína por rotífero foi menor que a obtida mediante o enriquecemento con T-ISO durante 24 h, a pesar de que a cantidade de proteína por célula en T-ISO foi a mesma nos dous experimentos. O contido de glúcidos tamén foi menor, coincidindo co menor contido de glúcidos de T-ISO, mentres que o contido de lípidos foi en xeral maior nos rotíferos cultivados.



**Figura 5.** Composición bioquímica de *B. plicatilis*, expresada en ng/rotífero (A), e de T-ISO utilizada como alimento, expresada en pg/célula (B). ■ proteínas; ■ lípidos; ■ glúcidos; □, cinzas e compoñentes sen determinar.

As correlacións entre os contidos dos compoñentes orgánicos na microalga e no rotífero son elevadas se se suprimen os datos correspondentes á taxa de renovación do 20%, sendo  $R^2=0,78$ ,  $=0,60$  e  $=0,84$  no caso de proteínas, lípidos e glúcidos respectivamente; positiva para as proteínas e negativa para lípidos e glúcidos (Figura 6). Frolov *et al.* (1991) atoparon o mesmo coeficiente de correlación entre as porcentaxes de proteína dos rotíferos e da dieta; en cambio, as correlacións para varias clases de lípidos observadas por estes autores foron positivas. As correlacións entre as porcentaxes de proteínas, lípidos e glúcidos na fracción orgánica de *Artemia* e as da súa dieta son aínda maiores:  $R^2=0,97$ ,  $0,98$  e

0,94 respectivamente, sendo positiva para proteínas e glúcidos e negativa no caso dos lípidos (Fábregas *et al.*, 2001). Polo contrario, as diferentes composicións bioquímicas de *Tetraselmis suecica* cultivada con exceso ou escasez de nitróxeno non afectaron á composición bioquímica das larvas do langostino *Penaeus semisulcatus* (D'Souza e Kelly, 2000).

A produtividade dos cultivos de rotífero incrementouse coa taxa de renovación de T-ISO ata o 40%. En condicións de saturación por nitróxeno non houbo diferencias entre a biomasa total ou orgánica recuperada por ml, pero a biomasa de T-ISO consumida para produci-la foi menor na taxa de renovación do 50%. O índice de aproveitamento calculado como a relación entre a biomasa orgánica de T-ISO aportada e a biomasa orgánica de rotífero recuperada descende coa taxa de renovación de 25,9 a 7,1 (Táboa 1). En contraste, a FCR e a FCR orgánica en *Artemia* descenden coa taxa de renovación dos cultivos de microalga ata o punto de saturación por nitróxeno pero volven incrementarse se hai un exceso de nitróxeno no medio de cultivo da microalga (Fábregas *et al.*, 2001). A eficiencia de asimilación dos rotíferos alimentados con *Brachiomonas submarina* varía segundo a taxa de dilución do cultivo da microalga e alcanza o seu máximo cando as relacións proteína:lípidos:glúcidos do alimento se aproximan a 1:1:1 (Scott, 1980). Os contidos de lípidos e glúcidos de T-ISO diminuíron coa taxa de renovación de maneira que en condicións de saturación de nitróxeno as relacións proteína:lípidos:glúcidos foron 1:1,3:0,5.

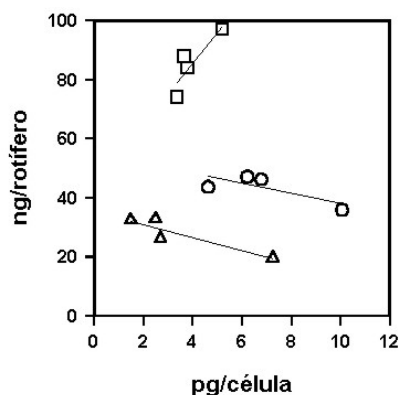
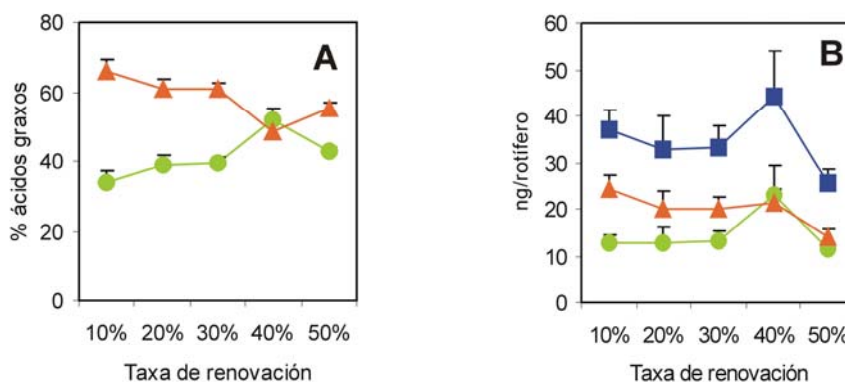


Figura 6. Correlacións entre os contidos de proteínas (□), lípidos (○) e glúcidos (△) en T-ISO e en *B. plicatilis*.

O contido de ácidos graxos seguiu a mesma tendencia que na microalga, e descendeu desde a taxa de renovación do 10% ata a taxa de renovación do 30%, e incrementándose bruscamente na taxa de renovación do 40%. A correlación entre o contido de ácidos graxos de T-ISO e de *Brachionus* foi positiva pero débil ( $R^2=0,57$ ), en contraste coa correlación negativa dos lípidos totais. O contido de ácidos graxos dos rotíferos foi moi elevado, cun valor mínimo de 25,53 ng/rotífero na taxa de renovación do 50% e un máximo de 44,33 ng/rotífero na taxa de renovación do 40% (Figura 7; Táboa 3). Estes valores duplicaron os obtidos co enriquecemento dos rotíferos, pero o contido de ácidos graxos da microalga utilizada no cultivo de rotíferos (Capítulo 3) foi tamén o dobre do contido da microalga empregada no enriquecemento (Capítulo 2).



**Figura 7.** Perfil de ácidos graxos de *B. plicatilis* en función da taxa de renovación de T-ISO utilizada como alimento. A: porcentaxes de ácidos graxos saturados+monoinsaturados e poliinsaturados. B: ng de ácidos graxos totais, saturados+monoinsaturados e poliinsaturados por rotífero. -■-, ácidos graxos totais; -▲-, saturados-monoinsaturados; -●-, poliinsaturados.

As porcentaxes de ácidos graxos saturados+monoinsaturados e de ácidos graxos poliinsaturados evolucionaron de forma semellante a como o fixeron na microalga, coa excepción de que a porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados en T-ISO foi lixeiramente maior na taxa de renovación do 30%. A porcentaxe e o contido de ácidos graxos poliinsaturados foi maior na microalga utilizada neste experimento que no enriquecemento, e os rotíferos reflexaron o seu perfil de ácidos graxos presentando tamén maiores porcentaxes e contido de ácidos graxos poliinsaturados que os rotíferos enriquecidos. Así, a porcentaxe de ácidos graxos

poliinsaturados incrementouse coa taxa de renovación, pasando do 33,99% na taxa de renovación do 10% ao 51,56% na taxa de renovación do 40%. A suma de ácidos graxos saturados e monoinsaturados experimentou a tendencia inversa, pasando dun 66,01% na taxa de renovación do 10% a un 48,44% na taxa de renovación do 40%, e incrementándose novamente na taxa de renovación do 50%. Expresados en contido por rotífero, os ácidos graxos poliinsaturados experimentaron un forte incremento na taxa de renovación do 40% alcanzando os 23 ng/rotífero, e nos demais grupos oscilaron entre os 11 e os 13 ng/rotífero. A suma dos ácidos graxos saturados+monoinsaturados descendeu coa taxa de renovación aínda que non de forma continua, pasando de 24,4 ng/rotífero na taxa de renovación do 10% a 11,3 ng/rotífero nos alimentados con T-ISO da taxa de renovación do 50% (Figura 7; Táboa 3).

Os ácidos graxos máis abundantes foron 14:0, 16:0, 18:1 $\omega$ -9, 18:4 $\omega$ -3 e 22:6 $\omega$ -3 (DHA), presentes en porcentaxes superiores ao 10% na maioría das taxas de renovación. Outros ácidos graxos importantes, presentes en porcentaxes superiores ao 5%, foron 18:0, 18:2 $\omega$ -6 e 18:3 $\omega$ -3. Os ácidos graxos 16:0, 18:0 e 18:1 $\omega$ -9 descendieron tanto en contido como en porcentaxe ata a taxa de renovación do 40%, coa excepción do contido de 18:1 $\omega$ -9 cuxo valor mínimo se registrou na taxa de renovación do 30%. Os contidos e as porcentaxes de 14:0 e 18:2 $\omega$ -6 oscilaron, aínda que os contidos dos dous ácidos graxos foron elevados na taxa de renovación do 40% (Táboa 3).

O conxunto dos ácidos graxos  $\omega$ -3 incrementouse tanto en porcentaxe como en contido, pasando do 24% e 8,8 ng/rotífero na taxa de renovación do 10% ao 40% e 18 ng/rotífero na taxa de renovación do 40% (Figura 8; Táboa 3). Na taxa de renovación do 50% a porcentaxe de ácidos graxos  $\omega$ -3 foi elevada, 34%, pero o contido por rotífero foi similar aos da taxa de renovación do 10%. O contido de ácidos graxos  $\omega$ -3 do alimento vivo é de crucial importancia para o crecemento e a supervivencia das larvas de peixe. En estudos sobre a dourada *Sparus aurata* determinouse que un contido de ácidos graxos  $\omega$ -3 arredor do 5,5% do peso seco dos rotíferos proporcionaba as maiores taxas de supervivencia e crecemento larvario (Rodríguez *et al.*, 1994); os rotíferos cultivados con T-ISO da taxa de renovación do 40% conteñen un 6% de ácidos graxos  $\omega$ -3.

Os contidos e as porcentaxes de  $\omega$ -3 de T-ISO, igual que os dos ácidos graxos poliinsaturados, foron practicamente iguais nas taxas de renovación do 30% e do 40%, pero o efecto sobre o perfil de ácidos graxos do rotífero foi diferente. Os rotíferos alimentados con T-ISO da taxa de renovación do 40% presentaron elevados contidos e porcentaxes de ácidos graxos  $\omega$ -3 e poliinsaturados en xeral, mentres que nos que recibiron microalgas da taxa de renovación do 30% os contidos e porcentaxes de  $\omega$ -3 e poliinsaturados foron moi similares aos rexistrados nos grupos alimentados con microalgas das taxas de renovación máis baixas, pobres en ácidos graxos poliinsaturados. A taxa de renovación tivo un efecto sobre os ácidos graxos do rotífero que o perfil de ácidos graxos da microalga non puido exercer por si mesmo, aínda que puido ser debido á relación entre o contido de ácidos graxos e o de proteínas ou glúcidos.

O  $18:3\omega$ -3 pasou do 5,4% ao 8,3% e de 2 a 3,7 ng/rotífero, mentres que o  $18:4\omega$ -3 pasou do 8% ao 15,7% e de 2,9 a 7 ng/rotífero e foi o ácido graxo  $\omega$ -3 máis abundante nos rotíferos alimentados con T-ISO das taxas de renovación do 40% e 50%. A correlación entre os contidos de DHA de T-ISO e dos rotíferos foi positiva e elevada,  $R^2=0,82$ . O DHA pasou do 8,4% e 3 ng/rotífero na taxa de renovación do 10% ao 11,3% e 5 ng/rotífero na taxa de renovación do 40% (Figura 8; Táboa 3). Este elevado contido de DHA é probablemente a principal vantaxe do cultivo dos rotíferos con microalgas fronte ao enriquecemento de 24 h. A menor intensidade luminosa utilizada para o cultivo de T-ISO empregada neste experimento (Capítulo 3) fixo que as microalgas presentaran un contido de DHA tres veces maior que o da T-ISO utilizada no enriquecemento (Capítulo 2) na taxa de renovación do 40%, pero os rotíferos cultivados acumularon 5 veces máis DHA que os rotíferos enriquecidos, a pesar de que en cultivos con altas taxas de reprodución os rotíferos consumen máis DHA (Øie e Olsen, 1997). En contraste con este elevado contido de DHA nos rotíferos cultivados con microalgas, os rotíferos cultivados con levadura e emulsións lipídicas durante 10 días conteñen moito menos DHA que os rotíferos enriquecidos durante 24 h co mesmo alimento, a pesar das elevadas porcentaxes de DHA presentes nas emulsións (Rainuzzo *et al.*, 1994).

O EPA tamén experimentou un forte incremento, pasando do 2,1% ao 5,10% e de 0,76 a 2,3 ng/rotífero, o que fixo descender a relación DHA/EPA de 4

a 2,2 entre as taxas de renovación do 10% e do 40%. Pola súa parte, a relación EPA/ARA (ácido araquidónico, 20:4 $\omega$ -6) incrementouse ata a taxa de renovación do 50%, pasando de 2,62 a 3,56. As porporcións relativas de DHA, EPA e ARA son tan importantes como as cantidades totais nas dietas para larvas de peixe. Considérase que a relación óptima DHA:EPA para *Dicentrarchus labrax*, *Scophthalmus maximus* e *Hippoglossus hippoglossus* é 2:1, mentres que a óptima relación EPA/ARA sería 1:1 para *D. labrax* e 10:1 para *S. maximus* e *H. hippoglossus* (Sargent *et al.*, 1999). As proporcións DHA:EPA dos rotíferos alimentados con T-ISO das taxas de renovación do 40% e 50% cumpren os requerimentos das larvas destas especies, mentres que as relacións EPA/ARA se sitúan en valores intermedios. O conxunto dos ácidos graxos  $\omega$ -6 case non sufriu modificacións, de maneira que o incremento dos  $\omega$ -3 fixo aumentar a relación  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ata a taxa de renovación do 40%, de 2,55 a 3,56 (Figura 9, Táboa 3).

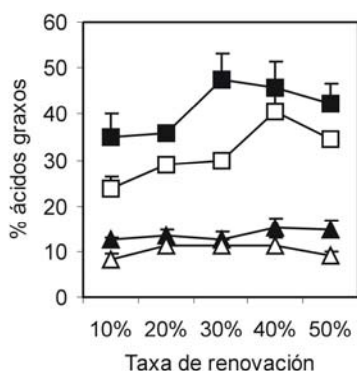


Figura 8. Porcentaxes de ácidos graxos  $\omega$ -3 e DHA en *B. plicatilis* e T-ISO. -■-  $\omega$ -3 en T-ISO; -□-,  $\omega$ -3 en *B. plicatilis*; -▲-, DHA en T-ISO; -△-, DHA en *B. plicatilis*.

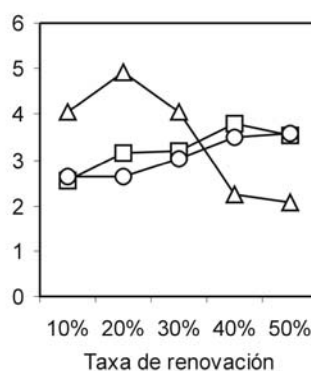


Figura 9. Relacións  $\omega$ -3: $\omega$ -6 (-□-), DHA:EPA (-△-) e EPA:ARA (-○-) en *B. plicatilis*.

Os resultados expostos sinalan que os cultivos de microalgas realizados nas condicións apropiadas poden non soamente mellorar a composición bioquímica dos rotíferos, senón tamén incrementar notablemente o seu crecemento e polo tanto a produtividade dos cultivos. Ademais, a utilización destas técnicas permite obter elevadas produtividades de microalgas cunha composición bioquímica que as fai máis asimilables para o rotífero, de maneira que se reduce a cantidade de microalga necesaria para producir unha

determinada cantidade de rotífero. A dispoñibilidade de nitróxeno nos cultivos de microalgas é fundamental para obter os mellores resultados en crecemento e contido de proteínas e ácidos graxos poliinsaturados nos rotíferos. As taxas de renovación que dan lugar á saturación por nitróxeno nos cultivos de T-ISO, 40% e 50%, deron resultados iguais no crecemento dos cultivos de rotífero, pero a taxa de renovación do 40% deu lugar a rotíferos de maior peso e cos máximos contidos de proteínas, lípidos, glúcidos e ácidos graxos poliinsaturados. Pola súa parte, a taxa de renovación do 50% deu lugar ao máxima eficacia de conversión da biomasa microalgal en biomasa de rotífero. Tendo en conta que non hai unha taxa de renovación que dera lugar aos mellores resultados en tódolos parámetros estudados, nas condicións utilizadas neste experimento para o cultivo de T-ISO unha taxa de renovación do 40% parece a máis apropiada para obter elevadas cantidades de rotíferos de alto valor nutritivo para ser empregados como alimento en cultivos larvarios de peixes. Taxas de renovación maiores que dan lugar a un exceso de nitróxeno nos cultivos de T-ISO permiten igualmente obter grandes producións de rotíferos, pero de menor valor nutritivo, ademais de xerar menores cantidades diarias de microalga.

A superioridade nutritiva dos rotíferos cultivados ou enriquecidos debe ser demostrada con experimentos de cultivo larvario. O cultivo de rotíferos consume grandes cantidades de microalgas e non parece viable desde o punto de vista económico, pero podería chegar a selo se a súa calidade nutritiva fose notablemente superior e se se optimizan as condicións de cultivo de microalgas para incrementar a produtividade.



**Táboa 1.** Aporte de alimento, valor calórico e eficiencia de conversión en *Brachionus plicatilis* cultivado con T-ISO procedente de cultivo semicontinuo con cinco taxas de renovación.

	Taxa de renovación				
	10%	20%	30%	40%	50%
<b>Células consumidas (10<sup>6</sup> células/ml cultivo)</b>	17,1	20,2	22,3	22,1	22,3
<b>Peso orgánico consumido (µg/ml)</b>	355,49	358,75	284,66	321,66	218,61
<b>Rotíferos/ml</b>	105,5	142,0	146,0	182,7	190,4
<b>nº ovos/femia</b>	0,25	0,28	0,31	0,33	0,33
<b>Taxa de crecemento (r)</b>	0,09	0,13	0,13	0,16	0,17
<b>Produtividade rotífero (µg/ml)</b>	22,03	39,09	36,13	54,34	53,90
<b>Produtividade orgánica rotífero (µg/ml)</b>	13,71	25,70	22,93	32,14	30,89
<b>Proteínas (µg/ml)</b>	7,84	13,71	12,25	17,74	16,69
<b>Lípidos (µg/ml)</b>	3,80	7,99	6,88	8,44	8,29
<b>Glúcidos (µg/ml)</b>	2,06	4,00	3,80	5,96	6,13
<b>Eficiencia de asimilación (biomasa orgánica T-ISO inxerida/biomasa orgánica de rotífero)</b>	25,9	14,0	12,4	10,0	7,1
<b>Composición de T-ISO</b>					
<b>Proteína (pg/célula)</b>	3,38	3,82	3,80	5,22	3,66
<b>Lípidos (pg/célula)</b>	10,09	7,70	6,24	6,81	4,65
<b>Glúcidos (pg/célula)</b>	7,26	6,21	2,71	2,51	1,51

**Táboa 2.** Composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* cultivado coa microalga *Isochrysis* aff. *galbana* T-ISO de cultivo semicontinuo con cinco taxas de renovación diferentes.

	Taxa de renovación				
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %
<b>Peso seco (ng/rotífero±std)</b>	207,86 ±38,38	275,29 ±144,04	247,48 ±20,81	296,92 ±25,20	283,71 ±23,34
<b>Proteína (ng/rotífero±std)</b>	74,00 ±3,70	96,55 ±3,77	83,91 ±3,34	96,93 ±4,88	87,86 ±3,48
<b>Lípidos (ng/rotífero±std)</b>	35,90 ±5,26	56,25 ±3,32	47,10 ±3,18	46,11 ±4,34	43,62 ±1,08
<b>Glúcidos (ng/rotífero±std)</b>	19,47 ±1,75	28,20 ±5,29	26,07 ±1,84	32,58 ±3,20	32,29 ±2,01
<b>Contido orgánico (ng/rotífero)</b>	129,37	181,0	157,08	175,62	163,77
<b>Valor calórico (10<sup>-3</sup> J/rotífero)</b>	3,53	5,01	4,31	4,60	4,38
<b>% proteína</b>	35,60	35,07	33,91	32,65	30,91
<b>% lípidos</b>	17,27	20,43	19,03	15,53	15,38
<b>% glúcidos</b>	9,37	9,37	10,53	10,97	11,38
<b>Total orgánico</b>	62,24	64,87	63,47	59,15	57,67
<b>% proteína na F. O.</b>	57,20	52,38	53,42	55,19	53,60
<b>% lípidos na F. O.</b>	27,75	30,52	29,99	26,26	26,66
<b>% glúcidos na F. O.</b>	15,05	17,11	16,59	18,55	19,74

**Táboa 3.** Composición de ácidos graxos de *Brachionus plicatilis* cultivado con *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en réxime semicontinuo con cinco taxas de renovación diferentes.

Ácido graxo	Taxa de renovación									
	10%		20%		30%		40%		50%	
	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot
<b>12:0</b>	<b>2,11</b>	<b>0,801</b>	<b>0,77</b>	<b>0,252</b>	<b>1,88</b>	<b>0,618</b>	<b>1,45</b>	<b>0,580</b>	<b>1,67</b>	<b>0,431</b>
	±1,15	±0,462	±0,39	±0,148	±0,28	±0,05	±0,96	±0,251	±0,32	±0,121
<b>14:0</b>	<b>8,12</b>	<b>3,006</b>	<b>9,51</b>	<b>3,038</b>	<b>11,93</b>	<b>4,000</b>	<b>7,88</b>	<b>3,414</b>	<b>9,94</b>	<b>2,526</b>
	±1,74	±0,756	±2,60	±0,893	±1,26	±0,948	±1,23	±0,283	±1,43	±0,381
<b>15:0</b>	<b>0,69</b>	<b>0,253</b>	<b>0,82</b>	<b>0,263</b>	<b>1,45</b>	<b>0,484</b>	<b>1,32</b>	<b>0,576</b>	<b>1,52</b>	<b>0,388</b>
	±0,13	±0,052	±0,16	±0,044	±0,06	±0,086	±0,18	±0,075	±0,18	±0,061
<b>16:0</b>	<b>14,27</b>	<b>5,257</b>	<b>14,49</b>	<b>4,645</b>	<b>15,12</b>	<b>5,036</b>	<b>9,43</b>	<b>4,060</b>	<b>13,86</b>	<b>3,547</b>
	±2,09	±0,861	±2,75	±0,923	±0,69	±0,806	±2,17	±0,529	±0,63	±0,536
<b>16:1 (ω-9)</b>	<b>1,53</b>	<b>0,565</b>	<b>2,55</b>	<b>0,816</b>	<b>2,60</b>	<b>0,861</b>	<b>1,29</b>	<b>0,565</b>	<b>0,89</b>	<b>0,243</b>
	±0,19	±0,083	±0,53	±0,170	±0,42	±0,140	±0,21	±0,106	±0,79	±0,210
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>4,16</b>	<b>1,529</b>	<b>4,76</b>	<b>1,533</b>	<b>4,43</b>	<b>1,467</b>	<b>3,59</b>	<b>1,572</b>	<b>4,37</b>	<b>1,108</b>
	±0,48	±0,159	±0,47	±0,203	±0,22	±0,136	±0,32	±0,233	±0,40	±0,049
<b>16:2 (ω-6)</b>	<b>0,15</b>	<b>0,054</b>	<b>0,16</b>	<b>0,053</b>	<b>0,18</b>	<b>0,062</b>	<b>0,19</b>	<b>0,083</b>	<b>0,16</b>	<b>0,043</b>
	±0,06	±0,027	±0,01	±0,009	±0,03	±0,018	±0,04	±0,032	±0,09	±0,026
<b>16:2 (ω-4)</b>	<b>0,57</b>	<b>0,210</b>	<b>0,41</b>	<b>0,132</b>	<b>0,36</b>	<b>0,120</b>	<b>0,36</b>	<b>0,158</b>	<b>0,35</b>	<b>0,089</b>
	±0,07	±0,031	±0,10	±0,022	±0,09	±0,028	±0,04	±0,025	±0,07	±0,016
<b>18:0</b>	<b>7,96</b>	<b>2,935</b>	<b>5,10</b>	<b>1,704</b>	<b>4,92</b>	<b>1,615</b>	<b>4,93</b>	<b>2,164</b>	<b>5,50</b>	<b>1,409</b>
	±1,42	±0,617	±0,89	±0,637	±0,90	±0,158	±0,37	±0,326	±0,38	±0,240
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>18,73</b>	<b>6,915</b>	<b>16,67</b>	<b>5,504</b>	<b>12,00</b>	<b>3,974</b>	<b>9,63</b>	<b>4,265</b>	<b>10,00</b>	<b>2,554</b>
	±0,93	±0,804	±2,34	±1,797	±0,49	±0,376	±0,50	±0,930	±0,12	±0,317
<b>18:1 (ω-7)</b>	<b>2,02</b>	<b>0,770</b>	<b>1,32</b>	<b>0,442</b>	<b>1,46</b>	<b>0,476</b>	<b>2,60</b>	<b>1,157</b>	<b>2,66</b>	<b>0,680</b>
	±0,20	±0,144	±0,32	±0,188	±0,36	±0,063	±0,13	±0,275	±0,34	±0,133
<b>18:2 (ω-6)</b>	<b>6,40</b>	<b>2,365</b>	<b>5,45</b>	<b>1,813</b>	<b>5,37</b>	<b>1,776</b>	<b>6,22</b>	<b>2,750</b>	<b>6,06</b>	<b>1,548</b>
	±0,48	±0,339	±1,14	±0,714	±0,55	±0,198	±0,10	±0,552	±0,31	±0,221
<b>18:3 (ω-6)</b>	<b>0,11</b>	<b>0,039</b>	<b>0,19</b>	<b>0,063</b>	<b>0,26</b>	<b>0,088</b>	<b>0,35</b>	<b>0,158</b>	<b>0,34</b>	<b>0,087</b>
	±0,01	±0,006	±0,05	±0,029	±0,04	±0,018	±0,04	±0,047	±0,03	±0,015
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>5,39</b>	<b>1,991</b>	<b>5,94</b>	<b>1,966</b>	<b>5,84</b>	<b>1,938</b>	<b>8,29</b>	<b>3,694</b>	<b>7,11</b>	<b>1,813</b>
	±0,35	±0,286	±0,89	±0,667	±0,34	±0,232	±0,37	±0,895	±1,05	±0,330
<b>18:4 (ω-3)</b>	<b>7,98</b>	<b>2,945</b>	<b>9,68</b>	<b>3,185</b>	<b>9,80</b>	<b>3,272</b>	<b>15,67</b>	<b>7,012</b>	<b>13,98</b>	<b>3,583</b>
	±0,90	±0,447	±1,12	±0,949	±0,93	±0,658	±1,10	±1,894	±0,78	±0,585

<b>20:0</b>	<b>1,23</b> ±1,43	<b>0,463</b> ±0,541	<b>0,21</b> ±0,04	<b>0,069</b> ±0,026	<b>0,25</b> ±0,03	<b>0,084</b> ±0,014	<b>0,40</b> ±0,07	<b>0,183</b> ±0,066	<b>0,43</b> ±0,31	<b>0,114</b> ±0,088
<b>20:1 (ω-9)</b>	<b>3,87</b> ±0,59	<b>1,427</b> ±0,277	<b>3,54</b> ±0,19	<b>1,158</b> ±0,271	<b>3,35</b> ±0,46	<b>1,098</b> ±0,016	<b>4,54</b> ±0,74	<b>2,061</b> ±0,725	<b>3,61</b> ±0,59	<b>0,911</b> ±0,060
<b>20:2 (ω-6)</b>	<b>0,24</b> ±0,03	<b>0,089</b> ±0,017	<b>0,23</b> ±0,02	<b>0,075</b> ±0,023	<b>0,17</b> ±0,03	<b>0,057</b> ±0,006	<b>0,20</b> ±0,08	<b>0,093</b> ±0,054	<b>0,15</b> ±0,02	<b>0,037</b> ±0,00
<b>20:3 (ω-6)</b>	<b>0,15</b> ±0,02	<b>0,057</b> ±0,010	<b>0,17</b> ±0,01	<b>0,056</b> ±0,015	<b>0,18</b> ±0,01	<b>0,058</b> ±0,007	<b>0,21</b> ±0,05	<b>0,098</b> ±0,039	<b>0,15</b> ±0,03	<b>0,039</b> ±0,005
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>0,79</b> ±0,13	<b>0,293</b> ±0,052	<b>0,86</b> ±0,07	<b>0,283</b> ±0,078	<b>0,92</b> ±0,04	<b>0,307</b> ±0,056	<b>1,46</b> ±0,14	<b>0,651</b> ±0,179	<b>1,21</b> ±0,03	<b>0,308</b> ±0,029
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>2,07</b> ±0,23	<b>0,763</b> ±0,101	<b>2,27</b> ±0,27	<b>0,751</b> ±0,220	<b>2,79</b> ±0,37	<b>0,936</b> ±0,233	<b>5,10</b> ±0,77	<b>2,305</b> ±0,782	<b>4,31</b> ±0,18	<b>1,100</b> ±0,143
<b>22:0</b>	<b>0,14</b> ±0,03	<b>0,052</b> ±0,010	<b>0,09</b> ±0,01	<b>0,030</b> ±0,007	<b>0,10</b> ±0,03	<b>0,032</b> ±0,006	<b>0,14</b> ±0,03	<b>0,065</b> ±0,027	<b>0,09</b> ±0,04	<b>0,023</b> ±0,008
<b>22:1 (ω-9)</b>	<b>1,18</b> ±0,21	<b>0,437</b> ±0,100	<b>1,28</b> ±0,06	<b>0,417</b> ±0,093	<b>1,09</b> ±0,12	<b>0,360</b> ±0,006	<b>1,23</b> ±0,24	<b>0,561</b> ±0,212	<b>0,94</b> ±0,21	<b>0,235</b> ±0,028
<b>22:5 (ω-6)</b>	<b>1,73</b> ±0,22	<b>0,640</b> ±0,109	<b>2,41</b> ±0,05	<b>0,788</b> ±0,187	<b>2,34</b> ±0,09	<b>0,781</b> ±0,134	<b>2,18</b> ±0,30	<b>0,983</b> ±0,325	<b>1,73</b> ±0,29	<b>0,436</b> ±0,037
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>8,40</b> ±1,02	<b>3,115</b> ±0,631	<b>11,11</b> ±0,55	<b>3,611</b> ±0,707	<b>11,17</b> ±1,43	<b>3,749</b> ±0,960	<b>11,33</b> ±1,58	<b>5,121</b> ±1,698	<b>8,98</b> ±1,00	<b>2,274</b> ±0,129
<b>Total</b>		<b>36,953</b> ±4,306		<b>32,646</b> ±7,192		<b>33,251</b> ±4,595		<b>44,329</b> ±9,511		<b>25, 526</b> ±2,895
<b>Saturados</b>	<b>34,52</b> ±4,73	<b>12,769</b> ±2,355	<b>30,98</b> ±5,15	<b>10,000</b> ±2,183	<b>35,67</b> ±0,85	<b>11,869</b> ±1,762	<b>25,55</b> ±4,55	<b>11,042</b> ±0,739	<b>33,01</b> ±1,44	<b>8,438</b> ±1,149
<b>Monoinsaturados</b>	<b>31,49</b> ±1,42	<b>11,622</b> ±1,284	<b>30,13</b> ±2,58	<b>9,870</b> ±2,619	<b>24,93</b> ±1,79	<b>8,237</b> ±0,530	<b>22,89</b> ±0,99	<b>10,182</b> ±2,417	<b>22,46</b> ±0,21	<b>5,731</b> ±0,608
<b>Sat+mono</b>	<b>66,01</b> ±3,40	<b>24,390</b> ±3,024	<b>61,11</b> ±2,66	<b>19,871</b> ±3,921	<b>60,60</b> ±1,86	<b>20,106</b> ±2,290	<b>48,44</b> ±3,92	<b>21,224</b> ±3,073	<b>55,48</b> ±1,27	<b>14,169</b> ±1,732
<b>Poliinsaturados</b>	<b>32,26</b> ±3,18	<b>12,562</b> ±2,035	<b>36,48</b> ±2,62	<b>11,987</b> ±3,259	<b>37,06</b> ±1,84	<b>12,363</b> ±2,232	<b>49,38</b> ±3,64	<b>22,122</b> ±6,121	<b>42,80</b> ±1,33	<b>10,921</b> ±1,258
<b>ω-3</b>	<b>23,84</b> ±2,41	<b>8,814</b> ±1,451	<b>29,01</b> ±1,38	<b>9,513</b> ±2,415	<b>29,61</b> ±1,76	<b>9,895</b> ±1,969	<b>40,40</b> ±3,55	<b>18,131</b> ±5,227	<b>34,38</b> ±1,08	<b>8,770</b> ±0,974
<b>ω-6</b>	<b>7,60</b> ±0,68	<b>3,449</b> ±0,536	<b>6,83</b> ±1,21	<b>2,268</b> ±0,830	<b>6,91</b> ±0,60	<b>2,291</b> ±0,285	<b>8,43</b> ±0,10	<b>3,739</b> ±0,828	<b>7,92</b> ±0,38	<b>2,025</b> ±0,287
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>3,13</b> ±0,04	<b>2,553</b> ±0,022	<b>4,31</b> ±0,51	<b>4,307</b> ±0,513	<b>4,30</b> ±0,46	<b>4,304</b> ±0,456	<b>4,79</b> ±0,40	<b>4,793</b> ±0,404	<b>4,34</b> ±0,14	<b>4,343</b> ±0,138
<b>EPA : ARA</b>	<b>2,62</b> ±0,12	<b>2,617</b> ±0,122	<b>2,65</b> ±0,14	<b>2,648</b> ±0,138	<b>3,02</b> ±0,29	<b>3,024</b> ±0,286	<b>3,49</b> ±0,31	<b>3,493</b> ±0,314	<b>3,56</b> ±0,16	<b>3,562</b> ±0,160
<b>DHA : EPA</b>	<b>4,06</b> ±0,33	<b>4,062</b> ±0,329	<b>4,93</b> ±0,61	<b>4,927</b> ±0,607	<b>4,05</b> ±0,76	<b>4,050</b> ±0,758	<b>2,22</b> ±0,14	<b>2,225</b> ±0,144	<b>2,09</b> ±0,29	<b>2,090</b> ±0,289

## **Capítulo 8.**

---

**Enriquecimiento de *Brachionus plicatilis*  
durante 24 h con distintas raciones de  
*Nannochloropsis gaditana* cultivada en  
sistema semicontinuo**



## **Introdución**

Existen numerosos estudos sobre o efecto da cantidade e da calidade de alimento sobre o crecemento dunha poboación de rotífero (Lubzens *et al.*, 1995; Snell, 1986; Yúfera e Pascual, 1980; Yúfera *et al.*, 1983). Polo contrario, a influencia do alimento sobre o enriquecemento está estudada basicamente desde o punto de vista cualitativo, mediante o uso de dietas artificiais de distinta composición (Aragão *et al.*, 2004; Copeman *et al.*, 2002; Estévez *et al.*, 1999; Koven *et al.*, 2001), pero non hai traballos que investiguen o efecto da cantidade de alimento sobre a composición bioquímica do rotífero. Unha cantidade baixa de alimento durante o periodo de enriquecemento podería dar lugar a unha insuficiente acumulación de nutrientes no rotífero. Por outra banda, a sobrealimentación daría lugar a un gasto excesivo de biomasa microalgal. Debe polo tanto establecerse un equilibrio entre a necesidade de obter rotíferos de alta calidade nutritiva e a de axustar a ración de microalga para producir o número de rotíferos necesarios para a alimentación das larvas. Neste experimento os rotíferos foron alimentados con distintas cantidades de *Nannochloropsis gaditana* e analizáronse os efectos da ración e a composición bioquímica do alimento sobre a composición bioquímica e a eficiencia de asimilación do rotífero.

## **Deseño experimental**

A eustigmatofícea *Nannochloropsis gaditana* (CCMP 527) cultivouse en réxime semicontínuo nas condicións especificadas no capítulo 4, coa excepción da intensidade luminosa que foi de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . Aplicáronse dúas taxas de renovación, 10% e 40%. Os rotíferos (*Brachionus plicatilis*), mantidos en botellóns de 6 l, foron privados de alimento durante as 12 horas previas ao experimento. Para levar a cabo o enriquecemento, foron transferidos a botellas de 1 l de capacidade contendo auga de mar autoclavada e o volume necesario de *N. gaditana* para subministrar 80.000, 130.000 ou 200.000 células/rotífero. O volume dos cultivos de rotífero foi de 700 ml, e a densidade inicial de rotíferos, 200 individuos/ml, cunha taxa de ovos/femia de 0,09. En total, probáronse seis condicións de enriquecemento: dúas taxas de renovación da microalga e tres cantidades de microalga distintas, con tres réplicas en cada unha das condicións.

Recolléronse mostras de *N. gaditana* e de *B. plicatilis* para determinacións de peso seco, proteínas, lípidos, glúcidos e ácidos graxos.

## **Resultados e discusión**

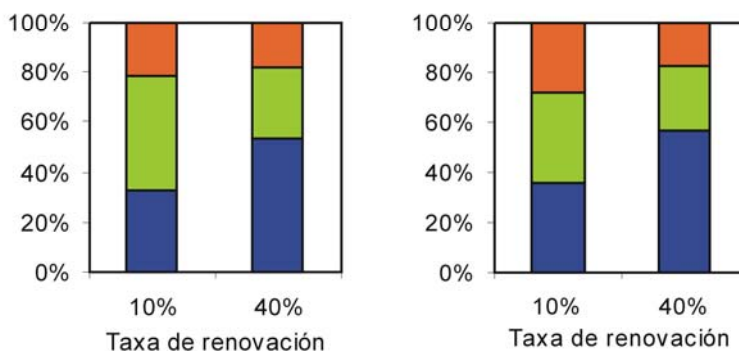
### *Nannochloropsis gaditana*

As densidades celulares dos cultivos semicontínuos de *N. gaditana* en fase de estabilización foron  $278,7 \pm 6,02 \times 10^6$  células/ml na taxa de renovación do 10% e  $65,75 \pm 4,60 \times 10^6$  células/ml na taxa de renovación do 40%. Estes valores foron maior e menor respectivamente que os das densidades celulares obtidas no cultivo de *N. gaditana* con  $162 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Capítulo 4). A taxa de renovación fixo variar a dispoñibilidade de nutrientes e en consecuencia, a composición bioquímica da microalga. En cultivos de *Nannochloropsis* sp. realizados nos mesmos biorreactores cunha intensidade luminosa de  $80 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  e unha concentración inicial de nitróxeno 2 mM, non se observa limitación por nutrientes cando se aplica unha taxa de renovación do 40% (Fábregas *et al.*, 2004), polo que os nosos cultivos, cunha concentración inicial de nitróxeno 4 mM, deben presentar un excedente de nitróxeno no medio na taxa de renovación do 40%, e estar limitados por nutrientes na taxa de renovación do 10%, como xa se observou en cultivos semicontínuos realizados cunha intensidade luminosa de  $162 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

As porcentaxes dos compoñentes da fracción orgánica variaron segundo a taxa de renovación. Na taxa de renovación do 10% as porcentaxes de proteína, lípidos e glúcidos na fracción orgánica foron 32,42%, 46,15% e 21,43% respectivamente, mentres que na taxa de renovación do 40% as porcentaxes foron 53,18%, 28,54% e 18,28% respectivamente (Figura 1). As elevadas porcentaxes de proteína na fracción orgánica, características dos cultivos microalgais saturados por nutrientes (Fábregas *et al.*, 2002; 2004), confirman a existencia de nitrato non asimilado no medio dos cultivos cunha taxa de renovación do 40%. En comparación con *N. gaditana* cultivada con  $162 \mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , nos cultivos con taxa de renovación do 10% a porcentaxe de lípidos na fracción orgánica incrementouse á conta dunha diminución da porcentaxe de glúcidos, mentres que na taxa de renovación do 40% as porcentaxes dos tres



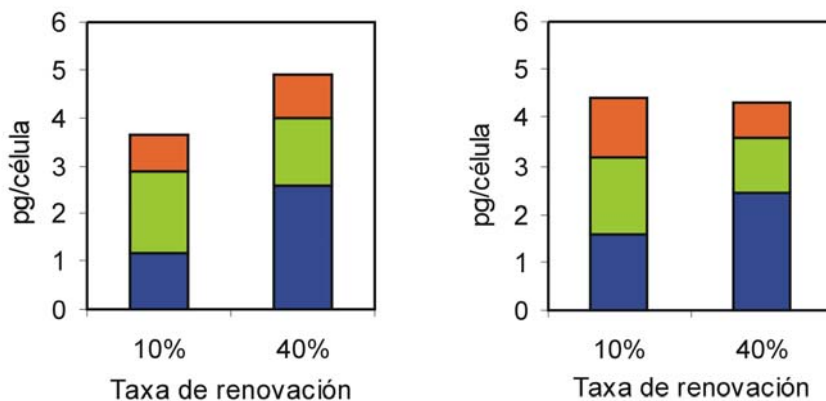
compoñentes foron moi similares a pesar das diferentes intensidades luminosas. Estas diferencias na composición bioquímica en función da intensidade luminosa son comparables ás observadas en T-ISO, na que a redución da intensidade luminosa tamén provocou un descenso do contido de glúcidos en beneficio dun maior contido de lípidos, pero a diferenza do acontecido con *N. gaditana*, en T-ISO este fenómeno produciuse en tódalas taxas de renovación probadas (Capítulos 2 e 3).



**Figura 1.** Comparación da composición da fracción orgánica de *Nannochloropsis gaditana* cultivada en réxime semicontínuo con dúas taxas de renovación e dúas intensidades luminosas diferentes. Esquerda, 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . Dereita, 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Capítulo 4). ■, proteínas ; ■, lípidos; ■, glúcidos.

Os contidos celulares de proteínas, lípidos e glúcidos foron respectivamente 1,18, 1,68 e 0,78 pg/célula na taxa de renovación do 10% e 2,59, 1,39 e 0,89 pg/célula na taxa de renovación do 40% (Figura 2). A composición bioquímica de *N. gaditana* cultivada cunha taxa de renovación do 40% foi moi similar á obtida en cultivos realizados nas mesmas condicións pero cunha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . A microalga cultivada con taxa de renovación do 10% presentou contidos celulares máis baixos de proteína debidos á maior densidade celular, que causou unha redución do contido de nitróxeno por célula, e especialmente de glúcidos, causados probablemente pola diminución da intensidade luminosa. Isto provoca un incremento da porcentaxe de lípidos na fracción orgánica, aínda que o contido por célula foi practicamente igual nas dúas condicións de iluminación. Un contido

celular de glúcidos tan reducido é característico de cultivos limitados por luz (Fábregas *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Composición de *N. gaditana* cultivada en réxime semicontínuo con dúas intensidades luminosas diferentes, expresada en pg/célula. Esquerda, 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . Dereita, 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Capítulo 4). ■, proteínas ; ■, lípidos; ■, glúcidos.

Aínda que as diferencias entre os contidos de lípidos de *N. gaditana* de cada unha das taxas de renovación cultivada con distintas intensidades luminosas foron pequenas, o contido de ácidos graxos foi maior en *N. gaditana* cultivada con menor intensidade luminosa, sendo 1,70 pg/célula na taxa de renovación do 10% e 0,77 pg/célula na taxa de renovación do 40%, mentres que con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  os contidos celulares de ácidos graxos foron 1,18 e 0,54 pg/célula respectivamente. Os valores practicamente iguais obtidos para os lípidos e os ácidos graxos na taxa de renovación do 10% con 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  derivan probablemente das limitacións do método de cuantificación dos lípidos. Segundo estes resultados, a práctica totalidade dos lípidos de *N. gaditana* cultivada cunha taxa de renovación do 10% resulta estar composta por ácidos graxos. Na taxa de renovación do 40% os ácidos graxos representan unicamente a metade do peso dos lípidos totais, indicando a presenza de compostos lipídicos non formados por ácidos graxos como esteroides ou pigmentos, que tenden a incrementarse en condicións de suficiencia de nutrientes, tanto en cultivos continuos con altas taxas de dilución como en cultivos discontinuos en fase expoñencial (Lubián *et al.*, 1986; Dunstan *et al.*, 1993; Sukenik *et al.*, 1993).

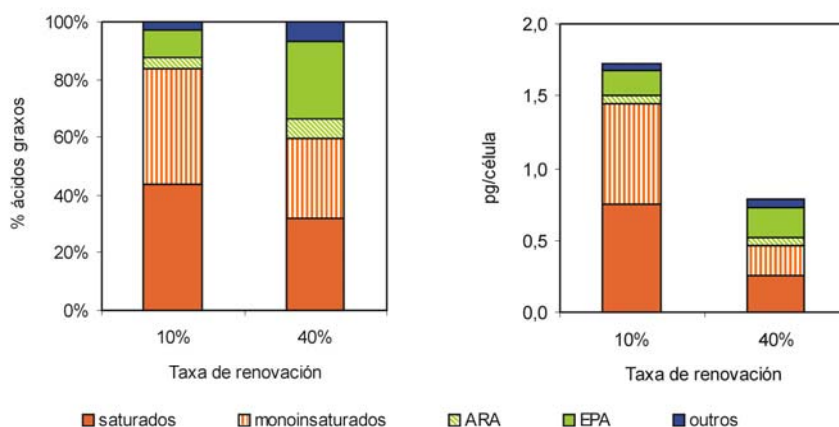
A diferenza no contido de ácidos graxos entre as dúas taxas de renovación débese á acumulación de ácidos graxos saturados e monoinsaturados na taxa de renovación do 10%, 1,44 pg/célula fronte a 0,47 pg/célula na taxa de renovación do 40%, mentres que o contido de ácidos graxos poliinsaturados foi lixeiramente maior na taxa de renovación do 40%, 0,30 pg/célula comparados con 0,26 pg/célula na taxa de renovación do 10%. En porcentaxes, a suma de ácidos graxos saturados e monoinsaturados representou un 84,6% do total de ácidos graxos na taxa de renovación do 10% e un 60,6% na taxa de renovación do 40%, mentres que os ácidos graxos poliinsaturados comprenderon un 15,4% e un 39,4% respectivamente. As proporcións dos distintos tipos de ácidos graxos variaron respecto aos cultivos de *N. gaditana* con 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s na taxa de renovación do 10%, que rexistrou un pequeno incremento da fracción poliinsaturada provocado pola menor dispoñibilidade de luz. Na taxa de renovación do 40% as porcentaxes de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados foron practicamente iguais.

Os ácidos graxos máis abundantes en *N. gaditana* foron 16:0, 16:1 $\omega$ -7, 18:1 $\omega$ -9 e 20:5 $\omega$ -3 (EPA), aínda que as súas proporcións variaron segundo a taxa de renovación. Ademais destes ácidos graxos maioritarios, detectáronse varios ácidos graxos presentes en moi pequena cantidade, que representan entre o 3% e o 7% do total (Figura 3; Táboa 2). Os ácidos graxos saturados e monoinsaturados descendieron ao incrementarse a taxa de renovación, especialmente o 16:0, que pasou do 34,32% ao 24,22%, e o 18:1 $\omega$ -9, que descendeu do 12,27% ao 4,83%. En contido celular, os descensos foron moito máis marcados. O 16:0 pasou de 0,585 a 0,187 pg/célula, e o 18:1 $\omega$ -9 de 0,209 a 0,037 pg/célula. O 16:1 $\omega$ -7 descendeu do 28,22% ao 22,84%, e de 0,481 a 0,175 pg/célula. 16:0, 16:1 $\omega$ -7 e 18:1 $\omega$ -9 atópanse fundamentalmente nos lípidos neutros do xénero *Nannochloropsis* (Sukenic *et al.*, 1989; 1993), e indican unha gran acumulación de lípidos de reserva nas células da taxa de renovación do 10%.

A porcentaxe de EPA triplicouse na taxa de renovación do 40%, representando o 27,62% dos ácidos graxos fronte ao 9,79% na taxa de renovación do 10%, pero soamente se traduciu nun incremento de 0,167 a 0,212 pg/célula. A intensidade luminosa influíu na porcentaxe e no contido de EPA na taxa de renovación do 10%, que foron notablemente maiores nos cultivos

sometidos a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . O EPA, xunto co ácido araquidónico (20:4 $\omega$ -6, ARA), localízase case exclusivamente nos galactolípidos, formando parte da membrana tilacoidal, e a menor intensidade luminosa puido estimular a súa síntese co fin de incrementar a superficie de membrana fotosintética e en consecuencia a captación de luz.

Outros ácidos graxos importantes foron o 14:0 e o 20:4 $\omega$ -6 (ARA). A porcentaxe de 14:0 descendeu lixeiramente ao incrementarse a taxa de renovación, do 8,55% ao 6,71%, e o seu contido celular diminuíu de 0,146 a 0,052 pg/célula. A porcentaxe de ARA case se duplicou, pasando do 3,87% ao 6,83%, pero o seu contido celular diminuíu lixeiramente, pasando de 0,066 a 0,052 pg/célula (Figura 3; Táboa 2). As modificacións do perfil de ácidos graxos tamén afectaron ás relacións  $\omega$ -3: $\omega$ -6 e EPA:ARA, que se incrementaron ao aumentar a taxa de renovación, pasando de 1,76 e 2,54 a 2,41 e 4,04 respectivamente (Táboa 3).



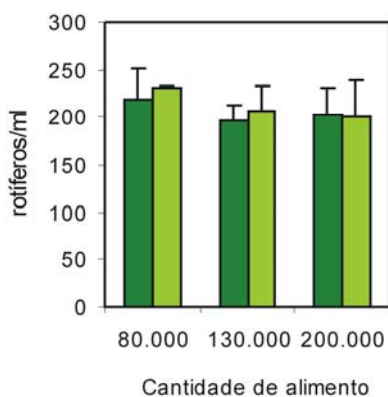
**Figura 3.** Composición de ácidos graxos de *N. gaditana* cultivada con dúas taxas de renovación. Esquerda, expresada en porcentaxes do total de ácidos graxos. Dereita, expresada en pg de ácido graxo por célula. Ácidos graxos saturados: 14:0 e 16:0. Monoinsaturados: 16:1 $\omega$ -7 e 18:1 $\omega$ -9. Outros: 16:2 $\omega$ -6, 16:2 $\omega$ -4, 18:0, 18:1 $\omega$ -7, 18:2 $\omega$ -6, 18:3 $\omega$ -6, 18:3 $\omega$ -3, 20:0 e 20:3 $\omega$ -6.

*Brachionus plicatilis*

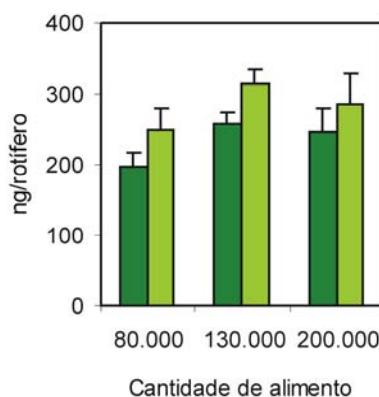
Transcorridas as 24 horas de enriquecemento, a densidade de rotíferos nos cultivos variou. Os cultivos que recibiron *N. gaditana* da taxa de renovación do 40% alcanzaron densidades finais máis altas, excepto nos grupos que recibiron 200.000 células/rotífero nos que as densidades finais foron iguais, aínda que estas diferencias non foron significativas. As probas de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney tampouco atoparon diferencias significativas na densidade final en función da cantidade de alimento recibido. As cantidades máis baixas, 80.000 células/rotífero, deron lugar aos valores máximos,  $219 \pm 32$  rotíferos/ml nos grupos alimentados con *N. gaditana* da taxa de renovación do 10% e  $232 \pm 2$  rotíferos/ml coa taxa de renovación do 40%. A ración de alimento de 130.000 células/rotífero produciu unha densidade final de  $196 \pm 17$  rotíferos/ml nos cultivos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 10% e  $207 \pm 27$  rotíferos/ml nos alimentados coa taxa de renovación do 40%, mentres que os cultivos que recibiron 200.000 células/rotífero alcanzaron densidades de  $202 \pm 30$  e  $201 \pm 38$  rotíferos/ml respectivamente (Figura 4; Táboa 3). A relación nº de ovos/femia foi lixeiramente maior nos rotíferos que consumiron *N. gaditana* da taxa de renovación do 40%, 0,12-0,13, o que se corresponde co aumento da produción de ovos de *Brachionus calyciflorus* cando é alimentado con microalgas cultivadas nun medio rico en nutrientes (Jensen e Verschoor, 2004). A relación nº ovos/femia dos rotíferos que consumiron a taxa de renovación do 10% foi 0,08-0,10. Non se observou unha influencia significativa da ración de alimento sobre a produción de ovos en ningún caso (Táboa 3).

O peso seco dos rotíferos enriquecidos tamén variou en función da taxa de renovación de *N. gaditana* e da ración de alimento recibida. A microalga da taxa de renovación do 40% deu lugar a rotíferos de maior peso seco nas tres cantidades de alimento probadas, aínda que as diferencias entre taxas de renovación foron significativas soamente nas racións de 80.000 e 130.000 células/individuo (test U de Mann-Whitney,  $p=0,05$  nos dous casos). O efecto positivo das microalgas cultivadas en medios ricos en nutrientes respecto das sometidas a limitación por nitróxeno ou fósforo sobre o crecemento somático tamén se observou noutras especies de *Brachionus* (Jensen e Verschoor, 2004). Respecto á ración de microalga, os pesos máis baixos corresponderon aos rotíferos que recibiron 80.000 células/individuo,  $196,79$  ng/rotífero nos

alimentados con *N. gaditana* da taxa de renovación do 10% e 249,59 ng/rotífero nos alimentados con microalga da taxa de renovación do 40%. Os valores máis altos obtivéronse con cantidades de alimento intermedias, 257,99 e 313,17 ng/rotífero para as taxas de renovación do 10% e 40% respectivamente. A cantidade de alimento máis elevada, 200.000 células/rotífero, deu lugar a pesos secos intermedios: 246,13 e 286,27 ng/rotífero respectivamente (Figura 5; Táboa 3). O peso dos rotíferos alimentados con 80.000 células/individuo da taxa de renovación do 10% foi significativamente menor que o dos alimentados con racións maiores (test U de Mann-Whitney,  $p=0,05$  nos dous casos), mentres que nos alimentados con *N. gaditana* da taxa de renovación do 40% os rotíferos que recibiron 80.000 células unicamente presentaron diferenzas significativas cos rotíferos alimentados con 130.000 células/individuo ( $p=0,05$ ).



**Figura 4.** Densidade dos cultivos de rotíferos tralo enriquecemento de 24 h con distintas cantidades de *N. gaditana* cultivada cunha taxa de renovación do 10% (■) ou do 40% (■).



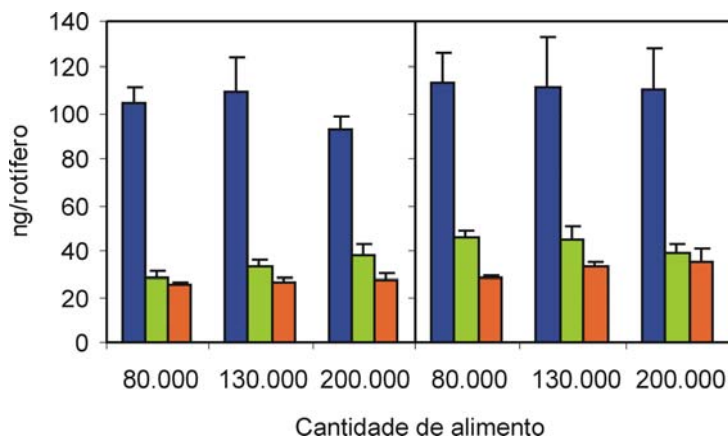
**Figura 5.** Peso seco dos rotíferos tralo enriquecemento de 24 h con distintas cantidades de *N. gaditana* cultivada cunha taxa de renovación do 10% (■) ou do 40% (■).

O peso orgánico dos rotíferos estivo unicamente determinado pola taxa de renovación da microalga. Nos rotíferos enriquecidos con microalgas da taxa de renovación do 10% o peso orgánico oscilou entre 158,7 e 169,4 ng/rotífero, e entre 185,8 e 189,6 ng/rotífero nos enriquecidos coa taxa de renovación do 40%. A cantidade de alimento recibida non tivo efecto sobre o peso orgánico, pero si sobre a porcentaxe orgánica do peso total, que foi maior nos rotíferos alimentados con 80.000 células/individuo (Táboa 3).

Debido ás maiores densidades finais de rotíferos e aos maiores pesos secos totais e orgánicos, as produtividades máis elevadas de biomasa de rotífero obtivéronse co enriquecemento con *N. gaditana* da taxa de renovación do 40%. Non se rexistraron grandes variacións entre os grupos de rotíferos que recibiron diferentes cantidades de microalga da mesma taxa de renovación.

A medida que se incrementou a ración de alimento a eficiencia de asimilación diminuíu (Táboa 4). As concentracións elevadas de alimento dan lugar a un aumento da taxa de inxestión acompañada dunha menor asimilación (Pilarska, 1977) provocada pola aceleración do tránsito intestinal (Starkweather e Gilbert, 1978). Algúns autores afirman que cando a concentración de alimento é baixa, unha microalga de pobre calidade nutritiva pode dar lugar a taxas de crecemento das poboacións de rotífero ou doutros zooplanctontes filtradores similares ás dun alimento de maior calidade (Sternier e Robinson, 1994; Rothhaupt, 1995). Dacordo con esta teoría, se os rotíferos inxiren cantidades moderadas de glúcidos e lípidos unha gran parte é consumida como fonte de enerxía, o que permite incrementar a proporción relativa de nitróxeno e equilibrar a relación C:N no organismo do rotífero. Polo contrario, se no medio hai unha gran concentración de microalgas de baixa calidade o rotífero almacena no seu organismo gran cantidade de substancias de reserva facendo diminuír a relación C:N e perxudicando a súa capacidade reproductiva e a supervivencia. Non obstante, non sempre se observa este efecto positivo porque algunhas das microalgas empregadas neste tipo de experimentos son capaces de acumular nitróxeno e fósforo cando estes nutrientes se atopan en concentracións limitantes no medio, a cambio de reducir a súa taxa de crecemento (Ramos-Rodríguez e Conde-Porcuna, 2003).

A composición bioquímica dos rotíferos, expresada como as porcentaxes de proteínas, glúcidos e lípidos na fracción orgánica, foi moi similar en tódalas condicións de alimentación probadas e non se diferenciou dos resultados obtidos nos demais experimentos de enriquecemento (Capítulos 5 e 7). A porcentaxe de proteína na fracción orgánica oscilou entre o 62% e o 65,5%. Os lípidos comprenderon entre o 15% e o 18,8%, e a porcentaxe de glúcidos situouse entre 16,5% e o 20,4% (Táboa 3).



**Figura 6.** Composición bioquímica dos rotíferos enriquecidos durante 24 h con *N. gaditana* da taxa de renovación do 10% (esquerda) ou do 40% (dereita). ■, proteínas; ■, lípidos; ■, glúcidos.

O contido total de proteínas, expresado como ng/individuo, foi moi similar en tódolos grupos de rotíferos, unicamente os rotíferos alimentados con 200.000 células de *N. gaditana* da taxa de renovación o 10% acumularon unha cantidade de proteína inferior (Figura 6; Táboa 3). Aínda que as maiores cantidades de proteína por ml de cultivo de rotífero se obtiveron coa taxa de renovación do 40%, a proteína foi mellor asimilada nos rotíferos alimentados con microalga da taxa de renovación do 10%. Estes resultados contrastan cos obtidos nos experimentos de enriquecemento nos que se probaron cinco taxas de renovación, nos que as microalgas cultivadas coa taxa de renovación máis baixa deron lugar ás menores cantidades de proteína nos rotíferos. Nestes experimentos, as microalgas foron cultivadas cunha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  en lugar de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , o que permitiu ás células cultivadas con taxas de renovación baixas acumular grandes cantidades de substancias de reserva que reduciron a súa dixestibilidade e a asimilación dos nutrientes por parte dos rotíferos. *N. gaditana* cultivada cunha intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  e unha taxa de renovación do 10% acumulou similares cantidades de lípidos pero a metade de glúcidos que cando foi cultivada con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , e así o seu valor nutritivo puido incrementarse favorecendo a incorporación de proteína no rotífero.



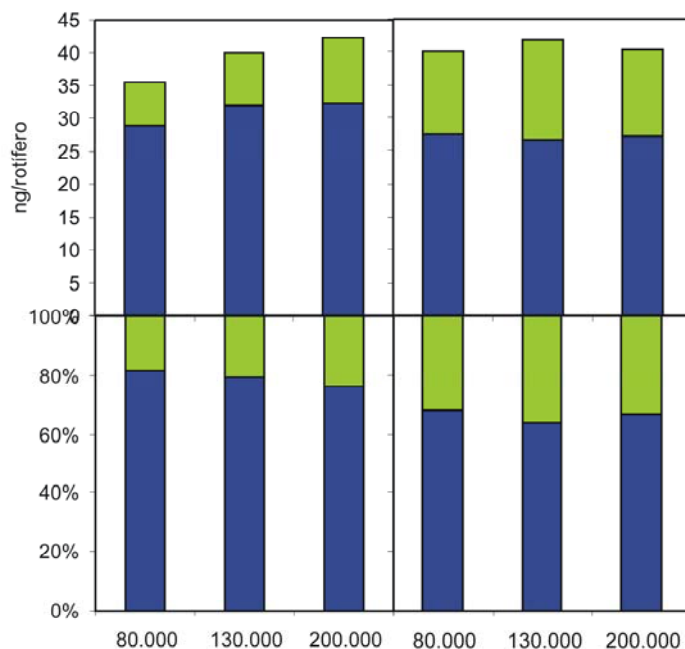
O contido de lípidos foi maior nos rotíferos alimentados con *N. gaditana* da taxa de renovación do 40% excepto nos que recibiron 200.000 células/individuo que non se diferenciaron dos alimentados coa mesma cantidade de *N. gaditana* da taxa de renovación do 10% (Figura 6; Táboa 3). O aumento da cantidade de alimento produciu un incremento do contido lipídico nos rotíferos que recibiron microalga da taxa de renovación do 10% e unha diminución nos que consumiron a taxa de renovación do 40%, de xeito que se rexistraron elevadas correlacións entre a cantidade de lípidos aportada pola dieta e o contido de lípidos do rotífero, positiva ( $R^2=0,99$ ) na taxa de renovación do 10% e negativa ( $R^2=0,91$ ) na taxa de renovación do 40%.

Os glúcidos foron os compoñentes presentes en menor cantidade na fracción orgánica dos rotíferos. O contido de glúcidos incrementouse coa ración de alimento e foi maior nos rotíferos que consumiron *N. gaditana* da taxa de renovación do 40% (Figura 6; Táboa 3). A correlación entre a cantidade de glúcidos na dieta e o contido de glúcidos no rotífero foi positiva nas dúas taxas de renovación,  $R^2=1$  na taxa de renovación do 10% e  $R^2=0,90$  na taxa de renovación do 40%. A asimilación de lípidos e glúcidos foi mellor nos rotíferos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 40%.

Non houbo grandes diferencias no contido total de ácidos graxos entre as distintas condicións de enriquecemento probadas, coa excepción dunha lixeira diminución nos rotíferos alimentados con 80.000 células de *N. gaditana* da taxa de renovación do 10%. Na taxa de renovación do 10% o contido de ácidos graxos seguiu a mesma tendencia dos lípidos, incrementándose coa cantidade de alimento recibida. Nos rotíferos alimentados con *N. gaditana* da taxa de renovación do 40% os contidos de ácidos graxos foron moi similares, alcanzando valores lixeiramente maiores nos alimentados con 130.000 células/individuo (Figura 7; Táboa 5).

Os rotíferos que consumiron microalgas da taxa de renovación do 10% presentaron unha elevada porcentaxe de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, que diminuíu ao incrementarse a ración de alimento do 81,5% ao 76,1%; porén o contido por individuo incrementouse de 28,8 a 32 ng/rotífero. Os ácidos graxos poliinsaturados incrementáronse en porcentaxe e contido por

rotífero, do 18,5% ao 23% e de 6,70 a 10 ng/rotífero. Nos rotíferos alimentados con microalgas da taxa de renovación do 40% os contidos dos dous grupos de ácidos graxos oscilaron sen mostrar tendencias claras. Os ácidos graxos saturados e monoinsaturados representaron entre un 63,2% e un 68,2% do total, equivalentes a uns 27 ng/individuo aproximadamente. Os ácidos graxos poliinsaturados situáronse entre o 31,8% e o 36,7%, representando entre 12,5 e 15 ng/rotífero (Figura 7; Táboa 5).



**Figura 7.** Ácidos graxos dos rotíferos enriquecidos con *N. gaditana* da taxa de renovación do 10% (esquerda) ou do 40% (dereita). Arriba: expresados en ng/rotífero. Abaixo: expresados como porcentaxe do total de ácidos graxos ■, ácidos graxos saturados+monoinsaturados; ■, ácidos graxos poliinsaturados.

Os ácidos graxos máis abundantes nos rotíferos foron 16:0, 16:1 $\omega$ -7, 18:1 $\omega$ -9 e 20:5 $\omega$ -3 (EPA), e detectáronse asimesmo cantidades importantes de 14:0, 18:0 e 20:4 $\omega$ -6 (ARA). A redución dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados na taxa de renovación do 40% débese en gran medida á diminución do 18:1 $\omega$ -9. O 16:0 e o 16:1 $\omega$ -7 diminuíron só lixeiramente nos rotíferos enriquecidos con microalga da taxa de renovación do 40% e tampouco

hai grandes diferencias entre as distintas condicións de enriquecemento. O EPA foi mellor asimilado nos rotíferos alimentados con *N. gaditana* da taxa de renovación do 40%, e case se duplicou en contido e porcentaxe, situándose entre o 18,6% e o 21,5% dos ácidos graxos de *B. plicatilis*, e 7,5-9 ng/rotífero. Nos rotíferos que consumiron microalgas da taxa de renovación do 10% a porcentaxe e o contido de EPA incrementáronse coa cantidade de comida recibida, concordando co comportamento dos ácidos graxos poliinsaturados en conxunto. O ARA comportouse da mesma maneira que o EPA, pero o incremento experimentado na taxa de renovación do 40% foi menor. O 14:0 e o 18:0 mantiveron valores bastante similares en tódalas condicións probadas. O contido de DHA foi insignificante e os seus valores máximos foron o 1,5% do total dos ácidos graxos e 0,25 ng/rotífero (Táboa 5).

As relacións  $\omega$ -3: $\omega$ -6 e EPA:ARA foron lixeiramente maiores nos rotíferos alimentados con microalga da taxa de renovación do 40%, e o seu valor aumentou coa ración de alimento nos dous tipos de dieta. Nos rotíferos que consumiron *N. gaditana* da taxa de renovación do 10% a relación  $\omega$ -3: $\omega$ -6 pasou de 1,59 a 1,85, e a relación EPA:ARA incrementouse de 2,52 a 3,12, mentres que nos alimentados coa taxa de renovación do 40% experimentaron incrementos de 1,98 a 2,35 e 3,47 a 3,88 respectivamente (Táboa 5).

Os resultados obtidos poñen de manifesto que a utilización de cantidades crecentes de alimento nos procesos de enriquecemento dos rotíferos dá lugar a resultados distintos en función da composición bioquímica da microalga empregada. No caso de *N. gaditana* cultivada con limitación de nitróxeno, o aumento da cantidade de alimento subministrado fai incrementar o contido de substancias de reserva no rotífero, incluídos todos os ácidos graxos, pero o contido de proteína permanece practicamente invariable. Por outra parte, o baixo contido de ácidos graxos poliinsaturados dunha microalga cultivada nestas condicións non permite considerala un alimento apropiado para mellorar a composición bioquímica do rotífero. Porén, a redución da intensidade luminosa nos cultivos da microalga puido ser beneficiosa para a acumulación de proteínas nos rotíferos que consumiron a taxa de renovación do 10%. Ao reducirse a cantidade de compostos de reserva nas células de *N. gaditana* favorécese, a baixas concentracións da microalga, a asimilación das proteínas. Cando se utilizan

microalgas cultivadas nun medio con suficientes nutrientes o incremento da cantidade empregada no enriquecemento do rotífero unicamente aumenta a incorporación de glúcidos pero non de proteínas ou lípidos.

Axustar a cantidade de microalga necesaria para asegurar o enriquecemento en proteínas e ácidos graxos poliinsaturados dos rotíferos, evitando ao mesmo tempo a sobrealimentación, pode axudar a reducir os custos de produción, de maneira que os esforzos poidan concentrarse en establecer sistemas de cultivo que permitan obter microalgas da composición bioquímica axeitada para producir rotíferos de alto valor nutritivo, que poidan ser empregados con éxito como alimento vivo do seguinte nivel da cadea trófica.

**Táboa 1.** Composición bioquímica de *Nannochloropsis gaditana* cultivada cunha intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  e dúas taxas de renovación.

	Taxa de renovación	
	10 %	40 %
<b>Densidade celular (<math>10^6</math> cél/ml<math>\pm</math>std)</b>	278,7	65,75
<b>Produtividade (<math>10^9</math> células/l/día)</b>	27,87	26,30
<b>Proteína (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	1,18 $\pm$ 0,08	2,59 $\pm$ 0,06
<b>Lípidos (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	1,68 $\pm$ 0,07	1,39 $\pm$ 0,06
<b>Glúcidos (pg/cél<math>\pm</math>std)</b>	0,78 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,03
<b>Total prot+líp+glúc</b>	3,64	4,87
<b>Valor calórico (<math>10^{-7}</math> J/cél)</b>	1,08	1,32
<b>% proteína na F. O.</b>	32,42	53,18
<b>% lípidos na F. O.</b>	46,15	28,54
<b>% glúcidos na F. O.</b>	21,43	18,28

**Táboa 2.** Composición de ácidos graxos de *Nannochloropsis gaditana* cultivada cunha intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  e dúas taxas de renovación.

	Taxa de renovación			
	10%		40%	
Ácidos graxos	% ác gr.	pg/cél	% ác gr.	pg/cél
<b>14:0</b>	<b>8,55</b>	<b>0,146</b>	<b>6,71</b>	<b>0,052</b>
	$\pm 1,72$	$\pm 0,03$	$\pm 1,78$	$\pm 0,017$
<b>16:0</b>	<b>34,32</b>	<b>0,585</b>	<b>24,22</b>	<b>0,187</b>
	$\pm 2,60$	$\pm 0,040$	$\pm 3,73$	$\pm 0,039$
<b>16:1 (<math>\omega</math>-7)</b>	<b>28,22</b>	<b>0,481</b>	<b>22,84</b>	<b>0,175</b>
	$\pm 0,07$	$\pm 0,002$	$\pm 2,44$	$\pm 0,009$
<b>18:1 (<math>\omega</math>-9)</b>	<b>12,27</b>	<b>0,209</b>	<b>4,83</b>	<b>0,037</b>
	$\pm 1,16$	$\pm 0,021$	$\pm 0,77$	$\pm 0,004$
<b>20:4 (<math>\omega</math>-6)</b>	<b>3,87</b>	<b>0,066</b>	<b>6,83</b>	<b>0,052</b>
	$\pm 0,17$	$\pm 0,003$	$\pm 0,21$	$\pm 0,001$
<b>20:5 (<math>\omega</math>-3)</b>	<b>9,79</b>	<b>0,167</b>	<b>27,62</b>	<b>0,212</b>
	$\pm 0,34$	$\pm 0,005$	$\pm 1,67$	$\pm 0,001$
<b>Outros<sup>1</sup></b>	<b>2,99</b>	<b>0,051</b>	<b>6,95</b>	<b>0,053</b>
	$\pm 0,05$	$\pm 0,000$	$\pm 0,42$	$\pm 0,000$
<b>Total ác. gr.</b>		<b>1,705</b>		<b>0,768</b>
		$\pm 0,013$		$\pm 0,044$
<b>Saturados</b>	<b>44,09</b>	<b>0,752</b>	<b>32,60</b>	<b>0,251</b>
	$\pm 0,80$	$\pm 0,008$	$\pm 5,49$	$\pm 0,056$
<b>Monoinsaturados</b>	<b>40,49</b>	<b>0,690</b>	<b>28,04</b>	<b>0,214</b>
	$\pm 1,10$	$\pm 0,024$	$\pm 3,19$	$\pm 0,012$
<b>Saturados+ Monoinsaturados</b>	<b>84,58</b>	<b>1,442</b>	<b>60,63</b>	<b>0,466</b>
	$\pm 0,30$	$\pm 0,016$	$\pm 2,31$	$\pm 0,044$
<b>Poliinsaturados</b>	<b>15,42</b>	<b>0,263</b>	<b>39,37</b>	<b>0,302</b>
	$\pm 0,30$	$\pm 0,003$	$\pm 2,31$	$\pm 0,001$
<b><math>\omega</math>-3</b>	<b>9,82</b>	<b>0,167</b>	<b>27,68</b>	<b>0,212</b>
	$\pm 0,33$	$\pm 0,004$	$\pm 1,66$	$\pm 0,001$
<b><math>\omega</math>-6</b>	<b>5,59</b>	<b>0,095</b>	<b>11,47</b>	<b>0,088</b>
	$\pm 0,05$	$\pm 0,002$	$\pm 0,63$	$\pm 0,000$
<b><math>\omega</math>-3 : <math>\omega</math>-6</b>	<b>1,76</b>		<b>2,41</b>	
	$\pm 0,08$		$\pm 0,01$	
<b>EPA : ARA</b>	<b>2,54</b>		<b>4,04</b>	
	$\pm 0,20$		$\pm 0,12$	

<sup>1</sup>Inclúe 16:2 $\omega$ -6, 16:2 $\omega$ -4, 18:0, 18:1 $\omega$ -7, 18:2 $\omega$ -6, 18:3 $\omega$ -6, 18:3 $\omega$ -3, 20:0 e 20:3 $\omega$ -6.

**Táboa 3.** Composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* enriquecido con diferentes cantidades de *Nannochloropsis gaditana* cultivada con dúas taxas de renovación.

	Taxa de renovación					
	10%			40%		
	80.000 céls/rot.	130.000 céls/rot.	200.000 céls/rot.	80.000 céls/rot.	130.000 céls/rot.	200.000 céls/rot.
<b>Peso seco (ng/rotífero±std)</b>	196,79 ±21,37	257,99 ±17,22	246,13 ±32,56	249,59 ±30,93	313,17 ±21,28	286,27 ±41,72
<b>Proteína (ng/rotífero±std)</b>	105,00 ±6,57	109,98 ±14,38	92,55 ±5,99	113,11 ±13,51	111,13 ±22,05	111,03 ±17,22
<b>Lípidos (ng/rotífero±std)</b>	28,27 ±3,00	33,10 ±2,81	38,48 ±4,75	46,08 ±13,51	45,11 ±5,48	39,42 ±3,90
<b>Glúcidos (ng/rotífero±std)</b>	25,51 ±1,01	26,37 ±2,15	27,67 ±2,69	28,75 ±0,91	33,33 ±2,05	35,40 ±5,63
<b>Valor calórico (10<sup>-3</sup> J/rotífero)</b>	4,09	4,41	4,24	5,05	5,05	4,86
<b>% proteína</b>	53,36	42,63	37,60	45,32	35,49	38,79
<b>% lípidos</b>	14,30	12,83	15,63	18,46	14,40	13,77
<b>% glúcidos</b>	12,97	10,22	11,24	11,52	10,64	12,36
<b>Total orgánico</b>	80,63	65,68	64,47	72,42	60,53	64,92
<b>% proteína na F. O.</b>	65,55	62,04	61,89	64,86	65,39	65,34
<b>% lípidos na F. O.</b>	15,09	18,31	17,70	18,66	15,03	16,49
<b>% glúcidos na F. O.</b>	19,35	19,65	20,41	16,48	19,58	18,16

**Táboa 4.** Produtividade e eficiencias de conversión en *Brachionus plicatilis* enriquecido con diferentes cantidades de *Nannochloropsis gaditana* cultivada con dúas taxas de renovación.

Taxa de renovación nº células/rotífero	10%			40%		
	80.000	130.000	200.000	80.000	130.000	200.000
<b>Produtividade total (µg/ml)</b>	43,10	50,57	49,72	57,90	64,83	57,54
<b>Produtividade orgánica (µg/ml)</b>	34,77	33,21	32,06	43,60	39,24	37,36
<b>Eficiencia de asimilación orgánica (biomasa orgánica de <i>Nannochloropsis</i> / biomasa orgánica final de rotífero)</b>	1,67	2,85	4,54	1,79	3,23	5,21
<b>Proteína (µg/ml)</b>	20,66	28,37	22,78	28,23	34,80	31,78
<b>Lípidos (µg/ml)</b>	5,56	8,54	9,47	11,50	14,13	11,29
<b>Glúcidos (µg/ml)</b>	5,02	6,80	6,81	7,18	10,44	10,13
<b>Eficiencia de asimilación de proteínas</b>	0,91	1,08	2,07	1,47	1,93	3,26
<b>Eficiencia de asimilación de lípidos</b>	4,83	5,12	7,10	1,93	2,56	4,93
<b>Eficiencia de asimilación de glúcidos</b>	2,49	2,98	4,58	1,98	2,22	3,51



**Táboa 5.** Composición de ácidos graxos de *Brachionus plicatilis* enriquecido con distintas cantidades de *Nannochloropsis gaditana* cultivada con dúas taxas de renovación.

Taxa de renovación	10%						40%					
Ración de alimento	80.000 céls/rotífero		130.000 céls/rotífero		200.000 céls/rotífero		80.000 céls/rotífero		130.000 céls/rotífero		200.000 céls/rotífero	
	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot
<b>14:0</b>	<b>6,26</b>	<b>2,53</b>	<b>6,92</b>	<b>2,82</b>	<b>7,12</b>	<b>3,03</b>	<b>8,19</b>	<b>3,31</b>	<b>7,73</b>	<b>3,24</b>	<b>7,36</b>	<b>3,01</b>
	±1,39	±0,60	±1,51	±0,93	±0,35	±0,50	±0,84	±0,46	±0,59	±0,40	±1,03	±0,65
<b>16:0</b>	<b>23,21</b>	<b>8,25</b>	<b>25,13</b>	<b>10,04</b>	<b>23,88</b>	<b>10,09</b>	<b>23,14</b>	<b>9,33</b>	<b>23,40</b>	<b>9,80</b>	<b>22,60</b>	<b>9,17</b>
	±2,28	±2,01	±3,10	±1,44	±1,51	±0,88	±0,07	±0,38	±2,06	±1,09	±0,44	±0,53
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>27,89</b>	<b>9,20</b>	<b>23,74</b>	<b>9,61</b>	<b>24,02</b>	<b>10,13</b>	<b>20,23</b>	<b>8,14</b>	<b>15,89</b>	<b>6,77</b>	<b>20,18</b>	<b>8,27</b>
	±4,11	±0,51	±1,40	±1,95	±3,20	±1,16	±1,93	±0,47	±2,65	±1,99	±3,55	±2,06
<b>18:0</b>	<b>7,08</b>	<b>2,45</b>	<b>5,42</b>	<b>2,14</b>	<b>4,03</b>	<b>1,70</b>	<b>4,23</b>	<b>1,70</b>	<b>4,36</b>	<b>1,81</b>	<b>4,25</b>	<b>1,71</b>
	±0,51	±0,17	±1,30	±0,36	±0,48	±0,16	±0,07	±0,04	±0,60	±0,05	±1,06	±0,30
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>10,43</b>	<b>3,96</b>	<b>10,39</b>	<b>4,19</b>	<b>9,67</b>	<b>3,99</b>	<b>6,15</b>	<b>2,47</b>	<b>5,46</b>	<b>2,32</b>	<b>4,85</b>	<b>1,97</b>
	±2,13	±0,44	±0,97	±0,80	±2,88	±0,75	±1,63	±0,56	±0,74	±0,57	±0,28	±0,18
<b>18:1 (ω-7)</b>	<b>2,30</b>	<b>0,90</b>	<b>3,02</b>	<b>1,23</b>	<b>3,29</b>	<b>1,40</b>	<b>2,13</b>	<b>0,85</b>	<b>2,65</b>	<b>1,14</b>	<b>3,74</b>	<b>1,53</b>
	±0,53	±0,08	±0,28	±0,29	±0,32	±0,27	±0,43	±0,14	±0,62	±0,41	±0,58	±0,33
<b>18:2 (ω-6)</b>	<b>2,88</b>	<b>1,21</b>	<b>2,56</b>	<b>1,03</b>	<b>2,78</b>	<b>1,19</b>	<b>2,94</b>	<b>1,19</b>	<b>2,94</b>	<b>1,24</b>	<b>3,00</b>	<b>1,22</b>
	±1,35	±0,35	±0,29	±0,19	±0,29	±0,30	±0,12	±0,00	±0,49	±0,28	±0,17	±0,03
<b>20:1 (ω-9)</b>	<b>1,93</b>	<b>0,75</b>	<b>2,13</b>	<b>0,86</b>	<b>2,02</b>	<b>0,85</b>	<b>1,83</b>	<b>0,74</b>	<b>1,63</b>	<b>0,69</b>	<b>1,77</b>	<b>0,72</b>
	±0,28	±0,13	±0,02	±0,13	±0,32	±0,11	±0,02	±0,04	±0,23	±0,12	±0,33	±0,12
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>3,26</b>	<b>1,27</b>	<b>3,63</b>	<b>1,45</b>	<b>4,02</b>	<b>1,73</b>	<b>5,37</b>	<b>2,17</b>	<b>5,94</b>	<b>2,49</b>	<b>4,92</b>	<b>1,99</b>
	±0,54	±0,31	±0,23	±0,19	±0,83	±0,55	±0,36	±0,23	±0,42	±0,28	±0,29	±0,11
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>8,16</b>	<b>3,12</b>	<b>10,96</b>	<b>4,42</b>	<b>12,81</b>	<b>5,67</b>	<b>18,64</b>	<b>7,54</b>	<b>21,53</b>	<b>9,03</b>	<b>19,07</b>	<b>7,73</b>
	±0,90	±0,54	±1,81	±1,09	±5,30	±3,14	±2,59	±1,33	±3,07	±1,41	±0,60	±0,34
<b>22:5 (ω-6)</b>	<b>0,16</b>	<b>0,50</b>	<b>0,17</b>	<b>0,37</b>	<b>0,18</b>	<b>0,35</b>	<b>0,62</b>	<b>0,30</b>	<b>0,85</b>	<b>0,47</b>	<b>0,51</b>	<b>0,38</b>
	±0,04	±0,38	±0,03	±0,10	±0,06	±0,08	±0,70	±0,30	±0,33	±0,05	±0,45	±0,10
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>1,47</b>	<b>0,06</b>	<b>0,91</b>	<b>0,07</b>	<b>0,83</b>	<b>0,07</b>	<b>0,72</b>	<b>0,25</b>	<b>1,13</b>	<b>0,37</b>	<b>0,93</b>	<b>0,21</b>
	±0,68	±0,02	±0,15	±0,02	±0,14	±0,02	±0,72	±0,27	±0,11	±0,20	±0,26	±0,20
<b>Outros<sup>1</sup></b>	<b>4,98</b>	<b>2,12</b>	<b>5,04</b>	<b>2,03</b>	<b>5,35</b>	<b>2,30</b>	<b>5,80</b>	<b>2,34</b>	<b>6,49</b>	<b>2,72</b>	<b>6,81</b>	<b>2,71</b>
	±0,30	±0,52	±0,50	±0,42	±0,55	±0,58	±0,28	±0,20	±0,20	±0,31	±2,83	±0,92

<b>Total</b>		<b>36,05</b> ±4,12	<b>40,26</b> ±6,21	<b>42,51</b> ±6,26		<b>40,32</b> ±1,54	<b>42,09</b> ±5,90	<b>40,62</b> ±3,09				
<b>Saturados</b>	<b>38,40</b> ±2,61	<b>13,84</b> ±2,89	<b>39,30</b> ±5,00	<b>15,76</b> ±2,78	<b>36,60</b> ±1,61	<b>15,49</b> ±1,58	<b>37,31</b> ±0,96	<b>15,05</b> ±0,96	<b>37,06</b> ±3,00	<b>15,52</b> ±1,51	<b>35,87</b> ±0,72	<b>14,56</b> ±0,96
<b>Monoinsaturados</b>	<b>43,10</b> ±3,59	<b>15,02</b> ±0,23	<b>39,81</b> ±2,45	<b>16,10</b> ±3,17	<b>39,52</b> ±5,33	<b>16,59</b> ±0,67	<b>30,87</b> ±3,92	<b>12,42</b> ±1,10	<b>26,20</b> ±3,39	<b>11,15</b> ±2,97	<b>31,00</b> ±3,99	<b>12,67</b> ±2,51
<b>Saturados+ Monoinsaturados</b>	<b>81,50</b> ±2,50	<b>28,86</b> ±3,12	<b>79,12</b> ±2,90	<b>31,85</b> ±5,08	<b>76,12</b> ±6,74	<b>32,09</b> ±1,89	<b>68,18</b> ±2,96	<b>27,47</b> ±0,14	<b>63,26</b> ±3,88	<b>26,66</b> ±4,40	<b>66,87</b> ±3,40	<b>27,23</b> ±3,41
<b>Poliinsaturados</b>	<b>18,50</b> ±2,50	<b>6,70</b> ±0,62	<b>20,88</b> ±2,90	<b>8,04</b> ±1,71	<b>23,88</b> ±6,74	<b>10,07</b> ±4,38	<b>31,82</b> ±2,96	<b>12,56</b> ±1,38	<b>36,74</b> ±3,88	<b>14,96</b> ±2,23	<b>33,13</b> ±3,40	<b>13,01</b> ±0,43
<b>ω-3</b>	<b>11,12</b> ±1,31	<b>3,78</b> ±0,62	<b>13,52</b> ±2,18	<b>5,16</b> ±1,26	<b>15,42</b> ±5,30	<b>6,49</b> ±3,25	<b>20,94</b> ±3,24	<b>8,42</b> ±1,06	<b>25,44</b> ±2,47	<b>10,55</b> ±1,31	<b>23,05</b> ±3,23	<b>9,14</b> ±0,62
<b>ω-6</b>	<b>7,19</b> ±1,65	<b>3,34</b> ±0,41	<b>7,09</b> ±0,87	<b>3,14</b> ±0,54	<b>8,20</b> ±1,42	<b>3,82</b> ±1,15	<b>10,59</b> ±0,24	<b>4,32</b> ±0,64	<b>11,03</b> ±1,69	<b>4,76</b> ±0,93	<b>9,79</b> ±0,34	<b>4,13</b> ±0,29
<b>ω-3/ω-6</b>	<b>1,59</b> ±0,33		<b>1,91</b> ±0,16		<b>1,85</b> ±0,34		<b>1,98</b> ±0,35		<b>2,33</b> ±0,28		<b>2,35</b> ±0,30	
<b>EPA/ARA</b>	<b>2,52</b> ±0,15		<b>3,01</b> ±0,38		<b>3,12</b> ±0,83		<b>3,47</b> ±0,25		<b>3,62</b> ±0,27		<b>3,88</b> ±0,17	
<b>DHA/EPA</b>	<b>0,18</b> ±0,08		<b>0,08</b> ±0,01		<b>0,07</b> ±0,02		<b>0,04</b> ±0,03		<b>0,05</b> ±0,00		<b>0,05</b> ±0,01	

<sup>1</sup>Inclúe 12:0, 15:0, 16:2ω-6, 16:2ω-4, 18:3ω-6, 18:3ω-3, 18:4ω-3, 20:0, 20:2, 20:3, 22:0 e 22:1.

## **Capítulo 9.**

---

**Enriquecimento de *Brachionus plicatilis* durante 2 h ou 24 h con *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) e *Nannochloropsis gaditana* cultivadas en sistema semicontinuo**



## **Introdución**

Os numerosos protocolos relativos ao enriquecemento de rotíferos non establecen unha diferenza clara entre enriquecementos curtos e longos en canto á súa duración. Droop e Scott (1978) e Scott (1980) calcularon que o contido estomacal contribuíu soamente ao 12% do peso total do rotífero. Por outra banda, o ciclo de dixestión do rotífero é moi curto, arredor de 20 minutos (Patiño, 1995; Hino *et al.*, 1997). En consecuencia, as técnicas de enriquecemento deben enfocarse á incorporación de nutrientes aos tecidos do rotífero e non limitarse á súa acumulación no tubo dixestivo, xa que o tempo de retención é tan breve que pode dar lugar a perdas do valor nutritivo antes de que os rotíferos sexan consumidos (Dhert *et al.*, 2001). Para obter os máximos contidos de lípidos e ácidos graxos son necesarias entre 12 e 24 h (Frolov *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1996); porén, durante un enriquecemento longo o metabolismo do rotífero transforma os lípidos ingeridos e a dispoñibilidade de certos ácidos graxos pode diminuír (Ando *et al.*, 2004).

Existen traballos sobre o efecto do tempo de enriquecemento na composición de ácidos graxos dos rotíferos realizados con dietas artificiais (Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1996; Ando *et al.*, 2004) e con microalgas (Scott e Baynes, 1978; Frolov *et al.*, 1991). Porén, en ningún dos traballos realizados con microalgas se tivo en conta a posibilidade de modificar a súa composición mediante a variación das condicións de cultivo, de xeito similar á utilización de emulsións con distintas composicións nos experimentos realizados con dietas artificiais.

## **Deseño experimental**

*Nannochloropsis gaditana* CCMP527 e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO, CCMP1324) foron cultivadas en réxime semicontínuo en botellas de 1 litro de capacidade cun volume de cultivo de 900 ml. A concentración de nitróxeno utilizada foi 2,5 mM, e o resto de nutrientes en cantidades proporcionais, segundo a composición do medio de cultivo detallada no apartado "Materiais e métodos". O

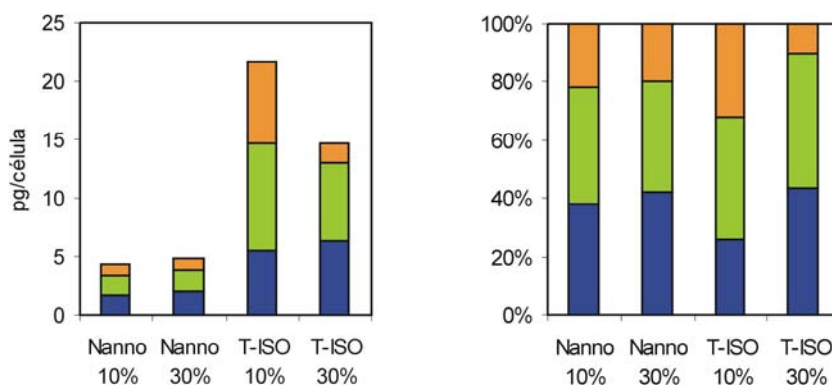
régime de iluminación foi circadiano, 12 horas de luz: 12 h de escuridade, e a intensidade luminosa foi de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ . Aplicáronse dúas taxas de renovación, 10% e 30%. Unha vez alcanzado o estado de equilibrio recolléronse mostras de microalgas para a determinación de peso seco e da composición bioquímica –proteínas, glúcidos, lípidos e ácidos graxos- e para o enriquecemento dos rotíferos. Os rotíferos mantivéronse en botellas de 1 l contendo 800 ml de cultivo de rotíferos cunha densidade de 200 individuos/ml. A cantidade de microalga utilizada foi a mesma nas dúas taxas de renovación, 33.000 células/rotífero no enriquecemento con T-ISO e 120.000 células/rotífero no enriquecemento con *N. gaditana*, desta maneira o peso seco de alimento empregado foi o mesmo independentemente da microalga utilizada. Realizáronse enriquecementos de distinta duración, 2 h ou 24 h, e transcorrido ese periodo os rotíferos filtráronse, laváronse con auga destilada e recolléronse nun filtro de 40  $\mu\text{m}$  de malla para a súa conxelación e posteriormente analizar o seu contido de ácidos graxos.

## **Resultados e discusión**

### *Nannochloropsis gaditana* e T-ISO

As densidades celulares nos cultivos de *N. gaditana* en estado de equilibrio foron  $124,87 \times 10^6$  células/ml na taxa de renovación do 10% e  $56,5 \times 10^6$  células/ml na taxa de renovación do 30%, mentres que no caso de T-ISO as densidades celulares foron  $36,06 \times 10^6$  e  $22,81 \times 10^6$  células/ml respectivamente. Estas densidades foron moito máis baixas que as obtidas en cultivos en biorreactores de 80 ml, que foron  $223,27 \times 10^6$  células/ml e  $101,83 \times 10^6$  células/ml en *N. gaditana* e  $70,58 \times 10^6$  células/ml e  $60,56 \times 10^6$  células/ml en T-ISO (Capítulos 2 e 4). A concentración de nitrato reduciuse a 2,5 mM para asegurar que os cultivos sometidos á taxa de renovación do 10% estivesen limitados por nutrientes, xa que nas condicións de cultivo empregadas, unha concentración 4 mM podería dar lugar a cultivos saturados por nitróxeno mesmo con taxas de renovación baixas. En consecuencia, a concentración de  $\text{NO}_3^-$  nos cultivos sometidos á taxa de renovación do 10% antes da dilución diaria foi de 0,07 mM e 0,03 mM en *N. gaditana* e T-ISO respectivamente, mentres que nos

cultivos da taxa de renovación do 30% a concentración residual de nitrato foi 0,95 mM e 0,60 mM respectivamente. Isto indica que os cultivos da taxa de renovación do 10% estiveron limitados por nutrientes, mentres que os sometidos á taxa de renovación do 30% tiveron dispoñibilidade de nutrientes, e esta diferenza afectou á composición bioquímica das dúas microalgas. O contido de proteínas incrementouse en ambas especies ao aumentar a taxa de renovación, de 1,64 a 2,06 pg/célula en *N. gaditana* e de 5,57 a 6,34 pg/célula en T-ISO. Estes valores de proteína son maiores que os observados nos cultivos de 80 ml (Figura 1). A menor densidade celular aumenta a dispoñibilidade de nitróxeno por célula e polo tanto a cantidade de proteína tamén é maior, como se observou xa no Capítulo 1.



**Figura 1.** Composición bioquímica de *N. gaditana* e T-ISO en función da taxa de renovación. Esquerda, expresada en pg/célula. Dereita, expresada en porcentaxes sobre o total da fracción orgánica. ■, proteínas; ■, lípidos; ■, glúcidos.

Os contidos de lípidos e glúcidos de *N. gaditana* case non variaron, sendo 1,70 e 0,94 pg/célula respectivamente na taxa de renovación do 10% e 1,82 e 0,97 pg/célula na taxa de renovación do 30%. En T-ISO os dous compoñentes diminuíron ao incrementarse a taxa de renovación. Os lípidos pasaron de 9,14 a 6,73 pg/célula, e os glúcidos reducíronse de 7,02 a 1,54 pg/célula (Figura 1). A drástica redución do contido de glúcidos e a maior cantidade de lípidos presente nas células de T-ISO correspóndese coa evolución observada no capítulo 3, no que se viu que en condicións de intensidade luminosa baixa T-ISO acumula preferentemente lípidos e non glúcidos. A mesma evolución obsérvase en *N. gaditana*. Nos cultivos en fotobiorreactores de 80 ml a redución da intensidade

luminosa de 162 a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  fixo que a redución do contido lipídico ao aumentar a taxa de renovación fose menor e diminuíu o contido de glúcidos (Capítulos 4 e 8). Nos cultivos en botella a dispoñibilidade de luz foi aínda menor e probablemente a saturación por nitróxeno na taxa de renovación do 30% estimulou unha maior síntese de ácidos graxos poliinsaturados destinados á formación de membrana tilacoidal.

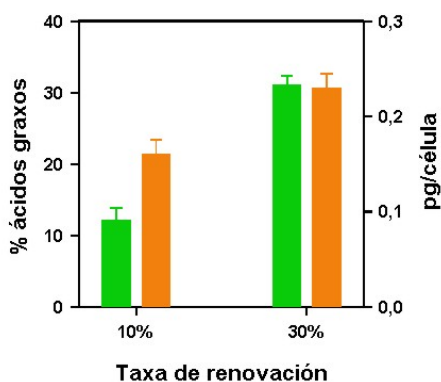
Se os contidos de proteínas, glúcidos e lípidos se expresan como porcentaxes da fracción orgánica, obsérvase que case non houbo variacións coa taxa de renovación en *Nannochloropsis gaditana*. A proteína incrementouse do 38,3% ao 42,5%, os lípidos descendieron do 39,7% ao 37,5% e os glúcidos diminuíron do 22% ao 20%. En T-ISO, polo contrario, o incremento da taxa de renovación fixo que a porcentaxe de glúcidos se reducira do 32,3% ao 10,5%, mentres que as proteínas experimentaron un forte incremento, do 25,6% ao 43,4%, e os lípidos tamén se incrementaron lixeiramente do 42,1% ao 46,1% (Figura 1).

A taxa de renovación tamén afectou ao perfil de ácidos graxos das dúas microalgas. O contido total de ácidos graxos reduciuse na taxa de renovación do 30% respecto dos valores obtidos coa taxa de renovación do 10%. En T-ISO o total dos ácidos graxos pasou de 3,04 a 1,98  $\text{pg/célula}$ , mentres que en *N. gaditana* o contido de ácidos graxos reduciuse á metade, de 1,35 a 0,73  $\text{ng/célula}$ . O contido de ácidos graxos en *N. gaditana* cultivada en botella foi lixeiramente maior que nos cultivos en biorreactores tubulares, en cambio, en T-ISO o incremento foi moi marcado, xa que T-ISO responde á baixa dispoñibilidade de luz acumulando maiores cantidades de lípidos e polo tanto tamén de ácidos graxos. O sistema de cultivo de microalgas en botellas reduciu a dispoñibilidade de enerxía lumínica debido ao maior volume de cultivo. Probablemente este feito reduciu as diferencias no perfil de ácidos graxos das microalgas entre as dúas taxas de renovación empregadas en comparación cos cultivos realizados en fotobiorreactores de 80 ml, especialmente no referido á relación saturados+monoinsaturados/poliinsaturados (Capítulos 2, 3, 4 e 8).

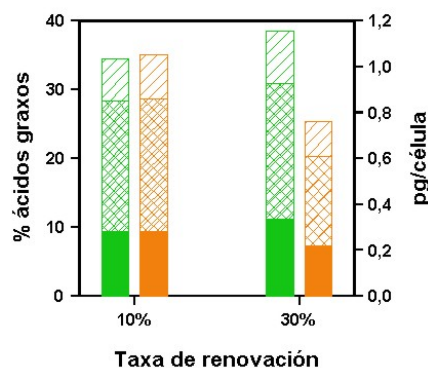
As modificacións na composición de ácidos graxos como consecuencia do aumento da taxa de renovación foron moi marcadas en *N. gaditana*, onde a suma



dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados diminuíu do 81,70% ao 57,77% e de 1,11 a 0,42 pg/célula, valores moi similares aos obtidos nos biorreactores tubulares. Os ácidos graxos poliinsaturados pasaron do 18,31% ao 42,23%, pero este aumento porcentual traducíuse nun incremento moi pequeno do contido celular, de 0,24 a 0,31 pg/célula, debido ao descenso do contido de ácidos graxos totais na taxa de renovación do 30%. En T-ISO, a porcentaxe de ácidos graxos saturados+monoinsaturados na taxa de renovación do 10% foi moito menor que nos cultivos de 80 ml. Por este motivo, o efecto da taxa de renovación non foi tan evidente e a porcentaxe de ácidos graxos saturados e monoinsaturados reduciuse do 58,40% ao 52,48% mentres que o de poliinsaturados se incrementou do 41,60% ao 47,22%. Nesta especie, os contidos celulares das dúas fraccións descendéron ao incrementarse a taxa de renovación. O maior descenso correspondeu aos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, que pasaron de 1,78 a 1,05 pg/célula, mentres que os poliinsaturados descendéron de 1,21 a 0,90 pg/célula (Táboa 1).



**Figura 2.** Contido de EPA (equivalente ao contido total de  $\omega$ -3) de *N. gaditana*.  
 ■, % EPA; ■, pg EPA/célula.



**Figura 3.** Contido de ácidos graxos  $\omega$ -3 de T-ISO. ■, % DHA; ■, % 18:4; ■, % resto  $\omega$ -3  
 ■, pg DHA/célula; ■, pg 18:4/célula; ■, pg resto  $\omega$ -3/célula.

En *N. gaditana*, practicamente toda a fracción  $\omega$ -3 corresponde ao EPA (20:5 $\omega$ -3), que se atopa acompañado de trazas de ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 $\omega$ -3). Igual que aconteceu nos biorreactores de 80 ml, a porcentaxe de EPA case se triplicou ao incrementarse a taxa de renovación, pasando do 12,19% ao 31,23%. O incremento en contido celular foi en cambio moito menor, de 0,16 a 0,23

pg/célula (Figura 2; Táboa 1). O conxunto dos ácidos graxos  $\omega$ -6 incrementouse do 6,06% ao 10,89%, pero o contido celular mantívose en 0,08 ng/célula. O máis abundante foi o ácido araquidónico, 20:4 $\omega$ -6, que se incrementou en porcentaxe, do 3,89% ao 6,07%, pero descendeu en contido celular de 0,05 a 0,04 pg/célula. Tanto a relación  $\omega$ -3: $\omega$ -6 como a relación EPA:ARA incrementáronse coa taxa de renovación (Táboa 1).

En T-ISO o ácido graxo  $\omega$ -3 máis abundante foi o 18:4, seguido do DHA (22:6 $\omega$ -3) e do 18:3. Os incrementos no contido porcentual de tódolos ácidos graxos poliinsaturados de T-ISO debidos á maior taxa de renovación foron moi pequenos, e o contido expresado en ng/célula diminuíu como consecuencia do descenso do contido total de ácidos graxos e do escaso aumento da porcentaxe da fracción poliinsaturada. Este efecto tamén se observou en T-ISO cultivada con 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s (Capítulo 3), na que o contido total de ácidos graxos tamen descendeu de forma notable coa taxa de renovación. Así, a proporción de 18:4 $\omega$ -3 aumentou unicamente un 0,7%, mentres que o contido celular descendeu de 0,58 a 0,39 pg/célula. A porcentaxe de DHA pasou do 9,40% ao 11,18%, e o contido celular descendeu de 0,28 a 0,22 pg/célula. Esta mesma tendencia obsérvase nos conxuntos dos ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6. A diferenza do acontecido en *N. gaditana*, a relación  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 descendeu ao incrementarse a taxa de renovación (Figura 3; Táboa 1).

#### *Enriquecemento 2 horas*

Nos rotíferos enriquecidos durante 2 h o contido total de ácidos graxos foi similar en tódalas condicións, oscilando entre os 11,7 e os 17,8 ng/rotífero, aínda que lixeiramente máis alto nos alimentados con *N. gaditana*. Os que recibiron T-ISO da taxa de renovación do 30% presentaron un contido notablemente máis baixo que os demais grupos (Táboas 2 e 3). A influencia da composición do alimento sobre o perfil de ácidos graxos do rotífero foi asimismo limitada, aínda que os rotíferos enriquecidos con T-ISO presentaron maiores cantidades de 14:0, 18:4 e DHA, e os enriquecidos con *N. gaditana* presentaron máis 16:1 $\omega$ -7 e máis EPA, reflexando as diferenzas na composición de ácidos graxos das dúas microalgas. Porén, en experimentos realizados con enriquecedores comerciais, os cambios na composición lipídica dos rotíferos poden apreciarse ás 3 horas (Fernández-Reiriz *et al.*, 1993), aínda que dependendo do

tipo de lípido utilizado na preparación do enriquecedor, o tempo necesario para que o incremento do contido lipídico sexa significativo pode variar (Rodríguez *et al.*, 1996).

Porén, a pesar da gran dispoñibilidade de alimento, a acumulación de ácidos graxos poliinsaturados en 2 h foi escasa (Táboas 2 e 3), o que concorda cos datos de Rodríguez *et al.* (1996) que observaron un baixo contido de ácidos graxos  $\omega$ -3 despois de 3 horas de enriquecemento independentemente da concentración presente na emulsión enriquecedora. O incremento da porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados experimentado nos cultivos microalgais sometidos a unha taxa de renovación do 30%, especialmente en *N. gaditana*, non se traduciu en grandes diferencias nos rotíferos. A porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados nos rotíferos alimentados con *N. gaditana* situouse arredor do 25%, mentres que nos enriquecidos con T-ISO superou o 30% (Táboas 2 e 3).

A porcentaxe de ácidos graxos  $\omega$ -3 tamén foi maior nos rotíferos enriquecidos con T-ISO. O contido dos ácidos graxos poliinsaturados e  $\omega$ -3 en particular foi bastante similar en tódolos grupos de rotíferos, oscilando entre 4,0 e 4,5 e entre 2,7 e 3,1 ng/rotífero respectivamente. Cando se empregou T-ISO, a acumulación destas clases de ácidos graxos foi maior nos rotíferos que recibiron microalga da taxa de renovación do 10%, pero no caso de *N. gaditana* foron os enriquecidos coa taxa de renovación do 30% os que acumularon maior cantidade (Figura 4; Táboas 2 e 3). Concentracións baixas destes ácidos graxos na dieta dan lugar tamén a baixas concentracións no rotífero, pero son necesarios periodos de enriquecemento de ata 24 horas para que aparezan diferencias cando se utilizan enriquecedores con diferentes contidos de lípidos (Rodríguez *et al.*, 1996). Por tanto, a pesares de que non é probable que o efecto da dieta se manifestara ás 2 horas, os datos de acumulación de ácidos graxos poliinsaturados e  $\omega$ -3 coinciden coas cantidades subministradas na dieta, que no caso de *N. gaditana* foron maiores na taxa de renovación do 30% e no caso de T-ISO, na taxa de renovación do 10%.

A porcentaxe e o contido de EPA dos rotíferos enriquecidos con *N. gaditana* foron maiores na taxa de renovación do 30%, 10,04% e 1,71 ng/rotífero fronte a 7,93% e 1,40 ng/rotífero na taxa de renovación do 10%, pero esta

diferencia foi moito menor que a ocasionada na microalga pola maior taxa de renovación. O gran aumento do EPA producido pola maior taxa de renovación na microalga non se manifestou nos rotíferos. Nos rotíferos alimentados con T-ISO o contido e a porcentaxe de DHA foron moi similares nos dous grupos, e polo tanto non dependeron da taxa de renovación, situándose os seus valores arredor de 0,40 ng/rotífero, equivalentes a un 3% dos ácidos graxos totais aproximadamente (Figura 4; Táboa 3). O mesmo aconteceu co 18:4, o outro ácido graxo  $\omega$ -3 aportado pola microalga, que se mantivo entre 0,90 e 1,06 ng/rotífero (Táboa 3).

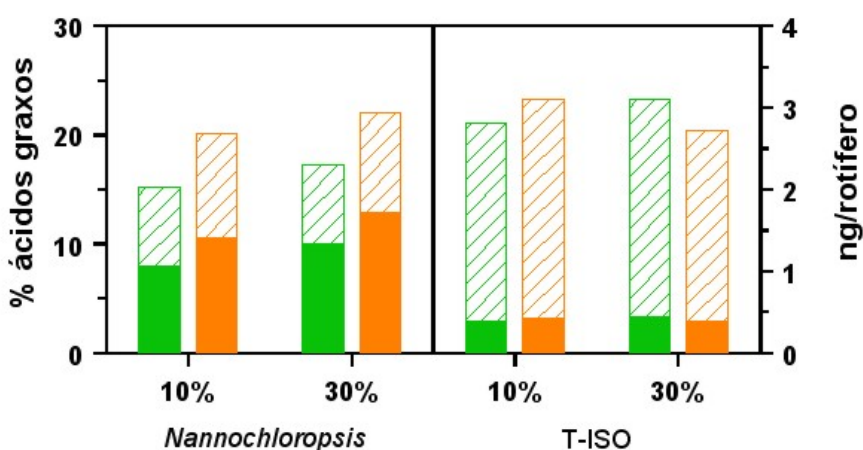


Figura 4. Ácidos graxos poliinsaturados de *B. plicatilis* enriquecido durante 2 h con *N. gaditana* ou T-ISO. ■, porcentaxes; ■, ng/rotífero. Barras lisas, EPA (en *N. gaditana*) ou DHA (en T-ISO); barras raiadas, resto de  $\omega$ -3.

O tempo necesario descrito na bibliografía para obter unha concentración elevada de ácidos graxos  $\omega$ -3 nos rotíferos depende do tipo de enriquecedor utilizado. Ando *et al.* (2004) conseguen que as porcentaxes de EPA e DHA pasen do 0,3% a valores entre o 5,2% e o 6,8% en 4 h, enriquecendo os rotíferos con triacilglicerois. Cando se empregan outro tipo de dietas, tales como emulsións con menor contido lipídico ou microalgas, é necesario aumentar o tempo de enriquecemento ata as 12 h se se queren obter altas concentracións de ácidos graxos  $\omega$ -3 (Frolov *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1996), aínda que Watanabe *et al.* (1983) citan porcentaxes de EPA do 12% alcanzados en 6 h de enriquecemento con "*Chlorella mariña*" (*Nannochloropsis*). Os nosos rotíferos

enriquecidos durante 2 h presentan porcentaxes de ácidos graxos  $\omega$ -3 relativamente elevados, entre o 15% e o 24%, pero o contido destes ácidos graxos expresado como ng/rotífero é moi baixo.

#### *Enriquecemento 24 horas*

Transcorridas 24 horas a densidade de rotíferos incrementouse sensiblemente nos grupos enriquecidos con *N. gaditana* e T-ISO cultivadas cunha taxa de renovación do 30%, mentres que os alimentados con microalgas da taxa de renovación do 10% a densidade permaneceu arredor dos 200 rotíferos/ml iniciais (Figura 5). Este fenómeno xa se observou noutros experimentos de enriquecemento durante 24 h con microalgas cultivadas con varias taxas de renovación, con limitación e saturación por nitróxeno, detallados no capítulo 8. Polo contrario, a utilización de aceites para o enriquecemento dos rotíferos provoca mortalidades de ata o 32%, dependendo do tipo de lípido empregado e da súa concentración (Rodríguez *et al.*, 1996).

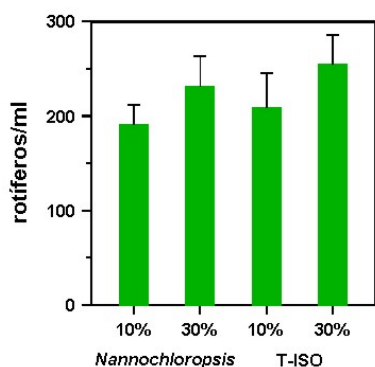


Figura 5. Densidade de rotíferos ás 24 h.

O enriquecemento dos rotíferos durante 24 h produciu diferencias no contido e no perfil de ácidos graxos respecto dos enriquecidos durante soamente 2 h. A cantidade de ácidos graxos totais aumentou, pero o incremento non foi igual nas catro condicións probadas. Mentres que nos rotíferos alimentados con *N. gaditana* da taxa de renovación do 10% e con T-ISO da taxa de renovación do 30% o contido de ácidos graxos se duplicou, nos demais grupos de rotíferos o incremento foi moito máis pequeno (Táboas 2 e 3).

Conseguir un elevado contido de ácidos graxos  $\omega$ -3 nos rotíferos require un período de enriquecemento prolongado, pois observouse que con enriquecedores artificiais a cantidade acumulada se incrementa de forma case lineal ata as 12 horas se o contido de lípidos da dieta é baixo ou ata as 24 horas se é máis elevado (Rodríguez *et al.*, 1996). Entre as 24 e as 48 h de enriquecemento, a composición dos rotíferos alimentados con microalgas permanece estable (Frolov *et al.*, 1991). Nos rotíferos enriquecidos con *N. gaditana* cultivada cunha taxa de renovación do 10%, a porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados e  $\omega$ -3 non variou respecto ao enriquecemento de 2 h, pero debido ao incremento do contido de ácidos graxos totais a cantidade destes ácidos graxos expresada en ng/rotífero duplicouse. Nos rotíferos que recibiron microalga da taxa de renovación do 30% rexistrouse un forte aumento da porcentaxe de ácidos graxos poliinsaturados e  $\omega$ -3 que tamén se traduciu nun aumento do contido por rotífero (Táboa 2). En T-ISO os incrementos nas porcentaxes de ácidos graxos poliinsaturados e  $\omega$ -3 foron pequenos pero tamén produciron aumentos nos contidos por individuo, moi elevados nos rotíferos alimentados coa taxa de renovación do 30% (Táboa 3).

O maior tempo de enriquecemento fixo aumentar a porcentaxe de EPA nos rotíferos alimentados con *N. gaditana* de maneira que se aproximou máis á porcentaxe do ácido graxo na microalga, pero o contido de EPA foi maior nos rotíferos que recibiron *N. gaditana* da taxa de renovación do 10%, en contraste coa evolución do EPA na microalga e co acontecido no enriquecemento de 2 h. Estes rotíferos acumularon 4,44 ng de EPA/individuo, mentres que os alimentados coa taxa de renovación do 30% presentaban 3,65 ng/individuo (Táboa 2; Figura 6). Estes valores representan o dobre e o triple respectivamente da cantidade de EPA acumulada tras 2 h de enriquecemento en cada taxa de renovación. Nos rotíferos enriquecidos con T-ISO, a porcentaxe e o contido de DHA tamén se incrementaron e mostraron un comportamento inverso ao observado na microalga, de maneira que a porcentaxe máis elevada de DHA atopouse nos rotíferos alimentados coa taxa de renovación do 10%, mentres que o máximo contido por individuo correspondeu aos que recibiron a taxa de renovación do 30%. Na taxa de renovación do 10% a porcentaxe de DHA foi do 5,86% e o contido, 1,15 ng/rotífero, e na taxa de renovación do 30% foron 4,69% e 1,45 ng/rotífero (Figura 6; Táboa 3). A evolución dos contidos de EPA e DHA refléxase

na porcentaxe de recuperación de cada ácido graxo nos rotíferos. No caso dos rotíferos enriquecidos con *N. gaditana*, a recuperación do EPA foi máis eficiente nos que recibiron microalga da taxa de renovación do 10%, mentres que nos alimentados con T-ISO a porcentaxe de recuperación foi máis elevada nos rotíferos enriquecidos coa taxa de renovación do 30% (Táboa 4).

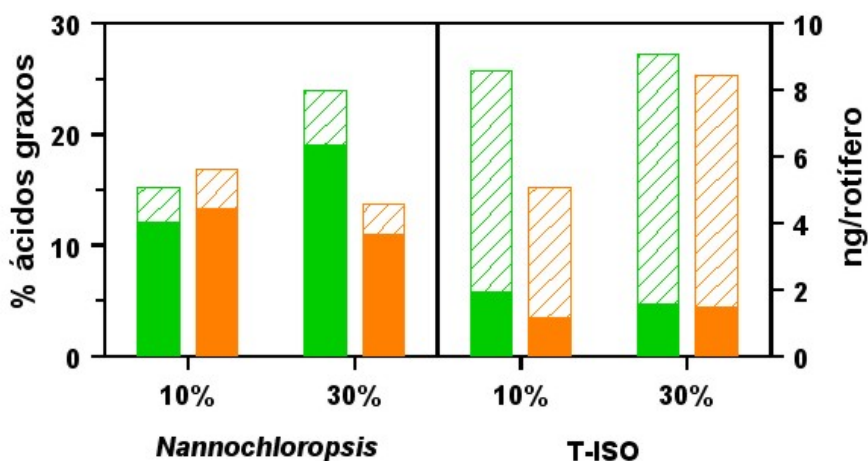


Figura 6. Ácidos graxos poliinsaturados de *B. plicatilis* enriquecido durante 24 h con *N. gaditana* ou T-ISO. Verde, porcentaxes; laranxa, ng/rotífero. ■ : EPA ou DHA; ▨, resto de ω-3.

O aumento da poboación dos rotíferos alimentados con *N. gaditana* cultivada cunha taxa de renovación do 30% puido provocar que parte do EPA fose consumido na produción de ovos. Øie *et al.* (1997) observaron que canto maior é a taxa de crecemento dunha poboación de rotífero maior é tamén a relación proteína/lípido dos individuos, o que suxire un incremento do consumo das reservas enerxéticas para soste a actividade reproductora. En rotíferos sometidos a un enriquecemento longo con emulsións lipídicas, durante o que se produce o crecemento da poboación, tamén se observa que o contido de lípidos e ácidos graxos é menor que nos rotíferos enriquecidos durante 24 h (Rainuzzo *et al.*, 1994). O baixo contido de lípidos de *N. gaditana* procedente da taxa de renovación do 30% puido obrigar aos rotíferos a consumir parte do EPA acumulado como fonte de enerxía, xa que os rotíferos alimentados con esta

microalga presentaron un contido moi baixo de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, xeralmente implicados en funcións enerxéticas.

Nos rotíferos alimentados con T-ISO, o perfil de ácidos graxos experimentou a evolución xa observada en capítulos anteriores, incrementándose o contido de ácidos graxos poliinsaturados cando foron alimentados con microalgas cultivadas cunha taxa de renovación que proporcionou unha boa dispoñibilidade de nitróxeno no medio. Igual que aconteceu nos cultivos realizados en fotobiorreactores de 80 ml, a composición de T-ISO cultivada en botellas de 900 ml modificouse notablemente co aumento da taxa de renovación. É posible que a diminución do contido de glúcidos e lípidos a fixera máis dixerible para os rotíferos, que desta maneira puideron asimilar mellor os seus nutrientes, entre eles o DHA, a pesar de que T-ISO da taxa de renovación do 30% presentou menor cantidade de DHA por célula.

O enriquecemento durante 2 horas non foi suficiente para obter unha gran acumulación de ácidos graxos nos rotíferos. O contido de ácidos graxos dos rotíferos incrementábase en gran medida prolongando o enriquecemento ata as 24 horas, pero non se pode descartar que tempos de enriquecemento intermedios – de 12 a 18 horas- dean igualmente bos resultados. A diferenza do que aconteceu nos enriquecementos con emulsións lipídicas, o uso de microalgas non provocou mortalidades que fixeran diminuír a densidade dos rotíferos, que mesmo aumentou nos cultivos enriquecidos con microalgas da taxa de renovación do 30%. Este feito indica un bo estado fisiolóxico dos rotíferos, necesario para que sexan capaces de nadar e manterse na columna de auga sendo así vistos e capturados polas larvas de peixe. As microalgas son polo tanto un alimento moi apropiado para o enriquecemento dos rotíferos, pero debe poñerse especial atención nas condicións de cultivo coa finalidade de obter o maior contido posible de ácidos graxos poliinsaturados e converter as microalgas nunha alternativa real aos enriquecedores artificiais, que proporcionan elevados contidos de ácidos graxos esenciais pero afectando á viabilidade dos rotíferos e tamén á calidade da auga dos tanques de cultivo larvario.



Táboa 1. Composición de ácidos graxos de T-ISO e *Nannochloropsis gaditana*.

	T-ISO				<i>N. gaditana</i>			
	10%		30%		10%		30%	
	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél	% ácidos graxos	pg/cél
<b>14:0</b>	<b>20,98</b>	<b>0,64</b>	<b>22,22</b>	<b>0,44</b>	<b>7,97</b>	<b>0,11</b>	<b>7,44</b>	<b>0,06</b>
	±3,94	±0,19	±2,32	±0,06	±2,15	±0,06	±1,48	±0,02
<b>16:0</b>	<b>15,62</b>	<b>0,48</b>	<b>12,91</b>	<b>0,26</b>	<b>34,94</b>	<b>0,48</b>	<b>21,61</b>	<b>0,16</b>
	±1,63	±0,14	±1,25	±0,03	±4,64	±0,18	±0,98	±0,02
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>4,34</b>	<b>0,13</b>	<b>4,25</b>	<b>0,08</b>	<b>28,57</b>	<b>0,38</b>	<b>22,21</b>	<b>0,16</b>
	±1,02	±0,03	±0,47	±0,01	±2,02	±0,06	±1,34	±0,02
<b>18:0</b>	<b>0,95</b>	<b>0,03</b>	<b>1,78</b>	<b>0,04</b>	<b>0,93</b>	<b>0,01</b>	<b>1,98</b>	<b>0,01</b>
	±0,28	±0,01	±0,60	±0,01	±0,53	±0,01	±1,06	±0,00
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>12,97</b>	<b>0,39</b>	<b>7,45</b>	<b>0,15</b>	<b>8,44</b>	<b>0,11</b>	<b>3,26</b>	<b>0,02</b>
	±2,50	±0,03	±0,58	±0,01	±1,86	±0,00	±0,74	±0,01
<b>18:2 (ω-6)</b>	<b>3,79</b>	<b>0,12</b>	<b>4,98</b>	<b>0,10</b>	<b>1,36</b>	<b>0,02</b>	<b>3,14</b>	<b>0,02</b>
	±0,33	±0,03	±0,53	±0,01	±0,31	±0,00	±0,14	±0,00
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>5,47</b>	<b>0,17</b>	<b>6,84</b>	<b>0,14</b>	-	-	-	-
	±0,44	±0,04	±1,02	±0,02				
<b>18:4 (ω-3)</b>	<b>18,97</b>	<b>0,58</b>	<b>19,70</b>	<b>0,39</b>	-	-	-	-
	±1,35	±0,13	±2,68	±0,05				
<b>20:0</b>	<b>0,79</b>	<b>0,02</b>	<b>2,12</b>	<b>0,04</b>	-	-	-	-
	±0,59	±0,02	±1,88	±0,04				
<b>20:4 (ω-6)</b>	-	-	-	-	<b>3,89</b>	<b>0,05</b>	<b>6,07</b>	<b>0,04</b>
					±0,88	±0,01	±0,35	±0,00
<b>20:5</b>	<b>0,68</b>	<b>0,02</b>	<b>0,79</b>	<b>0,02</b>	<b>12,11</b>	<b>0,16</b>	<b>31,01</b>	<b>0,23</b>
	±0,14	±0,01	±0,06	±0,00	±1,71	±0,02	±1,35	±0,01
<b>22:5 (ω-6)</b>	<b>1,88</b>	<b>0,06</b>	<b>1,80</b>	<b>0,04</b>	-	-	-	-
	±0,27	±0,00	±0,06	±0,00				
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>9,40</b>	<b>0,28</b>	<b>11,18</b>	<b>0,22</b>	-	-	-	-
	±1,41	±0,01	±0,14	±0,02				
<b>Outros<sup>1</sup></b>	<b>4,79</b>	<b>0,15</b>	<b>5,97</b>	<b>0,12</b>	<b>1,78</b>	<b>0,02</b>	<b>3,29</b>	<b>0,03</b>
	±0,64	±0,05	±1,52	±0,04	±0,12	±0,01	±0,17	±0,01
<b>Total</b>		<b>3,04</b>		<b>1,98</b>		<b>1,35</b>		<b>0,73</b>
		±0,58		±0,18		±0,32		±0,07
<b>Saturados</b>	<b>38,54</b>	<b>1,19</b>	<b>39,10</b>	<b>0,78</b>	<b>44,42</b>	<b>0,61</b>	<b>31,59</b>	<b>0,23</b>
	±6,02	±0,35	±5,26	±0,15	±6,51	±0,24	±2,12	±0,04
<b>Monoinsaturados</b>	<b>19,86</b>	<b>0,59</b>	<b>13,68</b>	<b>0,27</b>	<b>37,27</b>	<b>0,49</b>	<b>26,18</b>	<b>0,19</b>
	±3,35	±0,07	±0,89	±0,02	±3,85	±0,06	±0,60	±0,02
<b>Saturados+ Monoinsaturados</b>	<b>58,40</b>	<b>1,78</b>	<b>52,78</b>	<b>1,05</b>	<b>81,70</b>	<b>1,11</b>	<b>57,77</b>	<b>0,42</b>
	2,82	±0,38	±4,43	±0,15	±3,07	±0,31	±1,85	±0,05
<b>Poliinsaturados</b>	<b>41,60</b>	<b>1,26</b>	<b>47,22</b>	<b>0,90</b>	<b>18,31</b>	<b>0,24</b>	<b>42,23</b>	<b>0,31</b>
	±2,82	±0,22	±4,43	±0,09	±3,07	±0,03	±1,85	±0,02
<b>ω-3</b>	<b>34,52</b>	<b>1,05</b>	<b>38,50</b>	<b>0,76</b>	<b>12,19</b>	<b>0,16</b>	<b>31,23</b>	<b>0,23</b>
	±2,42	±0,18	±3,80	±0,08	±1,74	±0,02	±1,36	±0,02
<b>ω-6</b>	<b>6,54</b>	<b>0,20</b>	<b>6,35</b>	<b>0,13</b>	<b>6,06</b>	<b>0,24</b>	<b>10,89</b>	<b>0,31</b>
	±0,43	±0,04	±0,60	±0,02	±1,34	±0,03	±0,49	±0,02
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>5,28</b>		<b>6,06</b>		<b>2,04</b>		<b>2,87</b>	
	±0,11		±0,15		±0,17		±0,04	
<b>EPA : ARA</b>	<b>4,24</b>		<b>5,43</b>		<b>3,15</b>		<b>5,12</b>	
	±0,37		±0,42		±0,29		±0,08	
<b>DHA : EPA</b>	<b>14,13</b>		<b>14,26</b>		-		-	
	±3,26		±0,98					

<sup>1</sup>: inclúe 12:0 (en *N. gaditana*), 16:2ω-6, 16:2ω-4, 18:1ω-7, 18:3ω-6, 20:0, 20:1ω-9, 20:2ω-6 (en T-ISO) e 20:3ω-6.

**Táboa 2.** Composición de ácidos graxos de *Brachionus plicatilis* enriquecido con *Nannochloropsis gaditana*.

	Taxa de renovación							
	10%				30%			
	2 h		24 h		2 h		24 h	
% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	
<b>14:0</b>	<b>5,91</b>	<b>1,08</b>	<b>6,43</b>	<b>2,43</b>	<b>8,27</b>	<b>1,30</b>	<b>6,37</b>	<b>1,22</b>
	±0,84	±0,51	±0,96	±0,78	±1,93	±0,35	±0,07	±0,06
<b>16:0</b>	<b>26,67</b>	<b>4,73</b>	<b>22,40</b>	<b>8,35</b>	<b>27,59</b>	<b>4,41</b>	<b>19,53</b>	<b>3,76</b>
	±0,20	±1,68	±1,02	±1,67	±4,93	±1,36	±2,17	±0,63
<b>16:1(ω-7)</b>	<b>11,97</b>	<b>0,97</b>	<b>23,19</b>	<b>8,71</b>	<b>10,61</b>	<b>1,73</b>	<b>13,13</b>	<b>2,52</b>
	±2,62	±0,39	±4,72	±2,78	±0,23	±0,65	±0,57	±0,03
<b>18:0</b>	<b>5,33</b>	<b>0,85</b>	<b>2,85</b>	<b>1,06</b>	<b>3,88</b>	<b>0,64</b>	<b>4,33</b>	<b>0,83</b>
	±2,34	±0,05	±0,26	±0,20	±0,67	±0,31	±0,25	±0,00
<b>18:1(ω-9)</b>	<b>12,76</b>	<b>2,28</b>	<b>10,14</b>	<b>3,74</b>	<b>10,87</b>	<b>1,77</b>	<b>7,89</b>	<b>1,52</b>
	±1,20	±0,87	±0,88	±0,38	±0,50	±0,65	±0,67	±0,21
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>4,43</b>	<b>0,79</b>	<b>1,99</b>	<b>0,74</b>	<b>4,21</b>	<b>0,73</b>	<b>3,03</b>	<b>0,58</b>
	±0,38	±0,31	±0,10	±0,13	±1,08	±0,47	±0,43	±0,05
<b>18:4 (ω-3)</b>	<b>1,79</b>	<b>0,33</b>	<b>0,72</b>	<b>0,27</b>	<b>1,88</b>	<b>0,31</b>	<b>1,15</b>	<b>0,22</b>
	±0,18	±0,14	±0,12	±0,08	±0,24	±0,15	±0,18	±0,02
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>2,56</b>	<b>0,45</b>	<b>3,94</b>	<b>1,44</b>	<b>2,59</b>	<b>0,44</b>	<b>4,64</b>	<b>0,89</b>
	±0,22	±0,13	±0,52	±0,09	±0,61	±0,26	±0,61	±0,07
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>7,93</b>	<b>1,40</b>	<b>12,04</b>	<b>4,44</b>	<b>10,04</b>	<b>1,71</b>	<b>19,06</b>	<b>3,65</b>
	±0,55	±0,49	±0,89	±0,39	±2,39	±1,03	±2,37	±0,25
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>1,00</b>	<b>0,17</b>	<b>0,49</b>	<b>0,18</b>	<b>1,07</b>	<b>0,17</b>	<b>0,68</b>	<b>0,13</b>
	±0,28	±0,03	±0,09	±0,04	±0,36	±0,14	±0,20	±0,03
<b>Poliinsaturados</b>	<b>24,62</b>	<b>4,36</b>	<b>24,55</b>	<b>9,07</b>	<b>26,49</b>	<b>4,51</b>	<b>35,50</b>	<b>6,81</b>
	±0,36	±1,52	±1,22	±1,02	±6,10	±2,71	±2,23	±0,04
<b>Saturados</b>	<b>39,67</b>	<b>6,95</b>	<b>33,05</b>	<b>12,37</b>	<b>41,73</b>	<b>6,66</b>	<b>31,84</b>	<b>6,12</b>
	±2,69	±2,24	±2,27	±2,91	±6,55	±1,97	±2,09	±0,75
<b>Monoinsaturados</b>	<b>35,70</b>	<b>6,45</b>	<b>42,41</b>	<b>15,73</b>	<b>31,78</b>	<b>5,21</b>	<b>32,66</b>	<b>6,27</b>
	±3,03	±2,65	±1,19	±2,26	±0,53	±2,10	±0,14	±0,38
<b>Saturados+ Monoinsaturados</b>	<b>75,38</b>	<b>13,40</b>	<b>75,45</b>	<b>28,10</b>	<b>73,51</b>	<b>11,88</b>	<b>64,50</b>	<b>12,40</b>
	±0,36	±4,87	±1,22	±5,14	±6,10	±3,97	±2,23	±1,13
<b>Total</b>		<b>17,76</b>		<b>37,17</b>		<b>16,39</b>		<b>19,20</b>
		±6,39		±6,16		±6,52		±1,08
<b>ω-3</b>	<b>15,15</b>	<b>2,68</b>	<b>15,23</b>	<b>5,63</b>	<b>17,20</b>	<b>2,93</b>	<b>23,91</b>	<b>4,58</b>
	±0,29	±0,95	±0,85	±0,62	±4,03	±1,79	±3,18	±0,35
<b>ω-6</b>	<b>9,15</b>	<b>1,53</b>	<b>8,99</b>	<b>3,02</b>	<b>8,96</b>	<b>1,42</b>	<b>11,18</b>	<b>1,99</b>
	±0,24	±0,49	±0,45	±0,35	±2,03	±0,83	±1,01	±0,33
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>1,66</b>		<b>1,69</b>		<b>1,92</b>		<b>2,16</b>	
	±0,06		±0,07		±0,04		±0,48	
<b>EPA : ARA</b>	<b>3,11</b>		<b>3,08</b>		<b>3,88</b>		<b>4,11</b>	
	±0,29		±0,25		±0,07		±0,03	
<b>DHA : EPA</b>	<b>0,13</b>		<b>0,04</b>		<b>0,10</b>		<b>0,04</b>	
	±0,03		±0,01		±0,01		±0,01	

**Táboa 3.** Composición de ácidos graxos de *Brachionus plicatilis* enriquecido con *Isochrysis* aff. *galbana* T-ISO.

	Taxa de renovación							
	10%				30%			
	2 h		24 h		2 h		24 h	
% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos graxos	ng/rot	% ácidos	ng/rot	% ácidos	ng/rot	
<b>14:0</b>	<b>9,56</b>	<b>1,39</b>	<b>13,03</b>	<b>2,56</b>	<b>10,05</b>	<b>1,17</b>	<b>14,40</b>	<b>4,38</b>
	±0,65	±0,32	±2,73	±0,50	±1,23	±0,14	±1,69	±0,75
<b>16:0</b>	<b>23,95</b>	<b>3,42</b>	<b>21,02</b>	<b>4,11</b>	<b>21,81</b>	<b>2,55</b>	<b>16,51</b>	<b>5,33</b>
	±3,40	±0,55	±4,44	±0,69	±2,45	±0,24	±1,09	±0,84
<b>16:1 (ω-7)</b>	<b>6,89</b>	<b>1,01</b>	<b>5,24</b>	<b>1,03</b>	<b>5,42</b>	<b>0,64</b>	<b>5,64</b>	<b>1,77</b>
	±0,42	±0,30	±0,45	±0,14	±1,27	±0,16	±0,47	±0,09
<b>18:0</b>	<b>6,35</b>	<b>0,93</b>	<b>5,14</b>	<b>1,01</b>	<b>5,45</b>	<b>0,64</b>	<b>3,30</b>	<b>1,09</b>
	±0,39	±0,27	±0,52	±0,08	±0,31	±0,05	±0,32	±0,19
<b>18:1 (ω-9)</b>	<b>12,60</b>	<b>1,86</b>	<b>13,07</b>	<b>2,58</b>	<b>11,55</b>	<b>1,35</b>	<b>11,85</b>	<b>3,80</b>
	±0,84	±0,58	±1,88	±0,47	±2,95	±0,34	±0,68	±0,56
<b>18:3 (ω-3)</b>	<b>6,00</b>	<b>0,89</b>	<b>5,70</b>	<b>1,12</b>	<b>6,98</b>	<b>0,82</b>	<b>7,36</b>	<b>2,47</b>
	±0,51	±0,29	±1,04	±0,24	±0,32	±0,06	±0,66	±0,07
<b>18:4 (ω-3)</b>	<b>7,15</b>	<b>1,06</b>	<b>11,14</b>	<b>2,19</b>	<b>7,65</b>	<b>0,90</b>	<b>11,61</b>	<b>3,28</b>
	±0,62	±0,35	±2,19	±0,46	±0,72	±0,10	±3,92	±1,28
<b>20:4 (ω-6)</b>	<b>1,61</b>	<b>0,24</b>	<b>0,97</b>	<b>0,19</b>	<b>1,69</b>	<b>0,20</b>	<b>1,10</b>	<b>0,42</b>
	±0,21	±0,08	±0,14	±0,04	±0,02	±0,01	±0,40	±0,10
<b>20:5 (ω-3)</b>	<b>4,99</b>	<b>0,73</b>	<b>3,01</b>	<b>0,59</b>	<b>5,32</b>	<b>0,62</b>	<b>3,48</b>	<b>1,22</b>
	±0,39	±0,20	±0,49	±0,12	±0,45	±0,06	±0,84	±0,38
<b>22:6 (ω-3)</b>	<b>2,91</b>	<b>0,42</b>	<b>5,86</b>	<b>1,15</b>	<b>3,29</b>	<b>0,38</b>	<b>4,69</b>	<b>1,45</b>
	±0,55	±0,14	±0,29	±0,12	±0,33	±0,05	±0,41	±0,23
<b>Poliinsaturados</b>	<b>30,94</b>	<b>4,56</b>	<b>34,16</b>	<b>6,74</b>	<b>33,78</b>	<b>3,96</b>	<b>38,04</b>	<b>12,15</b>
	±1,99	±1,38	±4,48	±1,11	±2,03	±0,33	±2,29	±0,24
<b>Saturados</b>	<b>40,83</b>	<b>5,90</b>	<b>40,03</b>	<b>7,84</b>	<b>39,35</b>	<b>4,60</b>	<b>35,40</b>	<b>11,21</b>
	±3,41	±1,29	±7,32	±1,13	±3,86	±0,39	±2,63	±1,84
<b>Monoinsaturados</b>	<b>28,23</b>	<b>4,15</b>	<b>25,82</b>	<b>5,10</b>	<b>26,87</b>	<b>3,15</b>	<b>26,56</b>	<b>8,69</b>
	±1,42	±1,22	±3,09	±0,85	±3,07	±0,39	±0,98	±0,49
<b>Saturados+ Monoinsaturados</b>	<b>30,94</b>	<b>4,56</b>	<b>34,16</b>	<b>6,74</b>	<b>33,78</b>	<b>3,96</b>	<b>38,04</b>	<b>12,15</b>
	±1,99	±1,38	±4,48	±1,11	±2,03	±0,33	±2,29	±0,24
<b>Total</b>		<b>14,61</b>		<b>19,67</b>		<b>11,70</b>		<b>32,05</b>
		±3,81		±1,09		±0,27		±2,10
<b>ω-3</b>	<b>21,06</b>	<b>3,10</b>	<b>25,70</b>	<b>5,07</b>	<b>23,23</b>	<b>2,72</b>	<b>27,14</b>	<b>8,42</b>
	±1,36	±0,94	±3,77	±0,88	±1,69	±0,25	±2,84	±0,60
<b>ω-6</b>	<b>9,52</b>	<b>1,32</b>	<b>8,18</b>	<b>1,53</b>	<b>10,11</b>	<b>1,12</b>	<b>10,57</b>	<b>3,46</b>
	±0,57	±0,40	±0,94	±0,24	±0,40	±0,07	±1,11	±0,27
<b>ω-3 : ω-6</b>	<b>2,21</b>		<b>3,15</b>		<b>2,30</b>		<b>2,60</b>	
	±0,02		±0,35		±0,14		±0,48	
<b>EPA : ARA</b>	<b>3,12</b>		<b>3,11</b>		<b>3,14</b>		<b>3,33</b>	
	±0,26		±0,20		±0,27		±0,85	
<b>DHA : EPA</b>	<b>0,58</b>		<b>1,97</b>		<b>0,62</b>		<b>1,39</b>	
	±0,07		±0,25		±0,02		±0,32	

**Táboa 4.** Recuperación de EPA e DHA nos rotíferos alimentados coas distintas microalgas.

	<b>Nanno 10%</b>	<b>Nanno 30%</b>	<b>T-ISO 10%</b>	<b>T-ISO 30%</b>
<b>µg de EPA ou DHA subministrados/ ml de cultivo de rotífero</b>	3,84 µg EPA	5,42 µg EPA	1,85 µg DHA	1,47 µg DHA
<b>µg de EPA ou DHA recuperado/ ml de cultivo de rotífero)</b>	0,85 µg EPA	0,84 µg EPA	0,24 µg DHA	0,34 µg DHA
<b>% recuperación</b>	22%	15,5%	13%	25%

## **Capítulo 10.**

---

**Efecto das condicións de cultivo semicontinuo sobre o contido de oligoelementos de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) e *Nannochloropsis gaditana*. Efecto da dieta sobre o contido de oligoelementos de *Brachionus plicatilis* en experimentos de enriquecemento e cultivo**



## **Introdución**

Os oligoelementos teñen múltiples funcións nos peixes, formando parte de estruturas esqueléticas, mantendo os sistemas coloidais, regulando o equilibrio ácido-base e o equilibrio osmótico e como compoñentes de hormonas, enzimas e cofactores enzimáticos (Lall, 1989; Watanabe *et al.*, 1997). A pesar do seu papel esencial no metabolismo dos peixes, non existe moita información sobre a incorporación destes micronutrintes nas larvas, nin tampouco sobre o contido mineral dos demais organismos que forman parte da cadea trófica (microalgas e rotíferos ou outros filtradores) xa que a maioría das investigacións sobre a nutrición mineral céntranse en alevíns que se alimentan con dietas artificiais, e non sobre larvas que consumen alimento vivo.

Para o estudio do efecto dos minerais na supervivencia larvaria é esencial dispoñer de alimento vivo cunha composición mineral controlada. Neste capítulo estudiáronse as modificacións producidas polo cultivo semicontinuo sobre o contido de oligoelementos nas microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO (Capítulos 2, 3 e 4), e asimesmo sobre as variacións que se produciron na concentración destes elementos nos rotíferos alimentados con ditas microalgas, tanto os que foron cultivados durante varios días (Capítulo 7) como os sometidos a un enriquecemento de 24 horas (Capítulos 5 e 6).

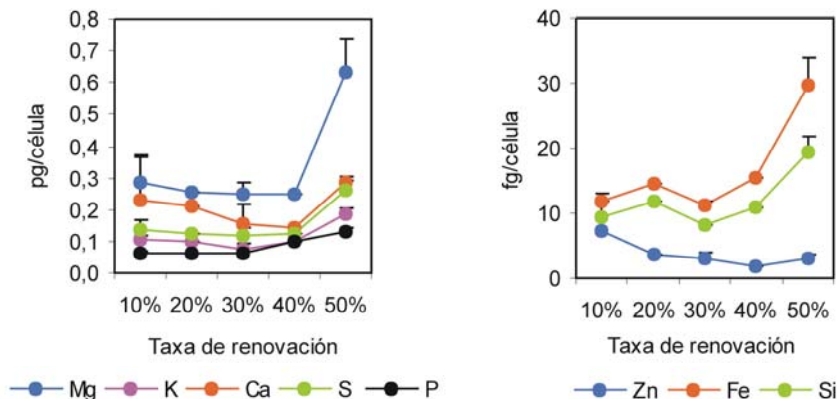
## **Resultados e discusión**

### *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO)

Os oligoelementos máis abundantes nas dúas especies de microalgas e nos rotíferos foron o magnesio, o potasio, o calcio, o xofre e o fósforo (Táboas 1 e 2). Na maioría dos casos, os contidos máximos nas microalgas alcanzáronse coas taxas de renovación máis elevadas. Nos cultivos semicontínuos, o incremento da taxa de renovación provoca un descenso do contido orgánico acompañado de variacións no volume celular, que experimenta unha evolución en forma de U con valores mínimos nas taxas de renovación intermedias (Fábregas *et al.*, 1996). En condicións de abundancia de nutrintes, as microalgas captan maiores cantidades de minerais do medio externo, e así a presión osmótica da célula aumenta, dando

lugar á absorción de auga e a un aumento do volume. Nos nosos cultivos semicontinuos obsérvase que a diminución do contido orgánico celular en *N. gaditana* e en T-ISO foi compensado cun incremento do contido mineral nas taxas de renovación máis elevadas.

En *Nannochloropsis gaditana* os contidos de Mg, K, Ca e S mantivéronse practicamente constantes, ou ben descenderon lixeiramente, entre as taxas de renovación do 10% e 40% e incrementáronse na taxa de renovación do 50%. No caso do Mg e o S o contido celular chegou a duplicarse ao aplicar a máxima taxa de renovación ao cultivo. O contido de fósforo aumentou a partir da taxa de renovación do 40% (Figura 1; Táboa 1). O Fe e o Si tamén se atoparon en cantidades abundantes en *N. gaditana* e o seu contido aumentou a partir da taxa de renovación do 30%, que marca o inicio da saturación por nutrientes, chegando a duplicarse respecto dos valores obtidos nos cultivos limitados por nutrientes. Polo contrario, o contido de zinc descendeu coa taxa de renovación (Figura 2; Táboa 1).

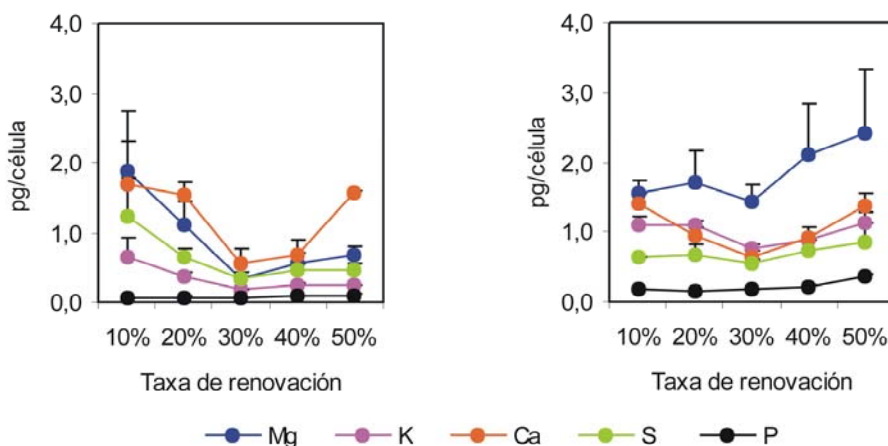


Figuras 1 e 2. Contido de varios oligoelementos en *Nannochloropsis gaditana* cultivada en sistema semicontinuo con distintas taxas de renovación.

En cultivos de *Nannochloropsis* sp. realizados en quimiostato, polo contrario, non se observou unha evolución determinada da concentración de moitos minerais en función da taxa de dilución. Unicamente o zinc, o cobre e o níquel mostraron unha tendencia clara a descender a medida que aumentaba a



taxa de dilución (Reboloso Fuentes *et al.*, 2001). Estes autores utilizaron nutrientes f/2 e taxas de dilución entre o 7% e o 21%, e posiblemente o reducido rango de variabilidade das condicións de cultivo impediu que se produciran variacións importantes no contido mineral da microalga.



**Figura 3.** Contido dalgúns oligoelementos de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) cultivada en sistema semicontínuo con distintas taxas de renovación e unha intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

**Figura 4.** Contido dalgúns oligoelementos de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) cultivada en sistema semicontínuo con distintas taxas de renovación e unha intensidade luminosa de 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

En *Isochrysis aff. galbana* T-ISO a evolución coa taxa de renovación do contido dos principais oligoelementos foi similar nas dúas condicións de intensidade luminosa probadas (Capítulos 2 e 3), pero o rango de variación foi diferente en función da iluminación aplicada aos cultivos. O potasio, o calcio e o xofre descenderon en contido celular ata a taxa de renovación do 30% e aumentaron novamente nas taxas de renovación superiores. Nos cultivos sometidos a 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  os contidos destes minerais recuperaron os valores que presentaban na taxa de renovación do 10%, mentres que nos cultivos con 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  unicamente o calcio voltou ao nivel da taxa de renovación do 10%, e os contidos de xofre e o potasio estabilizáronse en valores menores. A evolución do magnesio foi diferente nos dous cultivos de T-ISO, e mentres que nos sometidos a 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  se incrementou coa taxa

de renovación case de forma lineal, nos cultivos iluminados con 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  o Mg experimentou a mesma evolución que o S e o K. O fósforo incrementouse coa taxa de renovación nas dúas condicións de iluminación, pero o contido foi maior nos cultivos con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , chegando a triplicar nalgunha das taxas de renovación o contido obtido nos cultivos sometidos a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (Figuras 3 e 4; Táboa 1). En cultivos de *Porphyridium cruentum* en quimiostato observouse que o contido de cinzas e en consecuencia de minerais tamén aumentaba en resposta ao incremento da taxa de dilución do 11% ao 100%, e que algúns dos elementos experimentaban unha evolución en forma de U igual que nos cultivos de T-ISO. Porén, o efecto da intensidade luminosa sobre o contido mineral de *Porphyridium* non está claro (Reboloso Fuentes *et al.*, 2000).

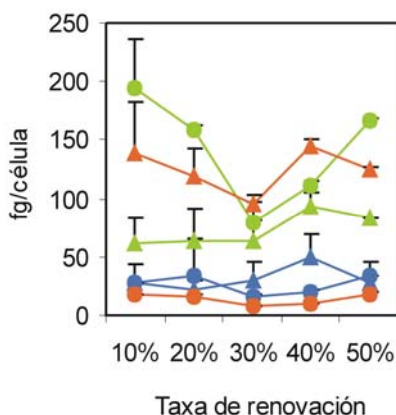


Figura 5. Contido de zinc (verde), ferro (azul) e silicio (laranxa) de T-ISO cultivada cunha intensidade luminosa de 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (-▲-) ou 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  (-●-).

O zinc tamén se atopou en cantidades relativamente elevadas en T-ISO. O contido de Zn foi maior nas células iluminadas con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  e nestes cultivos diminuíu ata a taxa de renovación do 30% e incrementouse nas taxas de renovación superiores, mentres que nos cultivos sometidos a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  mantívose estable ata a taxa de renovación do 30%, aumentando a continuación. O ferro experimentou unha evolución semellante á do zinc aínda que o contido celular foi menor. A única diferenza foi que o máximo contido nos cultivos con 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  se registrou na taxa de renovación do 40%. O contido de silicio foi ata 10 veces maior nas células cultivadas con 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ .

quanta/m<sup>2</sup>/s. Nos dous cultivos o Si descendeu ata a taxa de renovación do 30% e incrementouse a continuación, alcanzando o seu máximo na taxa de renovación do 40% nos cultivos sometidos a 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s e na taxa de renovación de 50% nos sometidos a 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s (Figura 5; Táboa 1). Estas diferencias tan elevadas entre as dúas condicións de iluminación non se observaron en ningún outro dos elementos analizados e non se pode descartar que sexan debidas a un fallo do método analítico.

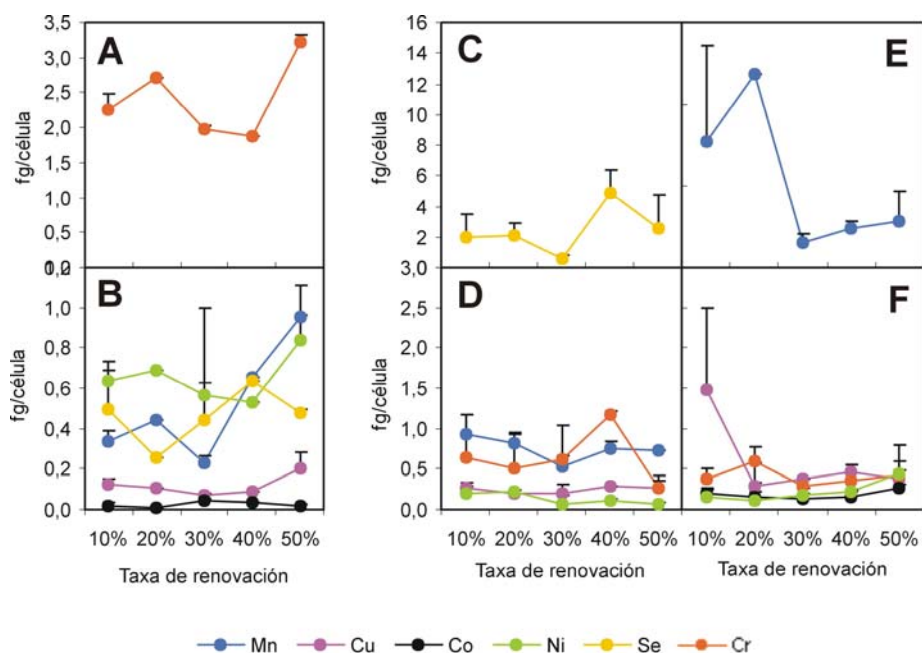


Figura 6. Contido dalgúns oligoelementos de *Nannochloropsis gaditana* (A, B), e T-ISO cultivada con 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s (C,D) ou 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s (E, F).

Os demais oligoelementos analizados (manganeso, cobre, cromo, cobalto, níquel e selenio) están presentes en moi pequenas cantidades, case sempre inferiores a 1 fg/célula, coas excepcións do selenio en T-ISO cultivada con 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s, o manganeso en T-ISO cultivada con 162  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s e o cromo en *N. gaditana*. Na maioría dos casos o contido destes oligoelementos descendeu nas taxas de renovación intermedias e incrementouse nas taxas de renovación do 40% e 50%. As excepcións foron o níquel en T-ISO sometida a 97  $\mu$ moles quanta/m<sup>2</sup>/s, que descendeu ao aumentar a taxa de

renovación, e o cromo en T-ISO cultivada con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$ , que alcanzaron os valores máximos na taxa de renovación do 20%. Nestes mesmos cultivos o contido de cobre na taxa de renovación do 10% presentou un valor anormalmente elevado. Asimesmo, os datos do contido de selenio nos cultivos de T-ISO sometida a 97  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  e os de manganeso en T-ISO cultivada con 162  $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$  non mostran ningunha tendencia clara, ademais de presentar desviacións moi altas nalgúns casos (Figura 6; Táboa 1).

### *Brachionus plicatilis*

Os contidos máis elevados de minerais observáronse nos rotíferos enriquecidos durante 24 h con T-ISO, seguidos dos enriquecidos con *N. gaditana*. Os rotíferos cultivados durante 8 días con T-ISO presentaron un contido mineral notablemente menor. Porén, houbo algunhas excepcións, xa que os contidos de silicio e selenio foron maiores nos rotíferos cultivados (Táboa 2). Os datos de selenio obtidos nos rotíferos sometidos a enriquecemento e os de cobalto dos rotíferos cultivados durante 8 días resultaron inconsistentes e non se tiveron en conta.

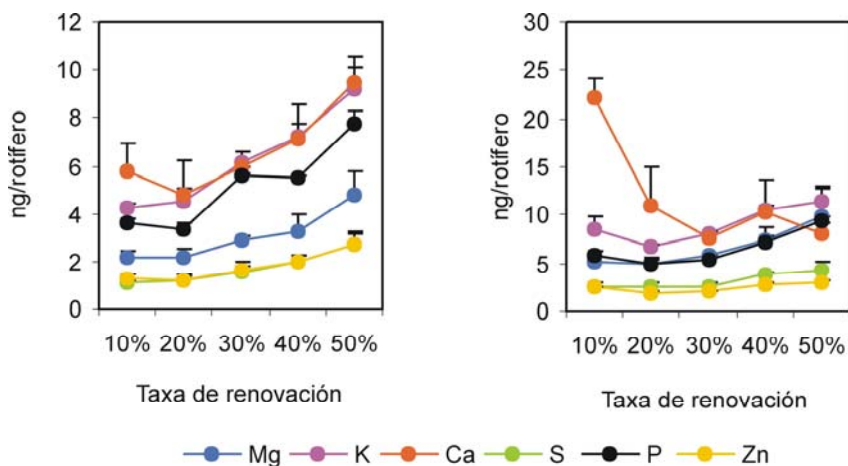


Figura 7. Contido dos principais oligoelementos dos rotíferos enriquecidos durante 24 h con *Nannochloropsis gaditana* (esquerda) e *Isochrysis aff. galbana* T-ISO (dereita).

Igual que aconteceu con outros nutrientes (proteínas, lípidos e glúcidos), o contido mineral dos rotíferos sometidos a un enriquecemento de 24 h con *N. gaditana* tamén se incrementou coa taxa de renovación á que foron cultivadas as microalgas coas que foron alimentados, independentemente da evolución do contido mineral na microalga, que descendeu nas taxas de renovación intermedias. Houbo algunha excepción, pois non todos os elementos analizados se incrementaron ata a taxa de renovación do 50% e algúns seguiron tendencias diferentes. Nos rotíferos enriquecidos con T-ISO a maioría dos minerais experimentan a mesma evolución que os enriquecidos con *N. gaditana*, incrementándose coa taxa de renovación, coa excepción do calcio (Figura 7; Táboa 2).

Nos rotíferos enriquecidos con *Nannochloropsis* os contidos da maioría dos elementos minoritarios analizados incrementáronse de forma case lineal coa taxa de renovación, coas excepcións do cobre, que alcanzou o seu valor máximo na taxa de renovación do 40%, o cobalto, que se estabilizou a partir da taxa de renovación do 30%, e o ferro, que baixou nas taxas de renovación intermedias. Nos rotíferos enriquecidos con T-ISO a maioría dos oligoelementos tamén alcanzaron os seus valores máximos na taxa de renovación do 50%. Os contidos máximos de cobalto e silicio rexistráronse na taxa de renovación do 40% e o de manganeso na do 30%, mentres que o de calcio descendeu ao aumentar a taxa de renovación e o de níquel non variou moito entre as distintas taxas de renovación. O contido da maioría dos oligoelementos minoritarios analizados foi máis elevado nos rotíferos enriquecidos con T-ISO que nos enriquecidos con *N. gaditana* (Figura 8; Táboa 2).

Nos rotíferos cultivados durante 8 días con T-ISO o contido de minerais, a diferenza do observado nos experimentos de enriquecemento, tende a descender ao aumentar a taxa de renovación. Os únicos oligoelementos que non seguiron esta evolución foron o potasio, o fósforo, o xofre e o selenio, que se incrementaron ata as taxas de renovación do 40% ou 50% (Figuras 9 e 10; Táboa 2). O peso seco dos rotíferos da taxa de renovación do 20% foi probablemente sobreestimado, e isto provoca á súa vez sobreestimacións nos datos calculados a partir do peso seco. Esta podería ser a explicación para os contidos demasiado elevados da maioría dos oligoelementos nesta taxa de renovación. Porén, os

valores anómalos de calcio, zinc, magnesio, selenio e manganeso resultan demasiado grandes para ser explicados desta maneira, e probablemente foron debidos a un fallo do método analítico.

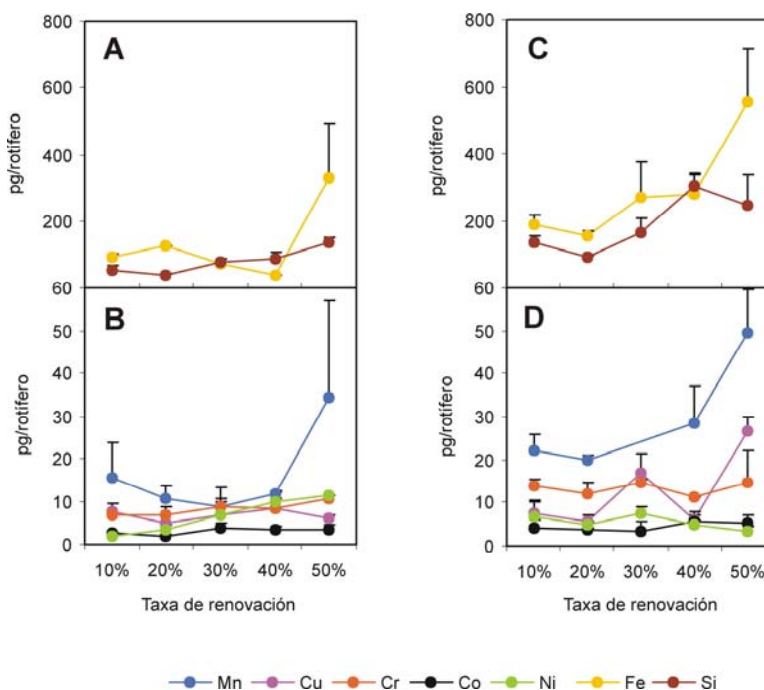
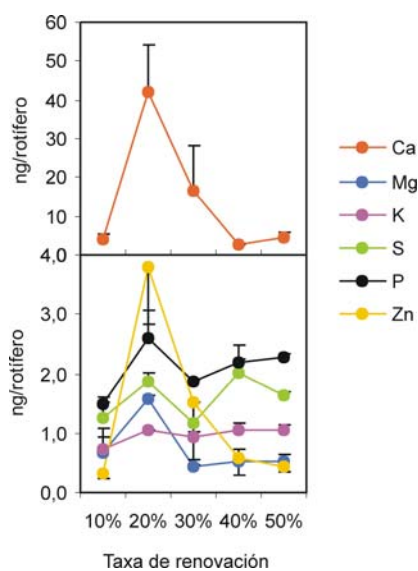


Figura 8. Contido dos oligoelementos minoritarios nos rotíferos enriquecidos durante 24 h con *N. gaditana* (A,B) e T-ISO (C,D).

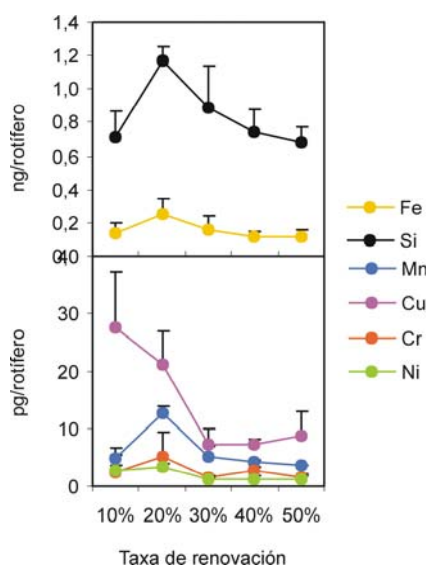
Non existen demasiada información sobre a composición mineral dos rotíferos nin sobre o efecto da dieta sobre esta, pero algúns datos suxiren que alimentar rotíferos con *Nannochloropsis* ("*Chlorella* mariña") incrementa lixeiramente o seu contido de sodio, potasio, zinc, cobre e manganeso (Watanabe *et al.*, 1983) e facelo con T-ISO (*Isochrysis galbana* "cepa de Tahiti") produce incrementos do contido de manganeso e cobalto e un descenso do contido de magnesio (Lie *et al.*, 1997). Aínda que tradicionalmente non se lle prestou demasiada atención á nutrición mineral dos peixes e mesmo algúns autores non a consideran un factor determinante do valor nutritivo da dieta (Watanabe *et al.*, 1983), Robin (1989) conseguiu incrementar o crecemento de rodaballos enriquecendo os rotíferos cun suplemento de minerais. A forma na que se subministra un determinado oligoelemento pode ser crucial na súa acumulación a

através da cadea trófica. O cobalto en forma de cobalamina é retido con moita máis eficacia que o  $\text{CoCl}_2$  na cadea formada polas microalgas *Dunaliella* e *Chaetoceros*, o copépodo *Centropages* e o teleósteo *Serranus scriba* (Nolan *et al.*, 1992). Ter en conta a biodisponibilidade dos elementos traza á hora de formular os medios nutritivos pode ser importante para mellorar a composición bioquímica dos organismos que forman parte da cadea nutritiva en acuicultura.

Para elevar o contido mineral dos rotíferos o enriquecemento con *Nannochloropsis gaditana* ou T-ISO é unha técnica máis vantaxosa que o cultivo dos rotíferos con T-ISO, excepto para incrementar o contido de silicio e selenio. Igual que para conseguir contidos elevados doutros nutrientes esenciais para a alimentación de larvas como proteínas e ácidos graxos  $\omega$ -3, as microalgas cultivadas con taxas de renovación elevadas resultaron ser as máis apropiadas para enriquecer os rotíferos con oligoelementos.



**Figura 9.** Contido dos principais minerais nos rotíferos cultivados durante 8 días con T-ISO.



**Figura 10.** Contido dos principais oligoelementos nos rotíferos cultivados durante 8 días con T-ISO.

**Táboa 1.** Composición mineral de *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis aff. galbana* cultivadas en sistema semicontinuo con cinco taxas de renovación e dúas intensidades luminosas distintas (no caso de T-ISO).

		<i>N. gaditana</i> 162 $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$					T-ISO 97 $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$					T-ISO 162 $\mu\text{moles quanta/m}^2/\text{s}$					
		10%	20%	30%	40%	50%	10%	20%	30%	40%	50%	10%	20%	30%	40%	50%	
pg/cél	<b>Mg</b>	<b>0,29</b> ±0,08	<b>0,25</b> ±0,00	<b>0,25</b> ±0,04	<b>0,25</b> ±0,00	<b>0,63</b> ±0,10	<b>1,89</b> ±0,85	<b>1,10</b> ±0,35	<b>0,35</b> ±0,00	<b>0,55</b> ±0,16	<b>0,68</b> ±0,11	<b>1,55</b> ±0,02	<b>1,70</b> ±0,45	<b>1,44</b> ±0,25	<b>2,11</b> ±0,72	<b>2,40</b> ±0,94	
	<b>K</b>	<b>0,11</b> ±0,01	<b>0,10</b> ±0,00	<b>0,08</b> ±0,01	<b>0,10</b> ±0,00	<b>0,18</b> ±0,02	<b>0,66</b> ±0,26	<b>0,36</b> ±0,07	<b>0,19</b> ±0,00	<b>0,25</b> ±0,04	<b>0,24</b> ±0,01	<b>1,09</b> ±0,14	<b>1,10</b> ±0,06	<b>0,76</b> ±0,07	<b>0,88</b> ±0,10	<b>1,14</b> ±0,14	
	<b>Ca</b>	<b>0,23</b> ±0,14	<b>0,21</b> ±0,00	<b>0,15</b> ±0,06	<b>0,14</b> ±0,00	<b>0,29</b> ±0,00	<b>1,71</b> ±0,61	<b>1,54</b> ±0,20	<b>0,57</b> ±0,22	<b>0,67</b> ±0,23	<b>1,56</b> ±0,04	<b>1,41</b> ±0,34	<b>0,95</b> ±0,11	<b>0,65</b> ±0,08	<b>0,90</b> ±0,15	<b>1,39</b> ±0,16	
	<b>S</b>	<b>0,14</b> ±0,03	<b>0,12</b> ±0,00	<b>0,12</b> ±0,02	<b>0,12</b> ±0,00	<b>0,26</b> ±0,04	<b>1,24</b> ±0,53	<b>0,64</b> ±0,14	<b>0,35</b> ±0,08	<b>0,45</b> ±0,12	<b>0,48</b> ±0,08	<b>0,63</b> ±0,01	<b>0,67</b> ±0,16	<b>0,56</b> ±0,05	<b>0,72</b> ±0,16	<b>0,84</b> ±0,28	
	<b>P</b>	<b>0,06</b> ±0,01	<b>0,06</b> ±0,00	<b>0,06</b> ±0,01	<b>0,10</b> ±0,00	<b>0,13</b> ±0,01	<b>0,06</b> ±0,01	<b>0,07</b> ±0,00	<b>0,06</b> ±0,00	<b>0,09</b> ±0,00	<b>0,10</b> ±0,01	<b>0,17</b> ±0,01	<b>0,16</b> ±0,01	<b>0,17</b> ±0,01	<b>0,23</b> ±0,00	<b>0,36</b> ±0,03	
	<b>Zn</b>	<b>7,40</b> ±2,44	<b>3,50</b> ±0,00	<b>2,92</b> ±1,02	<b>1,68</b> ±0,00	<b>2,95</b> ±0,77	<b>61,48</b> ±20,90	<b>64,48</b> ±26,15	<b>63,18</b> ±33,38	<b>92,32</b> ±13,52	<b>83,09</b> ±0,03	<b>194,21</b> ±41,37	<b>158,81</b> ±3,82	<b>79,36</b> ±2,77	<b>110,43</b> ±5,51	<b>166,48</b> ±1,87	
	fg/cél	<b>Fe</b>	<b>11,72</b> ±1,32	<b>14,54</b> ±0,00	<b>11,17</b> ±0,63	<b>15,57</b> ±0,00	<b>29,79</b> ±4,03	<b>26,81</b> ±16,27	<b>22,16</b> ±7,93	<b>29,11</b> ±16,49	<b>49,55</b> ±19,18	<b>28,75</b> ±5,51	<b>26,86</b> ±1,24	<b>34,37</b> ±30,78	<b>16,56</b> ±1,49	<b>20,19</b> ±1,96	<b>34,38</b> ±10,80
		<b>Si</b>	<b>9,34</b> ±2,38	<b>11,81</b> ±0,00	<b>8,03</b> ±0,20	<b>10,93</b> ±0,00	<b>19,33</b> ±2,38	<b>139,05</b> ±43,12	<b>118,53</b> ±23,58	<b>95,78</b> ±7,17	<b>145,31</b> ±6,17	<b>125,88</b> ±0,30	<b>17,65</b> ±0,55	<b>16,24</b> ±1,70	<b>8,03</b> ±0,45	<b>9,85</b> ±0,74	<b>18,04</b> ±1,43
		<b>Mn</b>	<b>0,34</b> ±0,05	<b>0,44</b> ±0,00	<b>0,23</b> ±0,03	<b>0,65</b> ±0,00	<b>0,95</b> ±0,16	<b>0,93</b> ±0,23	<b>0,82</b> ±0,13	<b>0,54</b> ±0,13	<b>0,75</b> ±0,09	<b>0,72</b> ±0,00	<b>7,70</b> ±5,91	<b>11,90</b> ±0,00	<b>1,55</b> ±0,46	<b>2,44</b> ±0,40	<b>2,81</b> ±1,90
		<b>Cu</b>	<b>0,12</b> ±0,03	<b>0,11</b> ±0,00	<b>0,07</b> ±0,01	<b>0,09</b> ±0,00	<b>0,21</b> ±0,07	<b>0,26</b> ±0,04	<b>0,19</b> ±0,01	<b>0,21</b> ±0,11	<b>0,28</b> ±0,00	<b>0,27</b> ±0,15	<b>1,47</b> ±1,03	<b>0,29</b> ±0,28	<b>0,37</b> ±0,01	<b>0,46</b> ±0,10	<b>0,39</b> ±0,41
<b>Cr</b>		<b>2,26</b> ±0,22	<b>2,71</b> ±0,00	<b>1,99</b> ±0,03	<b>1,87</b> ±0,00	<b>3,21</b> ±0,11	<b>0,65</b> ±0,51	<b>0,52</b> ±0,41	<b>0,62</b> ±0,42	<b>1,17</b> ±0,05	<b>0,27</b> ±0,09	<b>0,37</b> ±0,15	<b>0,60</b> ±0,18	<b>0,28</b> ±0,09	<b>0,36</b> ±0,19	<b>0,43</b> ±0,06	
<b>Co</b>		<b>0,02</b> ±0,02	<b>0,01</b> ±0,00	<b>0,04</b> ±0,01	<b>0,04</b> ±0,00	<b>0,02</b> ±0,01	-	-	-	-	-	<b>0,19</b> ±0,06	<b>0,16</b> ±0,16	<b>0,13</b> ±0,07	<b>0,15</b> ±0,08	<b>0,27</b> ±0,04	
<b>Ni</b>		<b>0,64</b> ±0,05	<b>0,68</b> ±0,00	<b>0,56</b> ±0,07	<b>0,53</b> ±0,00	<b>0,84</b> ±0,12	<b>0,21</b> ±0,12	<b>0,22</b> ±0,02	<b>0,07</b> ±0,10	<b>0,12</b> ±0,02	<b>0,07</b> ±0,02	<b>0,16</b> ±0,10	<b>0,12</b> ±0,10	<b>0,17</b> ±0,09	<b>0,21</b> ±0,03	<b>0,45</b> ±0,15	
<b>Se</b>		<b>0,49</b> ±0,24	<b>0,26</b> ±0,00	<b>0,44</b> ±0,56	<b>0,64</b> ±0,00	<b>0,48</b> ±0,02	<b>1,92</b> ±1,61	<b>2,08</b> ±0,80	<b>0,60</b> ±0,24	<b>4,83</b> ±1,50	<b>2,60</b> ±2,09	-	-	-	-	-	
<b>Total (pg/cél)</b>		<b>0,85</b>	<b>0,78</b>	<b>0,68</b>	<b>0,74</b>	<b>1,55</b>	<b>5,79</b>	<b>3,91</b>	<b>1,71</b>	<b>2,31</b>	<b>3,30</b>	<b>5,10</b>	<b>4,80</b>	<b>3,67</b>	<b>4,98</b>	<b>6,35</b>	



**Táboa 2.** Composición mineral dos rotíferos enriquecidos durante 24 horas con *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis aff. galbana* T-ISO e dos rotíferos cultivados durante 8 días con *Isochrysis aff. galbana* T-ISO.

		Rotíferos enriquecidos con <i>N. gaditana</i>					Rotíferos enriquecidos con T-ISO					Rotíferos cultivados con T-ISO				
		10%	20%	30%	40%	50%	10%	20%	30%	40%	50%	10%	20%	30%	40%	50%
ng/rot	<b>Mg</b>	<b>2,15</b> ±0,03	<b>2,16</b> ±0,34	<b>2,86</b> ±0,24	<b>3,25</b> ±0,74	<b>4,78</b> ±1,01	<b>5,10</b> ±1,20	<b>4,85</b> ±0,41	<b>5,84</b> ±0,08	<b>7,35</b> ±1,44	<b>9,76</b> ±2,92	<b>0,67</b> ±0,40	<b>1,56</b> ±0,06	<b>0,44</b> ±0,10	<b>0,53</b> ±0,19	<b>0,54</b> ±0,10
	<b>K</b>	<b>4,24</b> ±0,15	<b>4,49</b> ±0,57	<b>6,13</b> ±0,43	<b>7,22</b> ±0,55	<b>9,22</b> ±0,86	<b>8,49</b> ±1,31	<b>6,78</b> ±0,24	<b>8,03</b> ±0,33	<b>10,63</b> ±0,32	<b>11,4</b> ±1,69	<b>0,72</b> ±0,22	<b>1,05</b> ±0,01	<b>0,92</b> ±0,10	<b>1,05</b> ±0,12	<b>1,06</b> ±0,09
	<b>Ca</b>	<b>5,78</b> ±1,15	<b>4,81</b> ±1,45	<b>5,93</b> ±0,00	<b>7,13</b> ±1,47	<b>9,51</b> ±1,09	<b>22,21</b> ±2,07	<b>10,98</b> ±4,12	<b>7,61</b> ±0,59	<b>10,38</b> ±3,17	<b>8,16</b> ±1,12	<b>4,20</b> ±0,95	<b>42,13</b> ±12,07	<b>16,70</b> ±11,36	<b>2,67</b> ±0,10	<b>4,34</b> ±1,56
	<b>S</b>	<b>1,04</b> ±0,17	<b>1,19</b> ±0,17	<b>1,55</b> ±0,24	<b>2,01</b> ±0,26	<b>2,70</b> ±0,56	<b>2,52</b> ±0,36	<b>2,49</b> ±0,51	<b>2,51</b> ±0,32	<b>3,87</b> ±0,24	<b>4,23</b> ±0,81	<b>1,24</b> ±0,27	<b>1,88</b> ±0,14	<b>1,18</b> ±0,35	<b>2,01</b> ±0,46	<b>1,63</b> ±0,07
	<b>P</b>	<b>3,60</b> ±0,20	<b>3,30</b> ±0,26	<b>5,57</b> ±0,13	<b>5,48</b> ±0,15	<b>7,77</b> ±0,55	<b>5,92</b> ±0,31	<b>4,93</b> ±0,60	<b>5,41</b> ±0,17	<b>7,27</b> ±0,64	<b>9,37</b> ±0,46	<b>1,49</b> ±0,13	<b>2,61</b> ±0,45	<b>1,86</b> ±0,02	<b>2,20</b> ±0,04	<b>2,27</b> ±0,08
	<b>Zn</b>	<b>1,30</b> ±0,18	<b>1,18</b> ±0,23	<b>1,65</b> ±0,32	<b>1,98</b> ±0,30	<b>2,68</b> ±0,45	<b>2,39</b> ±0,08	<b>1,84</b> ±0,09	<b>1,93</b> ±0,14	<b>2,67</b> ±0,33	<b>2,81</b> ±0,30	<b>0,33</b> ±0,09	<b>3,80</b> ±0,97	<b>1,53</b> ±1,06	<b>0,58</b> ±0,28	<b>0,43</b> ±0,08
pg/rot	<b>Fe</b>	<b>92,78</b> ±8,80	<b>124,72</b> ±0,58	<b>73,21</b> ±0,00	<b>40,13</b> ±0,00	<b>327,69</b> ±164,70	<b>187,73</b> ±28,86	<b>153,67</b> ±15,93	<b>271,96</b> ±103,00	<b>278,50</b> ±61,28	<b>552,85</b> ±158,11	<b>0,13</b> ±0,06	<b>0,25</b> ±0,10	<b>0,16</b> ±0,08	<b>0,12</b> ±0,03	<b>0,11</b> ±0,04
	<b>Si</b>	<b>53,61</b> ±16,13	<b>41,09</b> ±4,66	<b>75,35</b> ±12,20	<b>85,95</b> ±19,56	<b>137,40</b> ±10,78	<b>135,47</b> ±18,03	<b>93,70</b> ±4,55	<b>163,07</b> ±44,94	<b>303,73</b> ±34,25	<b>247,58</b> ±88,91	<b>0,71</b> ±0,16	<b>1,17</b> ±0,08	<b>0,89</b> ±0,24	<b>0,74</b> ±0,14	<b>0,68</b> ±0,09
	<b>Mn</b>	<b>15,63</b> ±8,18	<b>10,65</b> ±3,06	<b>8,69</b> ±0,98	<b>11,74</b> ±0,60	<b>34,46</b> ±22,36	<b>22,11</b> ±3,67	<b>19,95</b> ±1,16	<b>94,18</b> ±5,63	<b>28,65</b> ±8,30	<b>49,37</b> ±10,32	<b>4,89</b> ±1,73	<b>12,70</b> ±1,28	<b>5,08</b> ±1,98	<b>4,18</b> ±0,33	<b>3,51</b> ±0,24
	<b>Cu</b>	<b>7,49</b> ±2,01	<b>7,14</b> ±1,14	<b>6,86</b> ±3,61	<b>8,48</b> ±2,21	<b>6,00</b> ±0,90	<b>7,43</b> ±3,08	<b>5,44</b> ±1,84	<b>16,73</b> ±4,57	<b>5,99</b> ±0,96	<b>26,78</b> ±3,28	<b>27,56</b> ±9,80	<b>21,18</b> ±5,81	<b>7,42</b> ±2,45	<b>7,21</b> ±1,12	<b>8,67</b> ±4,27
	<b>Cr</b>	<b>6,78</b> ±1,05	<b>6,81</b> ±2,59	<b>8,55</b> ±4,21	<b>8,26</b> ±2,20	<b>10,72</b> ±2,14	<b>13,97</b> ±1,54	<b>12,10</b> ±2,52	<b>14,72</b> ±0,52	<b>11,16</b> ±0,22	<b>14,77</b> ±7,25	<b>2,49</b> ±1,18	<b>5,12</b> ±4,15	<b>1,53</b> ±0,15	<b>2,83</b> ±0,44	<b>1,62</b> ±0,09
	<b>Co</b>	<b>2,50</b> ±0,30	<b>2,02</b> ±0,43	<b>3,79</b> ±1,14	<b>3,56</b> ±0,42	<b>3,47</b> ±0,93	<b>4,28</b> ±1,68	<b>3,89</b> ±0,31	<b>3,49</b> ±2,20	<b>5,72</b> ±1,99	<b>5,07</b> ±2,13	-	-	-	-	-
	<b>Ni</b>	<b>1,70</b> ±0,90	<b>3,51</b> ±0,83	<b>6,72</b> ±6,38	<b>9,70</b> ±2,20	<b>11,30</b> ±0,00	<b>6,75</b> ±3,35	<b>5,00</b> ±0,67	<b>7,61</b> ±1,34	<b>5,06</b> ±0,93	<b>3,23</b> ±1,22	<b>2,87</b> ±2,58	<b>3,43</b> ±0,37	<b>1,15</b> ±0,40	<b>1,23</b> ±0,54	<b>1,23</b> ±0,83
	<b>Se</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>11,78</b> ±10,55	<b>91,24</b> ±8,55	<b>14,70</b> ±7,44	<b>20,90</b> ±1,08	<b>25,99</b> ±12,17
	<b>Total</b>	<b>18,30</b>	<b>17,33</b>	<b>23,86</b>	<b>27,24</b>	<b>37,19</b>	<b>47,00</b>	<b>32,17</b>	<b>31,91</b>	<b>42,80</b>	<b>46,64</b>	<b>8,70</b>	<b>53,18</b>	<b>22,66</b>	<b>9,08</b>	<b>10,31</b>



## **Conclusiones**

---



En cultivo discontinuo o CO<sub>2</sub> é o principal factor determinante do crecemento e a composición bioquímica de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO). A variación da intensidade luminosa non tivo efectos sobre a densidade celular final nos cultivos discontinuos, e unicamente afectou á produción de exopolisacárido.

En cultivo semicontínuo, tanto *Nannochloropsis gaditana* como T-ISO experimentan un aumento do contido proteico e un descenso do contido de lípidos co incremento da taxa de renovación en condicións de limitación por nitróxeno. O contido de glúcidos diminúe co incremento da taxa de renovación independentemente das condicións nutricionais.

O contido dos diferentes oligoelementos en *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) alcanzou os seus valores máximos cunha taxa de renovación do 50% na maioría dos casos. En condicións de limitación por nutrientes o contido de oligoelementos tendeu a permanecer constante ou ben a descender coa taxa de renovación.

A diminución da fixación de carbono, causada ben por unha baixa dispoñibilidade de CO<sub>2</sub>, ben por unha redución na intensidade luminosa, ocasiona un descenso da acumulación de glúcidos e un maior contido lipídico en T-ISO cultivada en batch e nas dúas especies en cultivo semicontínuo. O aumento do contido lipídico vai acompañado de maiores porcentaxes e contidos celulares de ácidos graxos poliinsaturados.

A utilización de microalgas cultivadas en condicións de limitación por nitróxeno para o enriquecemento durante 24 h de *Brachionus plicatilis* dá lugar a rotíferos cun baixo contido orgánico e de ácidos graxos ω-3, independentemente do grado de limitación –taxa de renovación– do cultivo microalgal. En condicións de saturación de nitróxeno o aumento da taxa de renovación incrementa o contido orgánico do rotífero. A FCR diminúe co aumento da taxa de renovación da microalga.

O enriquecemento durante 24 h modifica o perfil de ácidos graxos do rotífero e dá lugar a correlacións positivas entre as porcentaxes do conxunto dos ácidos ω-3, EPA e DHA das microalgas e dos rotíferos.

O contido de oligoelementos nos rotíferos sometidos a enriquecemento foi superior que o dos rotíferos cultivados durante 8 días. O contido de oligoelementos en xeral incrementouse coa taxa de renovación das microalgas utilizadas como alimento.

Periodos de enriquecemento moi curtos non son apropiados para conseguir elevados contidos de ácidos graxos nos rotíferos.

A redución do contido de substancias de reserva nas células microalgais provocada por unha baixa intensidade luminosa mellora a asimilación dos nutrientes por parte de *Brachionus plicatilis* sometido a enriquecemento durante 24 h.

Un aumento da cantidade de alimento no enriquecemento de *Brachionus plicatilis* durante 24 h produce un incremento do contido de substancias de reserva

nos rotíferos, pero os contidos de proteína e ácidos graxos poliinsaturados practicamente non varían.

Nos cultivos de *Brachionus plicatilis* alimentado con microalgas, a taxa de crecemento, o peso seco e o contido orgánico dos rotíferos aumentan coa taxa de renovación do cultivo microalgal ata o punto de saturación por nutrintes. Esta taxa de renovación dá lugar asimesmo aos contidos máis elevados de proteínas, lípidos, glúcidos e ácidos graxos poliinsaturados nos rotíferos. Ademais, a FCR descende linealmente co incremento da taxa de renovación, pero non hai diferencias nas porcentaxes de proteína, lípidos e glúcidos sobre o total da fracción orgánica.

## **Referencias**

---





- Abe, T., Nagano, Y. and Imada, K. 1982. Environmental conditions of culture medium for the rotifer *Brachionus plicatilis*. Proc. Autumn Conference Japan. Soc. Sci. Fish in 1982, 68.
- Abu- Rezaq, T. S., Al-Shimmari, J. and Dias, P. 1997. Live food production using batch culture and chemostat systems in Kuwait. *Hydrobiologia* 358, 173-178.
- Amenta, J. S. 1964. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. *Journal of Lipid Research* 5, 270-272.
- Andersen, R. A., Brett, R. W., Potter, D. and Sexton, J. P. 1998. Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist* 149, 61-74.
- Ando, Y., Kobayashi, S., Sugimoto, T. and Takamaru, N. 2004. Positional distribution of n-3 highly unsaturated fatty acids in triacyl-sn-glycerols (TAG) of rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with fish and seal oils TAG. *Aquaculture* 229, 275-288.
- Aragão, C., Conceição, L. E. C., Dinis, M. T. and Fyhn, H.-J. 2004. Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture* 234, 429-445.
- Arredondo-Vega, B. O., Lamela, T., Otero, A., Patiño, M. and Fábregas, J. 1995. Mixotrophic production of arachidonic and eicosapentaenoic acids by *Porphyridium cruentum*. *Journal of Marine Biotechnology* 3, 79-81.
- Bajpai, P. and Bajpai, P. K. 1993. Eicosapentaenoic acid (DPA) production from microorganisms: a review. *Journal of Biotechnology* 30 (2), 161-183.
- Barnes, R. D. 1987. *Zoología de los invertebrados* (traducción da 5ª edición inglesa). Nueva Editorial Interamericana McGraw-Hill, México D. F.
- Bell, J. G., Cowey, C. B., Adron, J. W. and Pirie, B. J. S. 1987. Some effects of selenium deficiency on enzyme activities and indices of tissue peroxidation in Atlantic salmon parr (*Salmo salar*). *Aquaculture* 65 (1), 43-54.
- Bell, M. V., Batty, R. S., Dick, J. R., Fretwell, K., Navarro, J. C. and Sargent, J. R. 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus*). *Lipids* 30 (5), 443-449.
- Bell, J. G., McEvoy, L. A., Estévez, A., Shields, R. J. and Sargent, J. R. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211-230.
- Ben-Amotz, A., Fishler, R. and Schneller, A. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Marine Biology* 95, 31-36.
- Ben-Amotz, A., and Avron, M. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology* 8 (5), 121-126.

- Bengtson, D. A. 2003. Status of marine aquaculture in relation to live prey: past, present and future. En: Live feeds in marine aquaculture. Støttrup, J. G. and McEvoy, L. A. (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford, 1-16.
- Bhatti, S., Huertas, I. E. and Colman, B. 2002. Acquisition of inorganic carbon by the marine haptophyte *Isochrysis galbana* (Prymnesio-phyceae). *Journal of Phycology* 38, 914-921.
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P. and Ogunmoye, K. 2003. Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture* 225, 451-461.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.
- Borowitzka, M. A. 1988. Fats oils and hydrocarbons. En *Microalgal Biotechnology*. Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, 257-287.
- Boussiba, S., Sandbank, E., Shelef, G., Cohen, Z., Vonshak, A., Ben-Amotz, A., Arad, S., and Richmond, A. 1988. Outdoor cultivation of the marine microalga *Isochrysis galbana* in open reactors. *Aquaculture* 72, 247-253.
- Brown, J. S. 1987. Functional organization of chlorophyll *a* and carotenoids in the alga *Nannochloropsis salina*. *Plant Physiology* 83, 434-437.
- Brown, M. R., Garland, C. D., Jeffrey, S. W., Jameson, I. D. and LeRoi, J. M. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (clone T-ISO). *Journal of Phycology* 29, 601-612.
- Brown, M.R., Dunstan, G. A., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Barrett, S. M. and LeRoi, J. M. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T-ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology* 5, 285-296.
- Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J. and Miller, K. A. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology* 32, 64-73.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. and Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315-331.
- Brown, M. R., Skabo, S. and Wilkinson, B. 1998. The enrichment and retention of ascorbic acid in rotifers fed microalgal diets. *Aquaculture Nutrition* 4, 151-156.
- Bruce, J. R., Knight, M. and Parke, M. W. 1940. The rearing of oyster larvae on an algal diet. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 24, 337-374.
- Cahu, C. and Zambonino Infante, J. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180.

- Camiro-Vargas, T.K., Hernández-Ayón, J. M., Valenzuela-Espinoza, E., Delgadillo-Hinojosa, F. and Cajal-Medrano, R. 2005. Dissolved inorganic carbon uptake by *Rhodomonas* sp. and *Isochrysis aff. galbana* determined by a potentiometric technique. *Aquacultural Engineering* 33, 83-95.
- Carić, M., Sanko-Njire, J. and Skaramuca, B. 1992. Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). *Aquaculture* 110, 141-150.
- Carmona, M. J., Serra, M. and Miracle, m. R. 1993. Relationships between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. *Hydrobiologia* 255/256, 145-152.
- Carvalho, A. P. and Malcata, F. X. 2005. Optimization of  $\omega$ -3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Marine Biotechnology* 7, 381-388.
- Chisholm, S. W., Stross, R. G. and Nobbs, P. A. 1975. Light/dark phased cell division in *Euglena gracilis* (Z) (Euglenophyceae) in PO<sub>4</sub> limited continuous cultures. *Journal of Phycology* 11, 367-373.
- Christensen, T. 1962. Alger. En: Botanik. II. Systematisk Botanik. Bocher, T. W., Lange, M., Sørensen, T. (eds). København: Munksgaard.
- Clark, D. R., Merrett, M., J. and Flynn, K. J. Utilization of dissolved inorganic carbon (DIC) and the response of the marine flagellate *Isochrysis galbana* to carbon or nitrogen stress. *New Phytologist* 144, 463-470.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A. and Harrison, P. J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology* 11, 179-184.
- Conceição, L. E. C., Grasdalen, H. and Rønnestad, Y. 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture* 227, 221-232.
- Copeman, L. A., Parrish, C. C., Brown, J. A. and Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285-304.
- Coutinho, P., Rema, P., Otero, A., Pereira, O., Fábregas, J. 2006. Use of biomass of the marine microalga *Isochrysis galbana* in the nutrition of goldfish (*Carassius auratus*) larvae as source of protein and vitamins. *Aquaculture Research* 37:793-798.
- Coutteau, P. and Sorgeloos, P. 1997. Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. *Freshwater Biology* 38, 501-512.

- Delbare, D. and Dhert, P. 1996. Cladocerans, nematodes and trochophora larvae. En: Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper nº 361. Lavens, P. and Sorgeloos, P. (eds.). FAO, Roma, 283-295.
- Delbare, D., Dhert, P. and Lavens, P. 1996. Zooplankton. En: Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper nº 361. Lavens, P. and Sorgeloos, P. (eds.). FAO, Roma, 252-282.
- Dhert, P. 1996. Rotifers. En: Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper nº 361. Lavens, P. and Sorgeloos, P. (eds.). FAO, Roma, 49-78.
- Dhert, P., Rombaut, G. and Suantika, G. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200, 129-146.
- Dittmer, J. C. and Wells, M. A. 1969. Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. *Methods in Enzymology* 14, 482-530.
- Domínguez, A., Ferreira, M., Coutinho, P., Fábregas, J. and Otero, A. 2005. Delivery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* to the aquaculture food chain. *Aquaculture* 250, 424-430.
- D'Souza, F. M. L. and Kelly, G. J. 2000. Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. *Aquaculture* 181, 311-329.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, f. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Duerr, E. O., Molnar, A. and Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology* 7, 65-70.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M. and Garland, C. D. 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5, 71-83.
- Establier, R. and Lubián, L. M<sup>a</sup>. 1982. Composición de pigmentos en *Nannochloris maculata* Butcher y *N. oculata* Droop (CCAP 251/6). Implicaciones de tipo taxonómico. *Investigación Pesquera* 46(3), 451-457.
- Estévez, A., McEvoy, L. A., Bell, J. G. and Sargent, J. R. 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 190, 321-343.
- Evjemo, J. O. and Olsen, Y. 1997. Lipid and fatty acid content n cultivated live feed organisms compared to marine copepods. *Hydrobiologia* 358, 159-162.
- Evjemo, J. O., Reitan, K. I. and Olsen, Y. 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 227, 191-210.

- Ewart, J. W. and Epifanio, C. E. 1981. A tropical flagellate food for larval and juvenile oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* 22, 297-300.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42, 207-215.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J. and Cabezas, B. 1985. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentration. *Aquaculture* 50, 1-11.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. and 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. and Herrero, C. 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture* 51 (3-4), 237-243.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liaño, R. and Cabezas, B. 1986. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture* 53, 187-199.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Abalde, J. 1986. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture* 53, 101-113.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Abalde, J. 1987. Growth and biochemical variability of the marine microalga *Chlorella stigmatophora* in batch cultures with different salinities and nutrient gradient concentration. *British Phycological Journal* 22, 269-276.
- Fábregas, J., Abalde, J., Cabezas, B. and Herrero, C. 1989. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea. *Aquacultural Engineering* 8, 223-239.
- Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo-Vega, B. O., Tobar, J. L. and Otero, A. 1995. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 287-292.
- Fábregas, J., Patiño, M., Vecino, E., Cházaro, F. and Otero, A. 1995. Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 617-621.
- Fábregas, J., Cid, Á., Morales, E., Cordero, B. And Otero, A. 1996. Discrepancies between cell volume and organic content in semi-continuous cultures of a marine microalga. *Letters in Applied Microbiology* 22, 206-208.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B. and Patiño, M. 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture* 143, 197-204.

- Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E. D.; Cordero, B. And Otero, A. 1996. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in semicontinuous cultures. Applied and Environmental Microbiology 62 (1), 266-268.
- Fábregas, J., Morales, E. D., Lamela, T., Cabezas, B. and Otero, A. 1997. Mixotrophic productivity of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* cultured with soluble fractions of rye, wheat and potato. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13, 349-351.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E. D., Arredondo-Vega, B. O. and Patiño, M. 1998. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricorutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. Aquaculture 169, 167-176.
- Fábregas, J., Otero, A., Domínguez, A. and Patiño, M. 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. Marine Biotechnology 3, 256-263.
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Ferreira, M. and Otero, A. 2002. Changes in the cell composition of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana* during a light:dark cycle. Biotechnology Letters 24, 1699-1703.
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A. and Otero, A. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology 20, 31-35.
- FAO, 2004. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries Department, Roma.
- Fernández-Reiriz, M. J., Labarta, U. and Ferreira, M. J. 1993. Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture 112, 195-206.
- Fernández Sevilla, J. M., Molina Grima, E., García Camacho, F., Ación Fernández, F. G. and Sánchez Pérez, J. A. 1998. Photolimitation and photoinhibition as factors determining optimal dilution rate to produce eicosapentaenoic acid from cultures of the microalga *Isochrysis galbana*. Applied Microbiology and Biotechnology 50: 199-205.
- Fidalgo, J. P. Cid, Á., Torres, S., Sukenik, A. and Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture 166, 105-116.
- Flynn, K. J., Davidson, K. and Leftley, J. W. 1993. Carbon-nitrogen relations during batch growth of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) under alternating light and dark. Journal of Applied Phycology 5 (4). 465-475.
- Frolov, A. V., Pankov, S. L., Geradze, K. N., Pankova, S. A. and Spektorova, L. V. 1991. Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 97, 181-202.

- Frolov, A. V., Pankov, S. L. 1992. The effect of starvation on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Journal of the Marine Biological Association of the U. K. 72, 343-356.
- Fukusho, K. and Iwamoto, H. 1980. Cyclomorphosis in size of the cultured rotifer, *Brachionus plicatilis*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 1, 29-37.
- Fukusho, K. 1989. Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis* (1). Int. J. Aq. Fish Technol. 1, 232-240.
- Gayral, P. and Fresnel, J. 1983. Description, sexualité et cycle de développement d'une nouvelle Coccolithophoraceé (Prymnesiophyceae): *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* sp. nov. Protistologica 19, 245-261.
- Gilbert, J. J. 1980. Female polymorphism and sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna*: evolution of their relationship and control of dietary tocopherol. Am. Nat. 116, 409-431.
- Gladu, P. K., Patterson, G. W., Wikfors, G. H. and Smith, B. C. 1995. Sterol, fatty acid, and pigment characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae). Journal of Phycology 31, 774-777.
- Goldman, J. C., McCarthy, J. J. and Peavey, D. G. 1979. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. Nature 279, 210-214.
- Goldman, J. C. and Peavey, D. G. 1979. Steady-state growth and chemical composition of the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* in nitroge-limited continuous cultures. Applied and Environmental microbiology 38 (5), 894-901.
- Goldman, J. C. 1986. On phytoplankton growth rates and particulate C:N:P ratios at low light. Limnology and Oceanography 31 (6), 1358-1363.
- Gordillo, F. J. L., Goutx, M., Figueroa, F. L. and Niell, F. X. 1998. Effects of light intensity, CO<sub>2</sub> and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. Journal of Applied Phycology 10, 135-144.
- Green, J. C. and Parke, M. 1975. A reinvestigation by light and electron-microscopy of *Ruttnera spectabilis* Geitler (Haptophyceae), with special reference to the fine structure of the zooids. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 52, 469-474.
- Green, J. C., Perch-Nielsen, K. and Westbroek, P. 1990. Phylum Prymnesiophyta. En: Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J. (eds.), Handbook on Protoctista. Jones and Bartlett, Boston. 293-317.
- Gross, F. 1937. Notes on the culture of some marine plankton organisms. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 21, 753-768.
- Guerrini, F., Mazzotti, A., Boni, L. and Pistocchi, R. 1998. Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. Aquatic Microbial Ecology, 15, 247-253.

- Guerrini, F., Cangini, M., Boni, L., Trost, P. and Pistocchi, R. 2000. Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. *Journal of Phycology* 36, 882-890.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8, 229-239.
- Guillard, R. R. L. and Lorenzen, C. J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology* 8(1) 10-14.
- Hagiwara, A., Gallardo, W. G., Assavaaree, M., Kotani, T and De Araujo, A. B. 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture* 200, 111-127.
- Heimdal, B. R. 1993. Modern coccolithophorids. En: *Marine Phytoplankton*. Tomas, C. R. (ed.). Academic Press, London, 147-247.
- Helm, M. M. and Laing, I. 1987. Preliminary observations on the nutritional value of "Tahiti *Isochrysis*" to bivalve larvae. *Aquaculture* 62, 281-288.
- Herbert, D., Phipps, P. J. and Strano, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. En: *Methods in Microbiology*. Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (eds.). Academic Press 209-344.
- Hibberd, D. J. and Leedale, G. F. 1970. Eustigmatophyceae – a new algal class with unique organization of the motile cell. *Nature* 225, 758-760.
- Hibberd, D. J. and Leedale, G. F. 1971. A new algal class – the Eustigmatophyceae. *Taxon* 20, 523-525.
- Hibberd, D. J. and Leedale, G. F. 1972. Observations on the cytology and ultrastructure of the new algal class, Eustigmatophyceae. *Annals of Botany* 36, 49-71.
- Hibberd, D. J. 1976. The ultrastructure and taxonomy of the Chrysophyceae and Prymnesiophyceae (Haptophyceae): a survey with some new observations on the ultrastructure of the Chrysophyceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 72, 55-80.
- Hibberd, D. J. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclatures of the algal classes Eustigmatophyceae and Trbophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 82, 93-119.
- Hibberd, D. J. 1990. Phylum Eustigmatophyta. En: Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J. (eds), *Handbook on Protoctista*. Jones and Bartlett, Boston. 326-333.
- Hino, A., Aoki, S. and Ushiro, M. 1997. Nitrogen-flow in the rotifer *Brachionus rotundiformis* and its significance in mass cultures. *Hydrobiologia* 358, 77-82.



- Holland, D. L. and Gabbott, P. A. 1971. A microanalytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipids and RNA levels in marine invertebrate larvae. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.* 51, 695-668.
- Hu, H., and Gao, K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnology Letters* 25, 421-425.
- Ishida, Y., Hiragushi, N., Kitaguchi, H., Mitsutani, A., Nagai, S. and Yoshimura, M. 2000. A highly CO<sub>2</sub>-tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. *Fisheries Science* 66, 655-659.
- Ito, T. 1980. Fundamental studies on the culture of mixohaline rotifer, *Brachionus plicatilis*. VII. Effects of pH of cultured water upon the survival and reproduction of *B. plicatilis*. *Artificial propagation of Ayu fish* 5, 147-157.
- James, C. H. and Abu-Rezeq, 1989. An intensive chemostat culture system for the production of rotifers for aquaculture. *Aquaculture* 81, 291-301.
- Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physio. Pflanzen* 167, 191-194.
- Jeffrey, S. W. and Wright, S. W. 1994. Photosynthetic pigments in the Prymnesiophyceae. En: *The Haptophyte Algae*. Green, J. C., Leadbeater, B. S. C. (eds.). Clarendon Press, Oxford, 111-132.
- Jeffrey, S. W. and Veski, M. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. En: *Phytoplankton pigments in oceanography*. S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura and S. W. Wright (eds.). UNESCO Publishing, Paris, 37-84.
- Jeffrey, S. W. and Welschmeyer, N. A. 1997. Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. En: *Phytoplankton pigments in oceanography*. Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. and Wright, S. W. (eds). UNESCO Publishing, Paris, 597-615.
- Jensen, T.C. and Verschoor, A. M. 2004. Effects of food quality on life history of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Freshwater Biology* 49, 1138-1151.
- Kaplan, D., Cohen, Z. and Abeliovich, A. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* 9, 37-48.
- Karlson, B., Potter, D., Kuylentierna, M., and Andersen, R. A. 1996. Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmato-phyceae), a marine ultraplankton isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. *Phycologia* 35(3), 253-260.
- Klaveness, D. and Paasche, E. 1979. Physiology of coccolithophorids. En: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, vol. 1. Levandowsky, M. and Hutner, S. H. (eds.). Academic Press, New York, 2<sup>nd</sup> edition, 191-213.

Kochert, G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. En: Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. Hellebust, J. A. and Craigie, J. S. (eds.), 95-97. Cambridge University Press, London.

Kolkovski, S., Koven, W. and Tandler, A. 1997. The mode of action of Artemia in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture 155, 193-205.

Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. Aquaculture 200, 181-201.

Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Berhens, P. and Tandler, A. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4 n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. Aquaculture 193, 107-122.

Koven, W., van Anholt, R., Lutzky, S., Ben Atia, I., Nixon, O., Ron, B. and Tandler, A. 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. Aquaculture 228, 307-320.

Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H.-B. and Weiler, W. 2000. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. Phycologia 39(3), 219-227.

Laing, I. 1985. Factors affecting the large-scale production of four species of commercially important marine algae. Aquaculture 44, 161-166.

Lall, S. P. 1989. The minerals. In: Fish Nutrition. (2<sup>nd</sup> ed.). Halver, J. E. (ed.). Academic Press New York, 219-257.

Laws, E. A. and Wong, D. C. L. 1978. Studies of carbon and nitrogen metabolism by three marine phytoplankton species in nitrate-limited continuous culture. Journal of Phycology 14, 406-416.

Laws, E. A. and Bannister, T. T. 1980. Nutrient- and light-limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture with implications for phytoplankton growth in the ocean. Limnology and Oceanography 25 (3), 457-473.

Li, P. and Gatlin, D. M. 2006. Nucleotid nutrition in fish: current knowledge and future applications. Aquaculture 251, 141-152.

Lie, Ø., Haaland, H., Hemre, G.-I., Maage, A., Lied, E., Rosenlund, G., Sandnes, K. and Olsen, Y. 1997. Nutritional composition of rotifers following a change in diet from yeast and emulsified oil to microalgae. Aquaculture International 5, 427-438.

López Alonso, D., Belarbi, E.-H., Rodríguez-Ruiz, J., Segura, C. I. and Giménez, A. 1997. Acyl lipids of three microalgae. Phytochemistry 47 (8), 1473-1481.

López Alonso, D., Belarbi, E.-H., Fernández-Sevilla, J. M., Rodríguez-Ruiz, J. and Molina Grima, E. 2000. Acyl lipid composition variation related to culture age and

- nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 54, 461-471.
- Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lubián, L. M<sup>a</sup> and Establier, R. 1982. Estudio comparativo de la composición de pigmentos en varias cepas de *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). *Investigación Pesquera* 46(3), 379-389.
- Lubián, L. M.; Establier, R., and Ruiz, E. 1986. La luz y el nitrato en el crecimiento y contenido de pigmentos en cultivos de *Nannochloropsis gaditana* Lubián. *Investigación Pesquera* 50 (4), 499-517.
- Lubzens, E., Marko, A. and Tietz, A. De novo synthesis of fatty acids in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 47, 27-37.
- Lubzens, E. 2003. Production and nutritional value of rotifers. En: Live feeds in marine aquaculture. Støttrup, J. G. and McEvoy, L. A. (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford, 17-64.
- Lubzens, E., Minkoff, G. and Marom, S. 1985. Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Marine Biology* 85, 123-126.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147, 245-255.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O. and Sukenik, A. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* 133, 295-309.
- Makridis, P. and Olsen, Y. 1999. Protein depletion of the rotifer *Brachionus plicatilis* during starvation. *Aquaculture* 174, 343-353.
- Marsh, J. B. and Weinstein, D. B. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research* 7, 574-576.
- Maruyama, I., Nakamura, T., Matsubayashi, T., Ando, Y. and Maeda, T. 1986. Identification of the alga known as "marine *Chlorella*" as a member of the Eustigmatophyceae. *Japanese Journal of Phycology* 34, 319-325.
- Maseda, A. B. 2002. La luz modifica la productividad, la composición y el proteoma de microalgas del género *Nannochloropsis*. Tese de doutoramento. Universidade de Santiago de Compostela.
- McEvoy, L. A., Naess, T., Bell, J. G. and Lie, Ø. 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture* 163, 237-250.

- Meglitsch, P. A. 1972. Zoología de invertebrados (traducción do orixinal Invertebrate Zoology, 2ª edición). Ediciones Pirámide, Madrid.
- Mireles, L. A., Guedes, A. C., and Malcata, F. X. 2003. Lipid class composition of the microalga *Pavlova lutheri*: eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 2237-2241.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, P., Pector, R., Mai Soni, A. F., Abbes, M., Nelis, H., Ollevier, F., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P. 1995. Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Clarias gariepinus*. Journal of Applied Ichthyology 11, 336-341.
- Merchie, G., Lavens, P., Verreth, J., Ollevier, F., Pector, R., Nelis, H., De Leenheer, A., Storch, V. and Sorgeloos, P. 1997. The effect of grade levels of supplemental ascorbic acid in enriched live food fed to *Clarias gariepinus* larvae. Aquaculture.
- Molina, E., Martínez, M. E., Sánchez, S., García, F. and Contreras, A. 1990. The influence of flow rate and the composition of supplied CO<sub>2</sub>/air mixtures on discontinuous growth of *Tetraselmis* sp. Applied Microbiology and Biotechnology 34, 103-107.
- Mourente, G., Tocher, D. R. and Sargent, J. R. 1991. Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. Lipids 26 (11), 871-877.
- Mourente, G., Rodríguez A., Tocher, D. R. and Sargent, J. R. 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. Aquaculture 112, 79-98.
- Muller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. Journal of Applied Microbiology 12, 527-534.
- Muller-Feuga, A., Moal, J. and Kaas, R. 2003. The microalgae of aquaculture. En: Live feeds in marine aquaculture. Støttrup, J. G. and McEvoy, L. A. (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford, 206-252.
- Myklestad, S. and Haug, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 9, 125-136.
- Nagata, W. D. 1985. Long-term acclimation of a parthenogenetic strain of *Brachionus plicatilis* Müller to subnormal temperatures II. Effect on clearance and ingestion rates. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 36(1), 1-11.
- National Research Council, 1977. Nutrient requirements of warmwater fishes. National Academic Press. Washington D. C.
- Navarro, J. C., McEvoy, L. A., Bell, M. V., Amat, F., Hontoria, F and Sargent, J. R. 1997. Effect of different dietary levels of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 $\omega$ -3) on

the DHA composition of lipid classes in sea bass larvae eyes. *Aquaculture International* 5, 509-516.

Navarro, N. and Yúfera, M. 1998. Population dynamics of rotifers (*Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis*) in semicontinuous culture fed freeze-dried microalgae: influence of dilution rate. *Aquaculture* 166, 297-309.

Navarro, J. C., Henderson, R. J., McEvoy, L. A., Bell, M. V. and Amat, F. 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155-166.

Navarro, N. 1999. Feeding behaviour of the rotifers *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* with two types of food: live and freeze-dried microalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 237, 75-87.

Nelson, J. R., Guarda, S., Cowell, L. E. and Heffernan, P. B. 1992. Evaluation of microalgal clones for mass cultures in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30 °C. *Aquaculture* 106, 357-377.

Nolan, C. V., Fowler, S. W. and Teyssie, J.-L. 1992. Cobalt speciation and bioavailability in marine organisms. *Marine Ecology Progress Series* 88, 105-116.

Olson, J. A. 1989. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. *Journal of Nutrition* 119, 105-108.

Otero, A. 1994. Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato. Tese de doutoramento, Universidade de Santiago de Compostela.

Otero, A., Arrendondo-Vega, B. O., Patiño, M., Lamela, T. and Fábregas, J. 1995. Production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in semicontinuous cultures of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Marine Biotechnology* 3, 82-85.

Otero, A. and 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., García, D., Morales, E. D., Arán, J. and Fábregas, J. 1997. Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 26, 171-177.

Otero, A., García, D. and Fábregas, J. 1997. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 9: 465-469.

Otero, A., Domínguez, A., Lamela, T., García, D. and Fábregas, J. 1998. Steady-states of semicontinuous cultures of a marine diatom: effect of saturating nutrient concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 227, 23-34.

- Otero, A. and Vincenzini, M. 2003. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology* 102, 143-152.
- Otero, A. and Vincenzini, M. 2004. *Nostoc* (Cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. *Journal of Phycology* 40, 74-81.
- Øie, G. and Olsen, Y. 1997. Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition. *Hydrobiologia* 358, 251-258.
- Øie, G., Makridis, P., Reitan, K. I. and Olsen, Y. 1997. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 153, 103-122.
- Owens, T. G., Gallagher, J. C. and Alberte, R. S. 1987. Photosynthetic light-harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae). *Journal of Phycology* 23, 79-85.
- Parke, M., Green, J. C. and Manton, I. 1971. Observations on the fine structure of zooids of the genus *Phaeocystis* (Haptophyceae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51, 927-941.
- Parrish, C. C., Wells, J. S., Yang, Z. and Dabinett, P. 1998. Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Marine Biology* 133, 461-471.
- Parsons, T. R., Stephens, K., and Strickland, J. D. H. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Board Can.* 18, 1001-1016.
- Patiño, M. 1995. Nutrición de *Brachionus plicatilis* y *Artemia* sp. con microalgas marinas. Tese de doutoramento, Universidade de Santiago de Compostela.
- Patterson, G. W., Tsitsa-Tzardis, E., Wikfors, G. H., Ghosh, P., Smith, B. C. and Gladu, P. K. 1994. Sterols of Eustigmatophytes. *Lipids* 29(9), 661-664.
- Preisig, H. R. and Wilhelm, C. 1989. Ultrastructure pigments and taxonomy of *Botryochloropsis similis* gen. et sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 28, 61-69.
- Provasoli, L., McLaughlin, J. J. A. and Droop, M. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25, 207-221.
- Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., Jørgensen, L. and Olsen, U. 1994. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107A (4), 699-710.

- Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I. and Olsen, Y. 1994. Effect of short- and long-term lipid enrichment on total lipids, lipid class and fatty acid composition in rotifers. *Aquaculture International* 2, 19-32.
- Ramos-Rodríguez, E. and Conde-Porcuna, J. M. 2003. Nutrient limitation on a planktonic rotifer: life history consequences and starvation resistance. *Limnology and Oceanography* 48 (2) 933-938.
- Reboloso Fuentes, M. M., Ación Fernández, G. G., Sánchez Pérez, J. A. and Guil Guerrero, J. L. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry* 70, 345-353.
- Reboloso Fuentes, M. M., Navarro Pérez, A., García Camacho, F., Ramos Miras, J. J. and Guil Guerrero, J. L. 2001. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2966-2972.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G. and Olsen, Y. 1993. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 118, 257-275.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. and Olsen, Y. 1994a. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture International* 2, 33-48.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J. R. and Olsen, Y. 1994b. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology* 30, 972-979.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G. and Olsen, Y. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155, 207-221.
- Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L-V., Kuo, C., Padovan, A and Sammy, N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 3, 43-53.
- Richmond, A. and Zou, N. 1999. Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organisms. *Journal of Applied Phycology* 11, 123-127.
- Robert, R. and Trintignac, P. 1997. Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resources* 10, 315-327.
- Robin, J. H. 1989. The quality of living preys for fish larval culture: preliminary results on mineral supplementation. En: *Aquaculture: a biotechnology in progress*. De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H. and Wilkins, N. (eds.). European Aquaculture Society, Bredene, 764-774.
- Rocha, J. M. S., Garcia, J. E. C. and Enriques, M. H. F. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering* 20, 237-242.

- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Barsanti, L., Rosati, G. and Tredici, M. R. 2003. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering* 20, 243-248.
- Rodríguez, C., Pérez, J. A., Lorenzo, A., Izquierdo, M. S. and Cejas, J. R. 1994. n-3 HUFA requirement of larval gilthead seabream *Sparus aurata* when using high levels of eicosapentaenoic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107A (4), 693-698.
- Rodríguez, C., Pérez, J. A., Izquierdo, M. S., Cejas, J. R., Bolaños, A. and Lorenzo, A. 1996. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. *Aquaculture* 147, 93-105.
- Rodríguez Rainuzzo, J., Olsen, Y. and Rosenlund, G. 1989. The effect of enrichment diets on the fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 79, 157-161.
- Roessler, P. G. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolisms in microalgae: commercial implications and future research directions. *Journal of Phycology* 26, 393-399.
- Rollefsen, G. 1939. Artificial rearing of fry of seawater fish-preliminary communication. *Rapp. Procès-verbaux Réunions Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 109, 133.
- Romanovicz, D. K. 1981. Scale formation in flagellates. En: *Cytomorphogenesis in Plants*. Kiermayer, O. (ed.). Springer-Verlag, Viena, 27-62.
- Rønnestad, I., Hemre, G. I., Finn, R. N. and Lie, Ø. 1993. Alternate sources and dynamics of vitamin A and its incorporation into the eyes during early endotrophic and exotrophic larval stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 119A, 787-793.
- Rønnestad, I., Tonheim, S. K., H.J. Fyhn, H. J., Rojas-García, C. R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R. N., Terjesen, B. F., Barr, Y. and Conceição, L. E.C. 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture* 227, 147-164.
- Rothhaupt, K. O. 1990. Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species. *Limnology and Oceanography* 35 (1), 16-23.
- Rothhaupt, K. O. 1995. Algal nutrient limitation affects rotifer growth rate but not ingestion rate. *Limnology and Oceanography* 40 (7), 1201-1208.
- Santos, L. M. A. 1996. The Eustigmatophyceae: Actual knowledge and research perspectives. *Beiheft Nova Hedwigia* 112, 391-405.
- Saoudi-Helis, L., Dubacq, J.-P., Marty, Y., Samain, J.-F. and Gudin, C. 1994. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* clone T.iso. *Journal of Applied Phycology* 6, 315-322.



- Sato, N. and Murata, N. 1988. Membrane lipids. *Methods in Enzymology* 167, 251-259.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. and Estévez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191-199.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. and Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217-229.
- Sato, N. and Murata, N. 1988. Membrane lipids. *Methods in Enzymology* 167, 251-259.
- Schnepf, E., Niemann, A. and Wilhelm, C. 1996. *Pseudostaurastrum limneticum*, an eustigmatophycean alga with astigmatic zoospores. Morphogenesis, fine structure, pigment composition and taxonomy. *Arch. Protistenkd* 146, 237-249.
- Scott, A. P. and Baynes, S. M. 1978. Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 14, 247-260.
- Scott, A. P. 1980. Effect of growth rate of the food alga on the growth/ingestion efficiency of a marine herbivore. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 60, 681-702.
- Seale, A. 1933. Brine shrimp (*Artemia*) as a satisfactory food for fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 63, 129-130.
- Serra, M., Gómez, A. and Carmona, M. J. 1998. Ecological genetics of *Brachionus*. *Hydrobiologia* 387/388, 373-384.
- Snell, T. W. 1986. Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Marine Biology* 92, 157-162.
- Snell, 1991. Improving the design of mass culture systems for the rotifer, *Brachionus plicatilis*. En: Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of a U.S.-Asia workshop. Fulks, W. and Main, K. L. (eds.), 61-72.
- Solbakken, J. S., Berntssen, M. H. G., Norberg, B., Pittman, K. and Hamre. 2002. Different iodine and thyroid hormone levels between Atlantic halibut larvae fed wild zooplankton or *Artemia* from first exogenous feeding until post metamorphosis. *Journal of Fish Biology* 61 (6), 1345-1362.
- Starkweather, P. J. and Gilbert, J. J. 1978. Feeding in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. IV: Selective feeding on tracer particles as a factor in trophic ecology and *in situ* techniques. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 20, 2389-2394.
- Sterner, R. W. and Robinson, J. L. 1994. Thresholds for growth of *Daphnia magna* with high and low phosphorus. *Limnology and Oceanography* 39(5), 1228-1232.

- Støttrup, J. G. 2001. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research* 31, 703-711.
- Støttrup, J. G. 2003. Production and nutritional value of copepods. En: Live feeds in marine aquaculture. Støttrup, J. G. and McEvoy, L. A. (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford, 145-205.
- Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167 (2<sup>nd</sup> edition) Ottawa. 310 pp.
- Suantika, G., Dhert, P. Nurhudah, P. and Sorgeloos, P. 2000. High-density production of rotifer *Brachionus plicatilis* in recirculated system: consideration of water quality, zootechnical and nutrient aspects. *Aquacultural Engineering* 21, 201-214.
- Suda, S., Atsumi, M., Miyashita, H. 2002. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41(3), 273-279.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. and Berner, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology* 25, 686-692.
- Sukenik, A. and Carmeli, Y. 1990. Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *Journal of Phycology* 26, 463-469.
- Sukenik, A., and Livne, A. 1991. Variations in lipid and fatty acid content in relation to acetyl CoA carboxylase in the marine prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. *Plant Cell Physiology* 32 (3) 371-378.
- Sukenik, A. and Wahnou, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 97, 61-72.
- Sukenik, A., Livne, A., Neori, A., Yacobi, Y. Z. and Katcoff, D. 1992. Purification and characterization of a light-harvesting chlorophyll-protein complex from the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Plant Cell Physiology*, 33(8), 1041-1048.
- Sukenik, A., Zmora, O. and Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 117, 313-326.
- Tachibana, K., Yagi, M., Hara, K., Mishima, T. and Tsuchimoto, M. 1997. Effects of feeding of  $\beta$ -carotene-supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae (Japanese parrotfish *Oplegnathus fasciatus*) and spotted parrotfish (*Oplegnathus punctatus*): preliminary trials. *Hydrobiologia* 358, 313-316.

- Tamaru, C. S., Murashige, L., Lee, C. S., Ako, H. And Sato, V. 1993. Rotifers fed various diets of baker's yeast and/or *Nannochloropsis oculata* and their effect on the growth and survival of striped mullet (*Mugil cephalus*) and milkfish (*Chanos chanos*) larvae. *Aquaculture* 110, 361-372.
- Tarui, F., Haga, Y., Ohta, K., Shima, Y. and Takeuchi, T. 2006. Effect of *Artemia* nauplii enriched with vitamin A palmitate on hypermelanosis on the blind side in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 72, 256–262.
- Tempest, D. W. 1978. Dynamics of microbial growth. En "Essays in Microbiology". Norris, J. R. and Richmond, M. H. (Eds.). John Wiley & Sons, Chichester.
- Turner, M. F. and Gowen, R. J. 1984. Some aspects of the nutrition and taxonomy of fourteen small green and yellow-green algae. *Botanica Marina* 27, 249-255.
- Tzovenis, I., De Pauw, N. and Sorgeloos, P. 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid. (DHA) content of *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-ISO). *Aquaculture International* 5, 489-507.
- Tzovenis, I., De Pauw, N. and Sorgeloos, P. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture* 216, 203-222.
- Tzovenis, I., De Pauw, N. and Sorgeloos, P. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture* 216, 223-242.
- Van Stappen, G. 1996. *Artemia*. En: Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper nº 361. Lavens, P. and Sorgeloos, P. (eds.). FAO Roma, 79-251.
- Vaz-Pires, P., Seixas, P. and Barbosa, A. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture* 238, 221-238.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. and Garland, C. D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128, 219-240.
- Volkman, J., Brown, M. R., Dunstan, G. A. and Jeffrey, S. W. 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. *Journal of Phycology* 29, 69-78.
- Walker, K. F. 1981. A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786. *Hydrobiologia* 81, 159-167.
- Walne, P. R. 1966. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Fish. Invest.* 2, 25-53.
- Watanabe, T., Kitajima, C. and Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish. A review. *Aquaculture* 34, 115-143.

- Watanabe, T., Viswanath, K. And Shuichi, S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151 (1-4), 185-207.
- Whittle, S. J. 1976. The major chloroplast pigments of *Chlorobotrys regularis* (West) Bohlin (Eustigmatophyceae) and *Ophiocytium majus* Naegeli (Xanthophyceae). *British Phycological Journal* 11, 111-114.
- Whittle, S. J. and Casselton, P. J. 1969. The chloroplast pigments of some green and yellow-green algae. *British Phycological Journal* 4, 55-64.
- Whittle, S. J. and Casselton, P. J. 1975. The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal* 10, 179-191.
- Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60, 231-241.
- Whyte, J. N. C. and Nagata, W. D. 1990. Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, fed monospecific diets of yeast or phytoplankton. *Aquaculture* 89, 263-272.
- Whyte, N. J. C., Clarke, W. C., Ginther, N. G., Jensen, J. O. T. and Townsend, L. D. 1994. Influence of composition of *Brachionus plicatilis* and *Artemia* on growth of larval sablefish (*Anoplopoma fimbria* Pallas). *Aquaculture* 119, 47-61.
- Wikfors, G. H. and Patterson, G. W. 1994. Differences in strains of *Isochrysis* of importance to mariculture. *Aquaculture* 123, 127-135.
- Wikfors, G. H. and Ohno, M. 2001. Impact of algal research on aquaculture. *Journal of Phycology* 37, 968-974.
- Wood, A. M., Everroad, R. C. and Wingard, L. M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. En: *Algal culturing techniques*. Andersen, L. A. (Ed.). Elsevier Academic Press, Oxford, 269-286.
- Yongmanitchai, W. and Ward, O. P. 1991. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry* 30, 2963-2967.
- Yúfera, M. and Pascual, E. 1980. Estudio del rendimiento de cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis* O. F. Müller alimentados con levadura de panificación. *Investigación Pesquera* 44 (2), 361-368.
- Yúfera, M., Lubián, L. M<sup>a</sup> and Pascual, E. 1983. Efecto de cuatro algas marinas sobre el crecimiento poblacional de dos cepas de *Brachionus plicatilis* (Rotifera: Brachionidae) en cultivo. *Investigación Pesquera* 47, 325-336.
- Yúfera, M., Pascual, E. and Guinea, J. 1993. Factors influencing the biomass of the rotifer *Brachionus plicatilis* in culture. *Hydrobiologia* 255/256, 159-164.
- Zhu, C. J., Lee, Y. K. and Chao, T.M. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology* 9, 451-457.

---

## **Agradecimientos**



O camiño máis longo comeza cun primeiro paso... e remata tamén cun derradeiro paso. Agora que alcancei a miña meta, quero dar as grazas a todos os que me acompañaron.

Ao meu codirector, o Profesor Jaime Fábregas, agradézolle ter confiado en min, ofrecéndome a oportunidade de incorporarme ao seu equipo e realizar a miña tese., e poñer en todo momento á miña disposición canto precisiei.

Á miña codirectora, a Profesora Ana Otero, que supervisou todo o meu traballo. Grazas por ter sempre un momento –ou longas horas- para dedicarme, e pola túa axuda, os teus consellos e tamén, polas túas chamadas de atención de vez en cando. Todo me resultou moi útil.

Aos meus compañeiros. ¡Canto tempo compartindo espazo de traballo, material, cafés e bos e malos momentos! Grazas por terme aturado e por axudarme tantas veces, especialmente a Ana e Fito, os veteranos que me ensinaron e me axudaron en tantas cousas. En fin, que vos debo moito.

Vicen axudoume coa estatística e Elena cun montón de detalles. ¡Moitísimas grazas!

E como non, grazas á miña familia, que me apoiou en todo momento durante estes anos, alegrándose dos meus avances e solidarizándose cando me tocaba madrugar os domingos para ocuparme das microalgas ou escribir todo o verán. E grazas tamén aos meus amigos, que a pesar de que ás veces desaparecín durante días e días dedicada por completo ao meu traballo nunca se esqueceron de min, nin tampouco de axudarme a desconectar do laboratorio e de interesarse pola saúde dos meus “peixiños”.

Pagou a pena.

