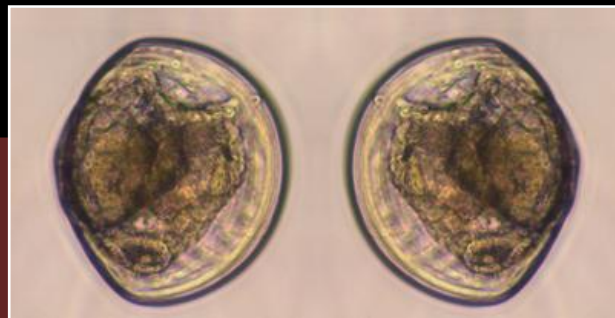




**Mejora de la supervivencia larvaria en cultivos de moluscos mediante la mejora de las técnicas de cultivo de microalgas y la introducción de nuevas especies de microalgas**



**Pedro Nascimento da Fonseca**

Tesis doctoral / PhD Thesis

Santiago de Compostela, 2015





Mejora de la supervivencia larvaria en cultivos de moluscos mediante la mejora de las técnicas de cultivo de microalgas y la introducción de nuevas especies de microalgas



Memoria para optar  
Al Grado de Doctor en Acuicultura  
que presenta  
Pedro Nascimento da Fonseca

---

Pedro Nascimento da Fonseca







**Ana María Otero Casal**, Profesora Titular de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**HACE CONSTAR:**

Que la presente memoria titulada “Mejora de la supervivencia larvaria en cultivos de moluscos mediante la mejora de las técnicas de cultivo de microalgas y la introducción de nuevas especies de microalgas” realizada por Pedro Nuno Alexandre Nascimento da Fonseca para optar al Grado de Doctor en Acuicultura ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Biología y autoriza su presentación.

Y para que así conste firma la presente en Santiago de Compostela, 12 de Noviembre 2015.

---

Fdo. Ana María Otero Casal





*Aos meus pais*



El trabajo contenido en la presente memoria ha sido parcialmente financiado por el proyecto “CENIT-VIDA Investigación en Tecnologías Avanzadas para la Valorización Integral De Algas” y por el proyecto Europeo EU FP7 ASSEMBLE MARINE.





## **Agradecimientos**

Llega al fin un capítulo más en mi formación y en este momento solo me queda agradecer a las personas que en todos estos años me han ayudado tanto a nivel profesional como personal y por ello me gustaría dar las gracias:

A mi directora Ana María Otero Casal, por abrirme las puertas de su laboratorio, dándome la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación en acuicultura. Agradecerle por haber creado las condiciones para que todo este trabajo fuera posible, y su dedicación y esfuerzo en esta recta final. Agradecerle por todo lo que aprendí en estos últimos años en su grupo de investigación. Su modo de ver la investigación y su rigor científico ha sido y serán un ejemplo a seguir para mí.

A Isabel Freire, por haber compartido conmigo muchas horas dentro y fuera del laboratorio, en los momentos buenos y menos buenos. Agradecerle por toda la ayuda durante este trabajo con estas microalgas que ambos sabemos que son especiales.

A Maribel Reyero, por su ayuda tan importante con los cultivos larvarios y estadística. Agradecerle por todas las horas que ha pasado conmigo cuidando de las larvas.

A Manuel Romero, por todo lo que hemos vivido juntos en el laboratorio y por los bares de Santiago. Agradecerle por haber hecho de mí un “mini” gallego. Agradecerle por lo que me ha enseñado y por todos sus consejos.

A Hugo Milhazes, por toda su ayuda en mi trabajo hasta el último momento. Agradecerle por haber compartido conmigo muchos buenos momentos en esta ciudad.

A Celia y Andrea, que hicieron parte de todo este camino que a pesar de diferente acabaría por cruzarse. Agradecerles por los cafés y por las risas con los demás compañeros dentro y fuera del laboratorio.

A Jaime Fábregas por abrirme las puertas de su laboratorio cuando empecé este camino. Agradecerle por el conocimiento que me ha transmitido en los pocos momentos en que nos hemos cruzado.

Ao Pedro Seixas e António Afonso, por terem sido os impulsionadores deste meu percurso. Agradecer-lhes todos os conselhos e incentivo ao longo destes anos.

A mis amigos y compañeros: Noemi, Paula, Naiara, Zulema, Javi, António, Natalia, João, André, Maria João, Aaron, Anahi, Nuno, Sara, y a todos que de cierta manera contribuyeron para que los últimos años en Santiago hayan sido estupendos.

Finalmente, aos meus pais e irmã, que pelos longos anos de apoio e incentivo.





## Resumo

O principal obxectivo deste traballo foi a mellora do cultivo larvários de bivalvos a través da mellora da composición bioquímica da dieta. Para iso, o efecto da aplicación de técnicas de cultivo continuo en especies de microalgas clásicas utilizadas no cultivo de larvário de moluscos para mellorar o seu perfil nutricional e os efectos da introdución de especies de criptófitas na dieta.

A aplicación de cultivos continuos no que a biomasa de microalgas ten un perfil nutricional estable e optimizado aumenta a robustez destes estudos comparativos. Os resultados obtidos mostra a importancia da utilización de sistemas contínuos con altas taxas de renovación para a obtención de biomasa de microalgas de alta calidade, permitindo un maior crecemento e supervivencia das larvas de moluscos bivalvos, como xa se demostrou noutros filtradores. Entre as especies estudadas, se enfatiza o potencial da criptófita *C. placoidea* para uso en acuicultura, que presentou excelentes resultados, non só para mellorar a supervivencia en cultura larval de moluscos bivalvos, senón tamén para a cultura de rotíferos *B. plicatilis*.

Palabras clave: Microalga; Criptófita; Bivalvos; Dieta larva; nutrición

## Resumen

El principal objetivo del presente trabajo fue la mejora de cultivos larvarios de moluscos bivalvos a través de la mejora de la composición bioquímica de la dieta. Para ello se exploró el efecto de la aplicación de técnicas de cultivo continuo en las especies microalgales clásicas utilizadas en el cultivo larvario de moluscos para la mejora de su perfil nutricional y se evaluaron los efectos de la introducción de especies de criptófitas en la dieta.

La aplicación de cultivos continuos en los que la biomasa microalgal posee un perfil nutricional estable y optimizado incrementa la robustez de estos estudios comparativos. Los resultados aquí obtenidos demuestran la importancia de la utilización de sistemas semicontinuos con elevadas tasas de renovación para la obtención de biomasa microalgal de elevada calidad, permitiendo incrementar la supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos, tal y como ya había sido demostrado en otros animales filtradores. De entre las especies estudiadas, se enfatiza el potencial de la criptófita *C. placoidea* para su utilización en acuicultura, que presentó excelentes resultados no solo para la mejora de la supervivencia en el cultivo larvario de moluscos bivalvos, sino también para el cultivo del rotífero *B. plicatilis*.

Palabras clave: Microalga; Criptófita; Bivalvos; Dieta larva; nutrición

## Abstract

The main objective of this work has been the improvement of larval cultures of bivalve molluscs through the improvement of the biochemical composition of the diet. Having this in mind, the effect of the use of continuous culture techniques for the improvement of biochemical composition of classic microalgae species used for the larval culture of mollusc was studied. Moreover, we have evaluated the effect of the introduction of species belonging to the Cryptophyceae group in three different experiments. The use of continuous cultures, with optimized and stable nutritional profile, increased the robustness of these comparative studies.

Results obtained in this work corroborate the importance of high renewal rate semicontinuous systems to obtain high quality microalgal biomass for the improvement of larval survival and growth of bivalve molluscs, as previously described for other filtering organisms. *C. placoidea*, showed better larval survival rates for bivalve molluscs, as well as better results for the culture of the rotifer *B.plicatilis*. For these reasons *C. placoidea* shows great potential to be used in aquaculture for rotifer and mollusc bivalve larvae.

Key word: Microalgae; Cryptophyte; Bivalve; Larval diet, Nutrition.





## Índice



Introducción .....	3
<b>1. Estado de la acuicultura .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Acuicultura de moluscos bivalvos .....</b>	<b>9</b>
2.1. Generalidades .....	9
2.2. Producción de moluscos bivalvos en criadero.....	11
2.2.1. Acondicionamiento de reproductores e inducción del desove .....	12
2.2.2. Cultivo larvario, metamorfosis y cultivo post-larvario .....	13
2.3. Requerimientos nutritivos de las larvas de bivalvos .....	14
2.4. Patologías en moluscos .....	15
<b>3. Microalgas.....</b>	<b>16</b>
3.1. Generalidades .....	16
3.2. Condiciones de cultivo de microalgas.....	17
3.3. Importancia de las microalgas en la acuicultura.....	21
3.4. Microalgas como alimento de moluscos bivalvos.....	22
3.5. Las microalgas de la clase Cryptophyceae y su aplicación en acuicultura .....	24
Objetivos .....	31
Materiales y Métodos.....	35
<b>1. Descripción de las especies .....</b>	<b>37</b>
<b>1.1. Criptófitas .....</b>	<b>37</b>
1.1.1. Género <i>Rhinomonas</i> .....	38
1.1.2. Género <i>Rhodomonas</i> .....	39
1.1.3. Género <i>Chroomonas</i> .....	40
1.1.4. Obtención de las especies de criptófitas.....	41
1.2. Otras especies de microalgas.....	42
1.2.1. <i>Isochrysis aff. galbana</i> Parke (LB 927/21) .....	42
1.2.2. <i>Nannochloropsis gaditana</i> Lubián .....	44
1.2.3. <i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) Butcher .....	46
1.2.4. <i>Chaetoceros</i> sp. ....	47
1.3. Rotífera.....	48
1.3.1. <i>Brachionus plicatilis</i> O.F. Müller.....	48
1.4. Bivalvia .....	50
1.4.1. Subclase Heterondonta.....	51
1.4.1.1. Orden Veneroidea.....	51

1.4.2.	Subclase Pteriomorphia.....	52
1.4.2.1.	Orden Ostreoida.....	52
<b>2.</b>	<b>Sistemas de cultivo de las microalgas .....</b>	<b>53</b>
<b>3.</b>	<b>Sistema de cultivo de los rotíferos.....</b>	<b>54</b>
<b>4.</b>	<b>Sistema de cultivo de los moluscos bivalvos .....</b>	<b>55</b>
<b>5.</b>	<b>Recuento celular .....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Cálculo de la tasa crecimiento.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Determinación del peso seco.....</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Análisis elemental (C-H-N).....</b>	<b>59</b>
<b>9.</b>	<b>Determinación del contenido proteico.....</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>Determinación de ficobiliproteínas.....</b>	<b>60</b>
<b>11.</b>	<b>Determinación del contenido de carbohidratos.....</b>	<b>61</b>
<b>12.</b>	<b>Determinación del contenido lipídico.....</b>	<b>62</b>
<b>13.</b>	<b>Determinación del contenido de ácidos grasos.....</b>	<b>62</b>
<b>14.</b>	<b>Determinación de UFCs.....</b>	<b>64</b>
<b>15.</b>	<b>Tratamiento estadístico.....</b>	<b>64</b>
 Capítulo 1 – Estudio del crecimiento y composición bioquímica de diferentes especies de microalgas del grupo Chryptophyceae y su potencial utilización en la alimentación del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> .....		
		65
<b>1.</b>	<b>Crecimiento, productividad y composición bioquímica de las especies de Cryptophyceae <i>Rhodomonas reticulata</i>, <i>Rhodomonas salina</i>, <i>Rhodomonas lens</i> y <i>Chroomonas placoidea</i> en cultivo continuo y discontinuo.....</b>	<b>67</b>
<b>1.1.</b>	<b>Justificación y diseño experimental .....</b>	<b>67</b>
<b>1.2.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>68</b>
1.2.1.	Crecimiento y productividad.....	68
1.2.1.	Composición bioquímica.....	74
<b>2.</b>	<b>Evaluación del crecimiento de las criptófitas <i>Rhodomonas lens</i> y <i>Chroomonas placoidea</i> sometidas a dos intensidades luminosas .....</b>	<b>87</b>
<b>2.1.</b>	<b>Justificación y diseño experimental .....</b>	<b>87</b>
<b>2.2.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>88</b>
2.2.1.	Crecimiento y productividad.....	88
2.2.2.	Composición bioquímica.....	92
<b>3.</b>	<b>Evaluación del potencial de las criptófitas <i>Rhodomonas lens</i> (CCMP 739) y <i>Chroomonas placoidea</i> (CCAP 978/8) para el cultivo del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> .....</b>	<b>103</b>

<b>3.1. Justificación y diseño experimental</b> .....	103
<b>3.2. Resultados y Discusión</b> .....	105
3.2.1. Densidad celular y productividad de las diferentes microalgas .....	105
3.2.2. Composición bioquímica de microalgas .....	107
3.2.4. Efecto de la composición bioquímica de la microalga sobre la composición bioquímica del rotífero .....	118
Capítulo 2 – Mejora del cultivo larvario de moluscos bivalvos mediante la mejora de las técnicas de cultivo y nuevas especies de microalgas .....	125
<b>1. Efecto de la tasa de renovación de cultivos semicontinuos de microalgas en la supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos</b> .....	127
1.1. Justificación y diseño experimental .....	127
<b>1.2. Resultados y Discusión</b> .....	128
1.2.1. Cultivos semicontinuos de microalgas y composición bioquímica de las dietas ....	128
1.2.1.1. Densidad celular y productividad .....	128
1.2.1.2. Composición bioquímica das microalgas .....	133
1.2.2. Crecimiento larvario de moluscos bivalvos con cultivos semicontinuos de microalgas mantenidos con distintas tasas de renovación .....	150
1.2.2.1. <i>Ostrea edulis</i> .....	150
1.2.2.2. <i>Venerupis pullastra</i> .....	154
1.2.2.3. <i>Ruditapes decussatus</i> .....	158
1.2.2.4. <i>Ruditapes philipinarum</i> .....	161
1.2.2.5. Discusión general .....	165
<b>2. Efecto del uso de las especies de Cryptophyceaea <i>Rhodomonas lens</i> y <i>Chroomonas placoidea</i> en la supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos</b> .....	172
<b>2.1. Justificación y diseño experimental</b> .....	172
<b>2.2. Resultados y discusión</b> .....	173
2.2.1. Densidad celular y productividad de <i>R. lens</i> y <i>C. placoidea</i> .....	173
2.2.2. Composición bioquímica .....	175
2.2.3. Crecimiento de moluscos bivalvos con ditas mixtas .....	182
Conclusiones .....	cxcii
Resúmen .....	199
Abstract .....	209
Bibliografía .....	219
Anexos .....	261

1. Cortina-Burgueño, A., Nascimento, P., Freire I., Ación, F.G., Otero, A. 2011. Comparación del crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO en distintos modelos de fotobiorreactor. IV Foro Iberoam. Rec. Mar. Acuí.:163-170..... 263
2. Otero, A., Romero, M., Mayer, C., Muras, A., Nascimento, P., Reyero, I., 2014. *Quorum quenching*: una alternativa al uso de antibióticos en acuicultura. Foro Rec. Mar. Ac. Rías. Gal., 16, 275-284 ..... 263
3. Malpartida, I., Jerez, C.G., Morales, M.M., Nascimento, P., Freire, I., Ezequiel, J., Rico, R.M., Peralta, E., Malapascua, J.R. Florez, Y., Masojidek, J., Abdala, R., Figueroa, F.L., Navarro, E., 2014. Synergistic effect of UV radiation and nutrient limitation on *Chlorella fusca* (Chlorophyta) cultures grown in outdoor cylindrical photobioreactors. *Aquatic Biology*, 22, 141-158..... 263





## **Abreviaturas**

**ARA** – Ácido araquidónico

**EFA** – Essential fatty acid – ácido graso esencial

**EPA** – Ácido eicosapentanoico

**DHA** – ácido docosahexanoico

**DPA** – docosapentaenoico

**FCR** – “food conversion rate” – ratio de conversión de alimento

**MONO** – ácidos grasos monoinsaturados

**PUFA** – ácidos grasos poliinsaturados

**SAT** – ácidos grasos saturados

**TAG** – triacilglicerol

**TR** – tasa de renovación

**UCF** – Unidad Formadora de Colonias







## **Introducción**



## 1. Estado de la acuicultura

Durante las últimas cinco décadas la producción acuática mundial ha crecido de forma continua a un ritmo del 3,2% anual, superando el ritmo de crecimiento de la población mundial que es de 1,6%. También el consumo mundial per cápita de productos acuáticos se incrementó pasando de los 9,9 kg en 1960 a 19,2 kg en 2012 (FAO, 2014).

Conforme *El estado mundial de la Pesca y la Acuicultura* (FAO, 2014), en 2012 la producción de productos acuáticos de acuicultura alcanzó unas 90,4 millones de toneladas, incluyendo 66,6 millones de animales y 23,8 millones de plantas acuáticas, frente a las 92,5 millones de toneladas capturadas por la pesca (Figura 1).

La producción de acuicultura no dependiente de piensos alcanzó las 20,5 millones de toneladas en 2012, de las cuales 7,1 millones de toneladas de carpas y 13,4 millones de toneladas de moluscos bivalvos y otras especies. Sin embargo, la proporción no dependiente de piensos en la producción total de pescado para consumo humano disminuyó del 33,5% en 2010 hasta un 30,8% en 2012, reflejando un crecimiento relativamente fuerte en el cultivo dependiente de piensos (FAO, 2014).

El potencial de desarrollo de la acuicultura no dependiente de piensos, principalmente de los bivalvos marinos, aún no se ha explorado en África, América Latina y Caribe. Sin embargo, la capacidad limitada en la producción de semillas de moluscos es una limitación para estas regiones, habiendo necesidad de estudiar la viabilidad de creación de criaderos de moluscos para suministrar semilla a estos países (FAO, 2014).

El pico de la producción acuícola en la Unión Europea se alcanzó en 1999, registrándose un descenso acumulado del 12% hasta el año de 2012, hasta 1,27 millones de toneladas. En 2012 la acuicultura representa el 21,2% del volumen de la producción acuática total de la UE, lo que supone un incremento en su importancia relativa respecto del año del anterior, en el que fue del 20,0%. Este ascenso se debe esencialmente a una notable reducción en la pesca desembarcada por la flota pesquera de la UE ya que la acuicultura en la UE lleva estancada desde el año 2000 y no está explotando su potencial creador de riqueza y de empleo (FAO, 2014).

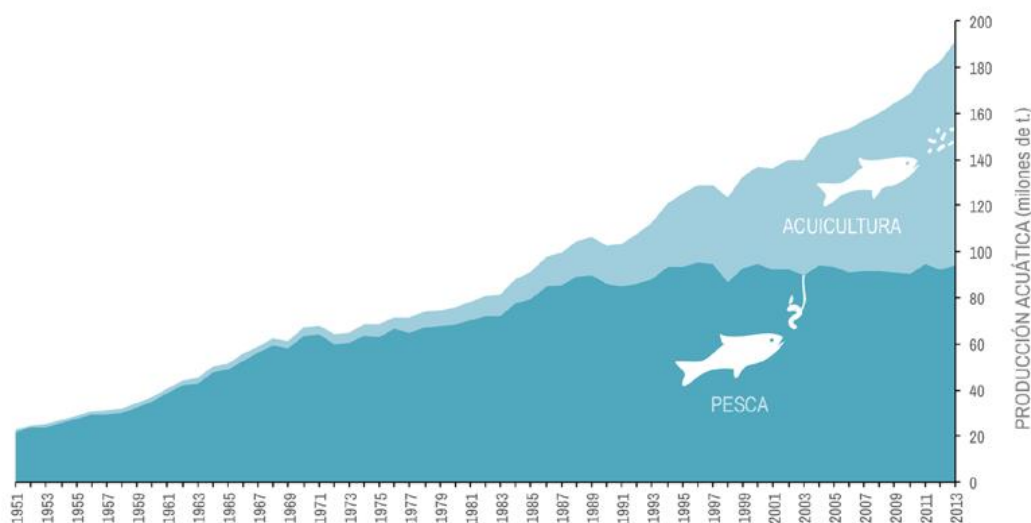


Figura 1 – Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo 1951-2013 (modificado FAO, tomado de Tomado de *La acuicultura en España*, APROMAR, 2015).

España es el país de la UE con mayor volumen de producción en acuicultura, alcanzando en 2012 las 223.709 toneladas, representando casi un 18% del total de la UE, seguida por Francia con 202.210 toneladas (15,8%) y el Reino Unido con 194.630 toneladas (15,2%). Sin embargo, cuando se considera el valor de la producción, el Reino Unido lidera la lista con 802,7 millones de euros, representando el 20% del valor total, ocupando España la quinta posición con 408 millones de euros, el 10,2% del valor total (APROMAR, 2015).

España es el mayor productor de moluscos bivalvos de la UE, suponiendo unas 164.976 toneladas de una producción total de moluscos en la UE de 573 mil toneladas en 2013 (Figura 2). Sin embargo, el valor de la producción de moluscos de acuicultura representa poco más de 100 millones, relativamente inferiores a los casi 200 y 550 millones alcanzados por Italia y Francia, respectivamente, en 2013.

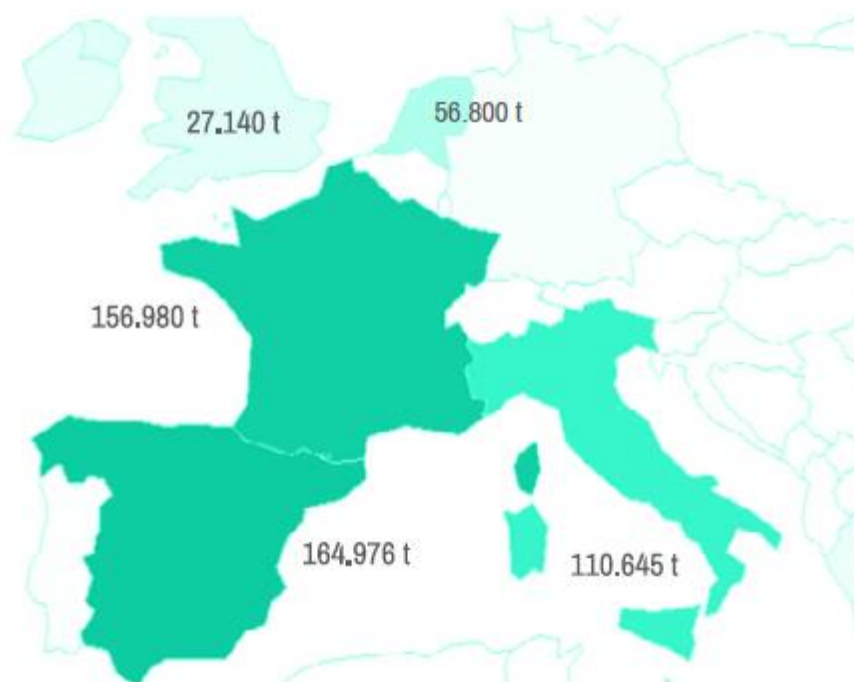


Figura 2 - Distribución de la producción anual en los principales países productores de moluscos de acuicultura en la Unión Europea en 2013 (Tomado de *La acuicultura en España*, APROMAR, 2015).

El menor valor de los productos acuícolas en España se debe al menor valor de mercado del mejillón, que representa el 81,2% de la producción acuícola nacional, con unas 188.994 toneladas y un valor en primera venta de casi 80 millones de euros. El tradicional cultivo de mejillón en las rías gallegas lidera la producción de esta especie, representando el 98% el total de esta especie producido en España. Además, representa un importante motor de desarrollo social y económico de estas zonas estrechamente vinculadas a los sectores marítimo, pesquero y acuícola (APROMAR, 2015).

En el cultivo de moluscos bivalvos en España se destaca también el cultivo de la ostra, que incluye las dos especies producidas: la ostra plana (*Ostrea edulis*) y la ostra rizada o japonesa (*Crassostrea gigas*). En 2013 la producción agregada de estas dos especies fue de 934 toneladas, correspondiendo a 3,5 millones de euros. Galicia es la principal Comunidad Autónoma productora de ostra, destacándose en 2013 con algo más de 411 y 271 toneladas de ostra plana y ostra japonesa, respectivamente. El cultivo de ostra en España es dependiente en gran medida de la importación de semilla para la siembra procedente de diversos países

vecinos, sin embargo, en 2013 se produjeron 58 millones y 368 millones unidades de semilla de ostra plana y ostra japonesa, respectivamente, en Galicia (APROMAR, 2015).

La producción de almeja, que incluye tres especies, alcanzó en España en 2013 las 1.961 toneladas y un valor económico de 13,3 millones de euros. La almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) es la principal especie de almeja cultivada en España, superando en 2013 las 1.500 toneladas, con un valor económico de 7,4 millones de euros. La almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*) son dos especies autóctonas sometidas a explotación comercial y altamente apreciadas. *R. decussatus* es la especie preferida por los consumidores y su precio de mercado puede alcanzar hasta 4 veces más que el de otras especies de almejas (Fernández *et al.*, 2000; Ojea *et al.*, 2008), produciéndose en 2013 195 toneladas que alcanzaron un valor económico en su primera venta de 3 millones de euros, seguido de la almeja babosa (*Venerupis pullastra*) con 273,5 toneladas y un valor en primera venta de aproximadamente 2,8 millones de euros (APROMAR, 2015).

Existe un consenso generalizado en cuanto a la diferencia entre el potencial de producción de las Rías Gallegas y los valores reales de producción de las almejas, cuyo cultivo puede ser considerado como un objetivo de primer orden para la mejora del sector de la acuicultura en la región (Jornadas sobre criaderos, semilleros y cultivo de almejas, A Toxa 2009). El cultivo de ambas especies está limitado por la disponibilidad de semilla natural, debiendo ser complementada con la semilla producida en criadero, siendo ésta limitación más seria en el caso de la almeja fina, debido a la mayor incidencia de elevadas mortalidades durante el proceso larvario (Ojea *et al.*, 2008).

En Galicia ambas especies autóctonas de almeja se producen de forma extensiva. La semilla es “sembrada” en áreas delimitadas en la zona intermareal, que son mantenidas libres de depredadores, residuos etc por las empresas o cofradías concesionarias, y donde las almejas se dejan crecer de forma natural hasta alcanzar la talla comercial. La semilla de las poblaciones naturales es insuficiente para mantener los niveles de producción óptimos (Matias *et al.*, 2009; Ojea *et al.*, 2008), y consecuentemente existe una elevada demanda de semilla de criadero. Sin embargo, la producción en criadero de semillas de estas dos especies es claramente insuficiente, debido a la existencia de dos problemas principales que limitan la



producción. En primer lugar la disponibilidad de alimento microalgal que limita la cantidad y talla de la semilla producida: mientras que en la fase larvaria la deficiencia es principalmente cualitativa, estando limitada la supervivencia en la fase de metamorfosis por la calidad de los cultivos microalgales utilizados y el número limitado de especies cultivadas, en la fase de pre-engorde de la semilla, la limitación es claramente cuantitativa, obligando a la siembra de semilla de tamaño menor a los 10 mm considerados como talla mínima adecuada para siembra, resultando en una peor capacidad de adaptación al medio natural y la consiguiente mortalidad. En segundo lugar, las enfermedades bacterianas, principalmente las derivadas de la presencia de *Vibrio* spp. en el agua de cultivo, que pueden causar mortalidades de hasta el 100% en las larvas.

## **2. Acuicultura de moluscos bivalvos**

### **2.1. Generalidades**

Los bivalvos son un grupo ampliamente distribuido y diversificado constituyendo la segunda mayor clase del filo Mollusca con aproximadamente 7.500 especies. Son animales exclusivamente acuáticos, pudiendo ocurrir en ambientes de salinidad diversa, desde agua salada, a agua dulce o salobre. Son filtradores y se caracterizan por su forma achatada lateralmente y por su concha compuesta de dos valvas que se articulan dorsalmente envolviendo todo el cuerpo del animal. En el interior de la concha se encuentra un tejido que protege los órganos del animal, llamado manto, que delimita la cavidad paleal, la cual comunica con el exterior por dos sifones, uno inhalante y otro exhalante. Poseen un pie utilizado para enterrarse o fijarse al substrato. Son animales simples, sin cabeza y sin rádula, reproduciéndose igualmente de forma simple, liberando generalmente los gametos en la columna de agua, donde ocurre la fecundación y se desarrollan (Gosling, 2003).

Son generalmente dioicos, con los sexos separados (ej.: almejas), pero pueden también ser hermafroditas, pudiendo ser funcional simultáneo, que ocurre cuando el animal emite simultáneamente los dos tipos de gametos (ej.: vieiras); consecutivo, cuando el animal cambia de sexo durante su vida, ocurriendo normalmente el cambio de una fase inicial masculina a una segunda fase femenina; alternativo, cuando el cambio de sexo ocurre en grandes

intervalos, no siendo posible prever para la temporada de puesta siguiente el sexo que va a tener (ej.: ostra portuguesa); o ritmo consecutivo, cuando en una misma época de puesta cambia de sexo (ej.: ostra plana).

El ciclo reproductivo ocurre desde el principio hasta al final de la producción de células sexuales (gametogénesis) terminando o no en el desove. Comprende, asimismo, dos fases: reproductivo – de la gametogénesis a la emisión de los gametos-, y vegetativo – durante el cual los gametos residuales son reabsorbidos. La gametogénesis puede ser influenciada por diversos factores como la temperatura, disponibilidad y calidad de alimento y factores endógenos como los sistemas nervioso y hormonal (Gosling, 2003).

Los moluscos bivalvos empiezan su vida como larvas trocóforas, tornándose larvas velígeras D después de 24-48h, con tamaño aproximado de 100µm, las larvas D nadan y se alimentan libremente en la presencia de un órgano llamado velum. Las larvas velígeras pasan por diferentes fases y formas a lo largo del desarrollo larvario a la vez que aumentan su tamaño: larva D, larva umbonada y larva pedivelígera (Figura 3).

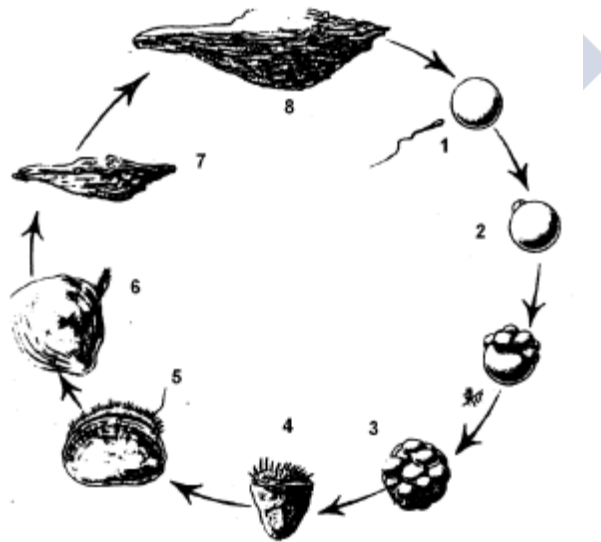


Figura 3- Ciclo reproductivo de los moluscos bivalvos: 1 – Espermatozoide y huevo; 2 – Huevo fecundado; 3 – Mórula; 4 – Larva trocófora; 5 – Larva velígera; 6 – Larva pedivelígera; 7- Juvenil; 8 – Adulto.

## 2.2. Producción de moluscos bivalvos en criadero

La producción de moluscos bivalvos en acuicultura ha crecido de forma progresiva en los últimos cuarenta años, siendo actualmente la responsable por la mayoría de la producción de moluscos bivalvos. Loosanoff y Davis (1963) y Walne (1966) desarrollaron métodos que potenciaban las condiciones naturales, determinando los parámetros óptimos que favorecían el éxito del cultivo. Sus resultados permitieron aplicar la tecnología al cultivo de especies de interés comercial y pasar de una escala experimental a un nivel industrial de producción en criaderos.

Desde entonces se ha avanzado en el conocimiento que posibilita el éxito en los cultivos, sin embargo los criaderos de bivalvos se han cruzado con una serie de nuevos problemas de naturaleza patológica, ecofisiológica y genética, entre otras. Estos problemas provocan un cuello de botella que hay que resolver. Hoy en día, los criaderos de moluscos intentan producir abundante semilla de las especies de relevancia comercial, lo que va a suponer una garantía de suministro en cantidad y calidad que permita al cultivador una correcta planificación de sus ciclos de producción.

Las condiciones biológicas necesarias para el funcionamiento del criadero de moluscos bivalvos incluyen:

- Disponibilidad constante de reproductores en excelentes condiciones físicas para la obtención de larvas de calidad, debiendo los progenitores presentar elevadas concentraciones de glucógeno y lípidos para la producción de gametos;
- Proporcionar cantidades suficientes de microalgas con elevado valor nutricional;
- Disponer de agua de óptima calidad para larvicultura, esto es, que favorezca el crecimiento y el desarrollo normal de las especies cultivadas cuando otros factores bióticos y abióticos están en sus niveles óptimos.

El ciclo de la producción de moluscos bivalvos comprende varias fases, empezando con la selección y acondicionamiento de los reproductores, inducción del desove, crecimiento larvario, fijación y aclimatación y cultivo pos-larvario.

### 2.2.1. Acondicionamiento de reproductores e inducción del desove

El acondicionamiento es un conjunto de técnicas que permite conseguir la maduración sexual fuera del período y ambiente natural, que consiste en mantener los individuos adultos a una temperatura aproximadamente de 20 °C (de acuerdo con la especie) con suministro de alimento en cantidad y calidad óptimas. El acondicionamiento puede realizarse en sistema abierto o cerrado y es más eficaz en individuos de regiones más frías. El estado inicial de los reproductores determina la calidad de la reproducción, de acuerdo con el período de acondicionamiento (2-10 semanas) y el estado inicial de las gónadas (Helm *et al.*, 2004).

La emisión de los gametos ocurre tras el período de acondicionamiento. Pueden ser aplicados varios estímulos para inducir el desove (emisión de los gametos), siendo más eficientes los más naturales, que minimizan el estrés. La metodología más utilizada es la estimulación térmica que es también la más efectiva, que consiste generalmente en un incremento de la temperatura en 5-10°C. El estímulo hormonal, con serotonina u otros químicos para el desove son menos efectivos y raras veces benéficos. Los huevos liberados tras la estimulación hormonal son menos viables que los huevos estimulados térmicamente. No obstante, es importante resaltar que la efectividad de estas técnicas está relacionada con el grado de madurez sexual de los reproductores de manera que son inoperantes en individuos sexualmente inmaduros. Asimismo, es necesario que los gametos, tras su liberación, presenten las características estructurales y fisiológicas que les permitan ser aptos para la fecundación, como el estado de maduración de los ovocitos y movilidad de los espermatozoides.

En los bivalvos monoicos, el desove es más complejo ya que el objetivo es minimizar la fecundación de los huevos con el esperma del mismo individuo. Tras liberación de los gametos ocurre la fecundación, externa, variando el número de espermatozoides por huevo dependiendo de la especie, generalmente entre 5 y 10 espermatozoides por huevo (Helm *et al.*, 2004).

### 2.2.2. Cultivo larvario, metamorfosis y cultivo post-larvario

Muchos son los estudios acerca de la biología larvaria en bivalvos, especialmente en lo que se refiere a la alimentación y crecimiento desde los trabajos históricos de Loosanoff y Davis (1963) y de Walne (1966). La mayor parte de la información fue recopilada por otros autores, proporcionando información sobre diferentes aspectos ecofisiológicos como el crecimiento, respiración, ingestión y digestión de alimento (Bayne, 1983; Gabbott, 1983) y aspectos bioquímicos, como metabolismo energético, enzimas y ácidos grasos, del desarrollo larvario en diferentes especies de bivalvos (Lucas, 1976, 1983).

Se ha constatado que las altas mortalidades ocurren principalmente en los estadios prezigótico, larvario y postlarvario, de ahí la necesidad y la importancia en el control del desarrollo en estos estadios. Los problemas en estos estadios están fundamentalmente relacionados con la nutrición. Es importante controlar no solo la cantidad sino también la calidad del alimento suministrado. Asociado a la mala calidad de los cultivos microalgales, hay que considerar también como factor importante para los cultivos larvarios la proliferación bacteriana que causa grandes mortandades.

El cultivo larvario se inicia después de la incubación, con las larvas velíferas D. El crecimiento y calidad larvarios están influenciados por la calidad del agua, cantidad y calidad del alimento, temperatura y salinidad. Al final de 2-3 semanas, dependiendo de la especie y dependiendo de las condiciones de cultivo, las larvas desarrollan un pie musculoso, iniciando así la vida bentónica. Se observa la reducción del velo, que les ha servido para nadar y filtrar alimento y comienzan a desarrollar las branquias, pasando así al estado de postlarva, entrando las larvas en la fase de fijación y metamorfosis.

Tras la metamorfosis, las larvas miden entre 0,3 a 2 mm y son cultivadas hasta alcanzar la talla de siembra en el substrato (máximo de 20 mm, dependiendo de la especie), empezando el engorde que finaliza en cuanto el bivalvo alcanza la talla comercial

### 2.3. Requerimientos nutritivos de las larvas de bivalvos

Tal como ya se ha referido anteriormente, la nutrición constituye el factor dominante que influencia el crecimiento larvario, justificando la variabilidad observada en el crecimiento, de forma más importante que la temperatura o salinidad (His *et al.*, 1989). Por su importancia en la producción larvaria, la nutrición ha sido estudiada de forma intensiva durante las últimas décadas (Loosanoff y Davis, 1963; Webb y Chu, 1981; Delaunay *et al.*, 1993; Martínez-Fernández *et al.*, 2006). La mayoría de las reservas almacenadas durante la gametogénesis son utilizadas durante la embriogénesis (Gallager y Mann, 1986; Whyte *et al.*, 1990), así que existe una exigencia elevada de fuentes exógenas de nutrientes durante el crecimiento larvario hasta la fijación (Pernet *et al.*, 2003).

El valor nutritivo de la dieta está determinado principalmente por la composición bioquímica: lípidos, carbohidratos y proteína. Los lípidos, principalmente los neutros en forma de triacilglicerol (TAG), han sido identificados como la principal fuente de energía para las larvas de bivalvos en ensayos de privación de alimento, representando aproximadamente mitad de la energía, seguido de las proteínas (30-40%), con una contribución energética reducida de los carbohidratos (<10%) (Millar y Scott, 1967; Holland y Spencer, 1973; Gallager *et al.*, 1986; Whyte *et al.*, 1992).

Se ha asignado un papel preponderante al contenido lipídico de la dieta en el desarrollo larvario de moluscos bivalvos, pudiendo constituir los ácidos grasos esenciales (EFAs), particularmente los ácidos grasos omega-3 como el eicosapentanoico (20:5n3, EPA) y el ácido docosahexanoico (22:6n3, DHA) un factor limitante. Estos ácidos grasos son los más importantes en el crecimiento y desarrollo de moluscos bivalvos (Langdon y Waldock, 1981; Webb y Chu, 1981) por ser los mayores componentes de las membranas (Dunstan *et al.*, 1994; Hendriks *et al.*, 2003) y posibles moduladores de su función (Palacios *et al.*, 2005). La carencia de estos dos ácidos grasos en una dieta rica en lípidos llevó a un menor crecimiento en las larvas de *Argopecten purpuratus* (Nevejean *et al.*, 2003b) y *Pecten maximus* (Delaunay *et al.*, 1993). En este sentido, el incremento del contenido de DHA en *Thalassiosira pseudonana* de un 1,1 hasta al 3,1% resultó en un incremento del crecimiento larvario de *C. gigas* (Thompson y Harrison, 1992), y Marshal *et al.* (2010), en su trabajo de revisión, sugiere

como dosis diaria de los ácidos grasos EPA y DHA, 2270 y 533  $\mu\text{g}\cdot\text{lava}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , respectivamente, para *C. gigas*.

Por otro lado, los ácidos grasos omega-6 como el docosapentaenoico (22:5n6, DPA) y el ácido araquidónico (20:4n6, ARA) han sido identificados como potencialmente importantes en el crecimiento larvario, principalmente en los estadios de larva velígera, cuando estos ácidos grasos son acumulados (Pernet *et al.*, 2005) y postlarvario (Milke *et al.*, 2008), en el bivalvo *Placopecten magellanicus*. La capacidad de síntesis de los EFAs en los bivalvos es muy limitada e inadecuada para satisfacer sus requerimientos nutricionales, por lo que deberán ser suministrados exógenamente (Waldock y Holland, 1984; Laing *et al.*, 1990; Chu y Greaves, 1991).

Las proteínas son un componente bioquímico raramente discutido en relación al crecimiento larvario, sin embargo, las dietas con elevado contenido proteico están asociadas al incremento del crecimiento y supervivencia larvario, en *C. gigas* y *A. purpuratus* (Utting 1986; Uriarte *et al.*, 2004). Las proteínas aparentemente desempeñan un papel importante en los estadios larvarios tardíos y en la metamorfosis, ya que la mayor contribución de energía por las proteínas se produce durante la fijación en *O. edulis* (Rodríguez *et al.*, 1990) y *C. gigas* (Barlett 1979).

El papel de los carbohidratos en el desarrollo larvario está poco estudiado y no están definidos los requerimientos exactos de su contenido en las dietas de las diferentes especies, sin embargo, cuando están presentes entre 5 y 30% del peso de la dieta, se producen buenos índices de crecimiento larvario. Los carbohidratos parecen asumir un papel importante en el equilibrio energético, proporcionando un mayor equilibrio en el uso de los lípidos y proteína (Whyte *et al.*, 1981).

#### 2.4. Patologías en moluscos

Uno de los principales problemas en la acuicultura de moluscos son los episodios repetitivos de mortalidad, que reducen seriamente la producción. Estas enfermedades afectan a etapas larvarias y post-larvarias en los criaderos, así como a juveniles y adultos cultivados



en el medio ambiente natural. En la mayoría de los casos, los estudios han demostrado que los problemas son causados por patologías bacterianas, siendo los principales agentes etiológicos miembros del género *Vibrio* (*V. corallilyticus*, *V. neptunius*, *V. pectenecida*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. ostreicida*), que son responsables por las mortandades masivas que implican la pérdida completa del stock de producción, con graves consecuencias económicas (Tubiash *et al.* 1970; Hada *et al.* 1984; Lambert *et al.* 1998; Nicolas *et al.* 2004; Paillard *et al.*, 2004; Prado *et al.* 2005, 2014b; Garnier *et al.* 2007; Elston *et al.* 2008; Kesarcodi-Watson *et al.* 2009; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010).

Las condiciones óptimas para el cultivo de bivalvos también favorecen el crecimiento de bacterias y la acumulación de sus metabolitos (Murchelano *et al.*, 1975; Prieur y Carval, 1979; Brown y Tettelbach, 1988). El proceso de la enfermedad se ve favorecido en muchas ocasiones por el aumento de la susceptibilidad de las larvas debido a factores de estrés externos, incluyendo la mala calidad del alimento. En general, los moluscos bivalvos son alimentados con microalgas provenientes de la fase estacionaria de cultivos discontinuos que acumulan una elevada carga bacteriana (Nakano 1996; Grossart *et al.* 2005), además de restos celulares y elevada carga orgánica, estando descritas como una importante fuente de patógenos en los cultivos larvarios de moluscos (Saulnier *et al.* 2009; D'Alvise *et al.* 2012; Prol-García *et al.* 2013; Dubert *et al.*, 2015). De este modo, algunos autores sugieren la necesidad de un manejo adecuado de los cultivos microalgales, incluyendo la monitorización de la diversidad bacteriana en los cultivos para prevenir la proliferación de potenciales patógenos (Nicolas *et al.*, 2004; Elston *et al.*, 2008; Dubert *et al.*, 2015).

### **3. Microalgas**

#### **3.1. Generalidades**

Las microalgas son organismos eucariotas fotosintéticos, que aprovechan la energía solar para sintetizar materia orgánica a partir de substratos inorgánicos como sales solubles, dióxido de carbono y agua. Su maquinaria fotosintética es 2 a 5 veces más eficiente que la mayor parte de las plantas superiores (Thomas *et al.*, 1984). Presentan elevadas tasas de producción, adaptándose a condiciones ambientales distintas y pueden encontrarse en cualquier medio



acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes, luz y la temperatura en los valores adecuados (Shelef y Soeder, 1980). Asimismo, las microalgas se encuentran en el medio marino o limnológico, existiendo una gran diversidad representada por miles de especies que poseen un enorme potencial como fuente de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales. Además, las microalgas se confirman como una fuente de sustancias de uso industrial o farmacológico de gran valor económico, pudiéndose extraer compuestos tales como:  $\beta$ -caroteno, astaxantina, ácidos grasos (DHA, EPA, ARA), pigmentos, flavonoides, ficobiliproteínas, polisacáridos, enzimas, tocoferol, etc. Actualmente existen numerosas aplicaciones comerciales para el empleo de microalgas, como la utilización de éstas para el enriquecimiento nutritivo de alimentos para consumo humano o piensos para animales, desempeñan un papel fundamental en la acuicultura y son incorporadas directamente o se utilizan en forma de extractos en productos cosméticos o farmacéuticos (Spolaore *et al.*, 2006).

### 3.2. Condiciones de cultivo de microalgas

La producción de microalgas fotosintéticas debe tener en cuenta varios factores como: luz, temperatura, concentración y formulación de nutrientes, pH, condiciones fisiológicas de las microalgas y concentración de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . En la producción de microalgas utilizando técnicas tradicionales es conveniente que se proporcione aireación para generar agitación y turbulencia en el cultivo, permitiendo que la exposición de las células a la luz sea más uniforme y evitando que éstas se depositen en el fondo del recipiente del cultivo, desplazando de igual modo el  $\text{O}_2$  producido por la fotosíntesis y evitando procesos de foto-oxidación.

Los factores más importantes y considerados limitantes para el crecimiento de las microalgas son la luz, temperatura, pH, salinidad y concentración de nutrientes:

- La intensidad luminosa está asociada no solo a la irradiancia incidente y a la estructura del sistema de cultivo, sino también a la concentración celular en el cultivo. Si es demasiado fuerte podrá causar foto-inhibición y, si es demasiado baja puede retrasar el crecimiento. La producción de microalgas puede ser realizada con luz constante o utilizando ciclos de luz/oscuridad. En sistemas de producción masiva han sido descritos rendimientos máximos

por hora por luz y tasas de crecimiento máximo con fotoperiodos con duración intermedia (Maseda, 2002; Fábregas *et al.*, 2004).

– La concentración celular inicial no deberá ser muy baja una vez que se puede perder el cultivo por foto-inhibición, debiendo la concentración inicial ser suficiente para un comienzo rápido de su crecimiento exponencial.

– Las temperaturas óptimas de crecimiento de las microalgas son variables dependiendo de las especies y de su origen geográfico, comprendiéndose entre los 16 y 35 °C. Especies de zonas templadas tienen temperaturas óptimas de crecimiento valores entre 16 y 21 °C, mientras que especies tropicales tienen temperaturas óptimas entre 25 y 35 °C (Renaud *et al.*, 2002).

– En relación a los nutrientes, se sabe que las microalgas necesitan macronutrientes como nitrógeno y fósforo, micronutrientes y vitaminas. Cada microalga tiene sus necesidades específicas, siendo su composición bioquímica dependiente de los nutrientes que están disponibles (Otero, 1995).

– El pH determina la disponibilidad de CO<sub>2</sub> y de los minerales en el medio de cultivo e influye directa o indirectamente en el metabolismo de las microalgas. El pH óptimo de cultivo de microalgas es variable dependiendo de la especie, y se sitúa generalmente entre 7 y 9. Éste, a su vez, puede ser afectado por diferentes factores como: cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto, temperatura, composición y capacidad tampón del medio de cultivo y actividad metabólica de las microalgas.

– Las microalgas marinas son generalmente halotolerantes adaptándose a salinidades variables. Las microalgas soportan las variaciones de salinidad a través de mecanismos de osmoregulación consistentes en la acumulación de distintos metabolitos (Ben-Amotz y Avron, 1983).

En el presente trabajo los cultivos de microalgas se han realizado en régimen semicontínuo, con el fin de obtener biomasa de composición estable y mejorada (Otero, 1995; Otero *et al.*, 2002). Las microalgas se pueden producir en tres tipos de sistemas de cultivo: discontinuo o *batch*, semicontinuo y continuo.

Los sistemas discontinuos o *batch* son sistemas cerrados y estáticos, una vez que durante el proceso no es adicionado ningún substrato ni retirado ningún producto hasta al final,

excepto CO<sub>2</sub> en algunos casos. Así, las células se multiplican hasta que alguno de los nutrientes se agote, o que algún metabolito se acumule hasta alcanzar un nivel tóxico. Durante el periodo de cultivo se observa una disminución de los nutrientes en el medio, como consecuencia del crecimiento celular.

En los sistemas continuos el sustrato es adicionado y el producto retirado de forma continua. Así, el volumen del cultivo, la concentración de nutrientes y la densidad celular se mantienen constantes una vez alcanzado el estado de equilibrio o *steady-state*. Existen dos variantes principales de sistemas de cultivo continuo: el cultivo quimistato y el turbidostato. En el sistema de quimistato el medio es introducido en el cultivo con una tasa constante. La concentración en el medio de un nutriente limitante determina la densidad celular en el cultivo, y el flujo o tasa de dilución determina la tasa de crecimiento. En los turbidostatos la densidad celular es controlada por un foto-sensor de forma que se mantenga en un nivel preestablecido y todos los nutrientes se añaden en exceso (Tempest, 1978).

El sistema semicontinuo es una variante del sistema continuo. Los sistemas semicontinuos de microalgas difieren de los sistemas continuos ya que una parte del cultivo es retirada y reemplazada por medio fresco a intervalos de tiempo circadianos. Por lo tanto, a pesar de que la producción es continua, la concentración de sustrato y microorganismos no es constante al largo del tiempo, presentando ciclos de 24 horas (Otero, 1995). El sistema semicontinuo está especialmente indicado en el caso de las microalgas sometidas a períodos circadianos de luz y oscuridad, ya que la sincronización de la división celular que se produce en estas condiciones hace no aconsejable la utilización de sistemas continuos. En este caso, si los ciclos de renovación de los cultivos semicontinuos se hacen coincidir con los ciclos circadianos, la biomasa obtenida posee las características de homogeneidad y estabilidad típicas de los cultivos continuos. Los cultivos de microalgas en régimen semicontinuo pueden mantenerse durante periodos largos de tiempo (Brown *et al.*, 1993; Otero y Fábregas, 1997) siendo además una alternativa para producir modificaciones en la composición bioquímica por el efecto de la tasa de renovación y obtener valores de productividad superiores a los sistemas de cultivo tradicionales (Otero, 1995).

Al largo de los años se ha estudiado de forma extensiva el efecto de la tasa de renovación y la concentración de nutrientes sobre la composición bioquímica de microalgas en cultivo semicontinuo, demostrándose que estas variables ejercen un importante efecto sobre el crecimiento y composición micoralgal, observándose respuestas similares a los cambios de la tasa renovación y concentración de nutrientes en los cultivos de diferentes especies de microalgas como *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella autotrophica*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Porphyridium cruentum* (Arredondo-Vega, 1995; Fábregas *et al.*, 1995a, b; 1996a, d; 1997; 1998a; Otero y Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1995; 1997a, b; 1998), entre otras.

Los tres tipos de sistema de producción pueden ser aplicados a diferentes sistemas físicos tales como bolsas de plástico, fotobiorreactores, botellones y tubos de ensayo, etc.

La composición bioquímica de las microalgas puede variar significativamente en función de las condiciones de cultivo establecidas. Como ya se ha referido, factores como la intensidad de luz, la concentración y composición de nutrientes, la temperatura, el aporte de CO<sub>2</sub>, la salinidad etc., influyen considerablemente en el crecimiento y composición de las microalgas. No obstante, el método de cultivo puede ser tan o más importante que la especie seleccionada para determinar el valor nutritivo de la biomasa (Wikfors *et al.*, 1984; Wikfors, 1986; Fábregas *et al.*, 1984, 1986). En sus trabajos pioneros, Scott (1980) y Taub (1980) sugirieron ya la importancia de los sistemas de cultivo continuo como herramienta manipuladora de la composición bioquímica de las microalgas, mostrando que se puede variar considerablemente la composición bioquímica de una sola especie microalgal, mediante la alteración de los parámetros de cultivo continuo. La productividad de los cultivos continuos de microalgas es también más alta que la obtenida con los métodos convencionales, pudiendo alcanzar rendimientos hasta 10 veces superiores.

Además, otras características hacen que los cultivos continuos sean más adecuados para la producción de microalgas:

- La tasa de crecimiento y la productividad pueden mantenerse cerca del máximo cuando las condiciones de cultivo son adecuadas, estando el cultivo microalgal en fase de crecimiento exponencial permanente, resultando en una biomasa de mayor calidad nutritiva;

- Se produce biomasa de composición controlada y calidad uniforme, siendo instrumentos óptimos para la manipulación de la composición bioquímica;
- El sistema de cultivo facilita la automatización que, además de permitir reducir los costes de mano de obra, reduce también la manipulación, evitando contaminaciones.

### 3.3. Importancia de las microalgas en la acuicultura

Las microalgas son la base de la cadena trófica en muchos procesos de acuicultura, siendo utilizadas directamente como alimento en todas las fases de crecimiento de moluscos bivalvos y gasterópodos (Brown *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 2002), e indirectamente en las fases larvianas de crustáceos y peces en criaderos de acuicultura (Reitan *et al.*, 1997; Piña *et al.*, 2006). Son igualmente importantes para el cultivo y enriquecimiento de presas vivas utilizadas en acuicultura, como rotíferos y *Artemia* (Støttrup e Jensen, 1990; Støttrup, 2003).

La composición bioquímica de las microalgas varía en función de la especie, pero en condiciones normales de producción los valores de proteína pueden alcanzar hasta un 60% de su peso seco, los lípidos entre un 7 y un 23% y los carbohidratos entre un 5 y un 23% (Becker, 2004). Sin embargo, mediante cambios en los parámetros de cultivo como la luz, concentración de nutrientes, temperatura y consecuentemente la tasa de crecimiento de las microalgas, se puede manipular de forma considerable la proporción de proteína, lípidos y carbohidratos en éstas (Otero y Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 2002; Renaud *et al.*, 2002; Fábregas *et al.*, 2004).

Las microalgas sirven de alimento directo en los cultivos de moluscos bivalvos, u otros moluscos filtradores, y en cultivos larvianos de determinados crustáceos. Las microalgas desempeñan también un importante papel en la mayor parte de los cultivos de larvas de peces marinos. Además de ser utilizadas en el crecimiento y enriquecimiento de alimento vivo para las fases larvianas, como rotífero y *Artemia*, aunque no sirvan de alimento directo para las larvas de peces, ya que estas no son filtradoras de microalgas, se ha demostrado que la introducción de microalgas en los tanques de cultivo, una práctica conocida como cultivo en “aguas verdes”, mejora la supervivencia, el crecimiento y el factor de conversión alimentario

en más de 40 especies, en comparación con cultivos en “aguas limpias” (revisado por Muller-Feuga *et al.*, 2003). Las razones de estos efectos positivos no son evidentes, sin embargo algunos autores sugieren que las microalgas ayudan a la estabilización y mejora de los parámetros del agua, incrementan el contraste de las presas con la luz incidente, pueden servir directamente de alimento (a través de agua ingerida o por retención en las branquias) o indirectamente (vía las presas enriquecidas), estimulan los procesos fisiológicos o la ingestión de presas, regulan el crecimiento bacteriano oportunista por acción antibacteriana o probiótica e incrementan la cantidad y calidad de las presas vivas (Muller-Feuga *et al.*, 2003).

A pesar de la existencia de miles de especies de microalgas, su utilización en acuicultura está limitada a un pequeño número de géneros de microalgas pertenecientes a 8 clases (Tabla 1).

Tabla 1 - Principales géneros de microalgas y cianobacterias utilizados en la acuicultura mundial (adaptado de Becker, 2004).

Bacillariophyceae	Prymnesiophyceae	Cryptophyceae	Chlorophyceae	Eustigmatophyceae	Prasinophyceae
<i>Phaeodactylum</i>					
<i>Nitzschia</i>		<i>Cryptomonas</i>	<i>Chlorella</i>		
<i>Chaetoceros</i>	<i>Isochrysis</i>	<i>Rhodomonas</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Tetraselmis</i>
<i>Skeletonema</i>	<i>Pavlova</i>	<i>Chroomonas</i>	<i>Dunaliella</i>		
<i>Thalassiosira</i>		<i>Nannochloris</i>	<i>Chlamydomonas</i>		

### 3.4. Microalgas como alimento de moluscos bivalvos

Debido a la presencia de células epiteliales ciliadas y mucosas que recubren la branquia de los moluscos bivalvos, un complejo mecanismo de corrientes y contracorrientes en la cavidad paleal, lleva las partículas seleccionadas, embebidas en moco, hasta los palpos labiales y la boca. El corto pasaje del alimento en el intestino permite a las larvas asimilar solamente la fracción citoplasmática de las células (Reinfelder y Fisher, 1994). Para facilitar esta movilización, hay que considerar ciertos factores para la selección de las especies a utilizar como alimento tales como la motilidad (Martínez-Fernandéz *et al.*, 2004), el tamaño (Baldwin, 1995; Baldwin y Newell, 1995), toxicidad (Laabir *et al.*, 2007) y la habilidad de la



larva para atrapar, ingerir, digerir y asimilar la microalga (Lora-Vilchis y Maeda Martínez, 1997).

Las microalgas constituyen todavía la única dieta adecuada para el cultivo de los moluscos bivalvos durante todo su ciclo de vida (Muller-Feuga, 2000), ya que los intentos para su sustitución por alimento artificial han sido infructuosos (Robert y Trintignac, 1997; Ponis *et al.*, 2003). La producción de microalgas todavía es considerada como el cuello de botella para el desarrollo del cultivo de moluscos en criadero debido a las bajas productividades y elevados costes de producción derivados de los sistemas de cultivo altamente ineficientes usados en la mayoría de las instalaciones de acuicultura, alcanzando un 30-40% de los costes de explotación de los criaderos (Borowitzka, 1997; Duerr *et al.*, 1998; Müller-Feuga, 2000; Wikfors y Ono, 2001, Helm y Bourne, 2004). No obstante, la producción de microalgas en las instalaciones de los criaderos de bivalvos está aún lejos del óptimo y se han introducido pocas mejoras en los sistemas de cultivo en las últimas décadas. A pesar de que en los últimos años se haya despertado algún interés en los cultivos continuos de microalgas, todavía en muchos casos la producción se hace en condiciones de cultivo impropias, generalmente en grandes bolsas de plástico, con nutrientes y luz limitantes, que conducen a productividades bajas y composición bioquímica inadecuada. Además, muchos de los criaderos siguen produciendo sus microalgas en modo *batch*, lo que hace imposible el control de las condiciones de cultivo y calidad de la biomasa microalgal producida.

La utilización de microalgas en el cultivo de moluscos bivalvos está limitada a algunas especies que son las que cumplen los requisitos nutricionales de las especies de bivalvos (Brown *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1999; Volkman *et al.*, 1989; Wikfors y Ohno, 2001; Marshall *et al.*, 2010), siendo utilizadas menos de 10 especies en todo el mundo, tal y como se recoge en el *Manual práctico de cultivo de bivalvos en criadero* de la FAO (Helm *et al.*, 2004): *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y una diatomea céntrica perteneciente a los géneros *Chaetoceros* o *Skeletonema*. Sin embargo, no todas las especies de microalgas son buenas para las diferentes especies de moluscos bivalvos, de forma que en algunos casos, la deficiente técnica de cultivo lleva a conclusiones erróneas sobre el valor nutritivo de las especies (Fábregas *et al.*, 1998). *Pavlova lutheri* a pesar de ser recomendada como sustituta de T-ISO, por su mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

(Helm *et al.*, 2004) aparentemente es incompatible para las larvas de *C. gigas* debido a su mala ingestión (Ponis *et al.*, 2003; Rico-Villa *et al.*, 2006). *Pavlova* spp. han mostrado ser de difícil ingestión para *C. gigas* (Ponis *et al.*, 2006b), reducen la tasa de crecimiento de *Meretrix meretrix* Linnaeus (Tang *et al.*, 2006), y provocan una menor acumulación de lípidos en las larvas de *O. edulis* (Ferreiro *et al.*, 1990). Sin embargo, Pernet *et al.* (2003) mediante la sustitución de *P. lutheri* por otra *Pavlova* sp., incrementó marcadamente el desarrollo larvario de *Placopecten magellanicus* Gmelin. *P. lutheri* es, sin embargo, un buen alimento, produciendo buenas tasas de crecimiento en las larvas de *Saccostrea commercialis* (Iredale y Roughley) (Nell y O'Connor, 1991) y larvas de *P. maximus* (Delaunay *et al.*, 1993; Ponis *et al.*, 2003, 2006b).

Cuando se utilizan dietas monoalgales en el cultivo de moluscos bivalvos, el crecimiento larvario y juvenil es muy variable en función de las especies de microalgas empleadas (Bayne, 1965; Waldock y Nascimento, 1979; Nascimento, 1980; Enright *et al.*, 1986a; Laing y Millican, 1986; Delaunay, 1992). Las dietas mixtas, que utilizan múltiples especies, presentan crecimientos y supervivencias más elevadas al largo del desarrollo larvario (Brown *et al.*, 1997), ya que cumplen mejor los requerimientos nutricionales de las larvas.

### 3.5. Las microalgas de la clase Cryptophyceae y su aplicación en acuicultura

A pesar de su abundancia, las criptófitas han sido poco estudiadas, especialmente en comparación con grupos más clásicos de microalgas. No obstante, las criptófitas son de gran interés biotecnológico debido a la presencia de ficobilinas, principalmente ficoeritrina, y por su contenido en ácidos grasos poliinsaturados como el 20:5n3 (EPA) y 22:6n3 (DHA), entre otros, con potencial aplicación en las industrias alimenticia y farmacéutica, además de su referenciado potencial para la acuicultura (Støttrup *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001; McKinnon *et al.*, 2003; Knuckey *et al.*, 2005; Støttrup y Veloza *et al.*, 2006).

Como ya se ha referido, son varios los factores necesarios para el crecimiento de las microalgas, siendo considerada la luz como un factor limitante. Asimismo, las microalgas necesitan, por un lado, la cantidad de luz necesaria que permita la tasa de crecimiento y por otro lado, que la intensidad no sea tan elevada que pueda provocar descenso de la tasa de



crecimiento debido a fotoinhibición (García-Sánchez *et al.*, 1996; Merchuk *et al.*, 1998). Las variaciones en la intensidad luminosa se van a reflejar principalmente en la tasa de crecimiento (Ginzburg, 1987), y consecuentemente en el contenido de pigmentos, actividad enzimática (Dionisio *et al.*, 1989a, b) y composición bioquímica general de las microalgas (Ben-Amotz y Avron, 1983; Dubinsky *et al.*, 1986; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Kitano *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 2002; Bartual *et al.*, 2002). En las microalgas pertenecientes al grupo criptófito este efecto es todavía más importante, ya que son microalgas que producen ficobilinas por lo que son muy sensibles a los cambios de intensidad luminosa, lo que se refleja en la concentración de estos pigmentos y a la utilización del nitrógeno del medio. Este sistema de pigmentos de las criptófitas les permite absorber una amplia gama de longitudes de onda y optimizar su crecimiento en longitudes de onda azules y verdes, predominantes en aguas profundas en la naturaleza. En general, las algas con más pigmentos accesorios tienen irradiancias óptimas de crecimiento más bajas y los grupos que contienen ficobilinas son los más adaptados a luz tenue (Brown y Richardson, 1968). Cuando se someten a niveles crecientes de radiación ultravioleta, se observa en las criptófitas una disminución de la motilidad y de las reservas de carbohidratos, además de un blanqueamiento de pigmentos (Plante y Arts, 2000). Algunos autores identifican una preferencia por intensidades luminosas más bajas en las microalgas de este grupo (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Bartual *et al.*, 2002; Chaloub *et al.*, 2015), de ahí se encuentran abundantemente en aguas profundas, donde las condiciones son desfavorables para la mayoría de los organismos fotosintéticos.

Similarmente a lo observado en otros grupos como las rodófitas, probablemente los pigmentos proteicos funcionan también como reservorios de nitrógeno en determinadas condiciones, movilizándolo cuando es necesario el nitrógeno de las ficobiliproteínas para permitir el crecimiento y/o mantenimiento celular, una vez que el contenido celular de ficoeritrina disminuye drásticamente ante una limitación de nitrógeno a lo largo de la fase estacionaria de crecimiento en los ensayos con criptófitas de Bartual *et al.* (2002) y Chaloub *et al.*, (2015).

Las criptófitas se caracterizan por su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Zhukova y Aizdaicher, 1995; Dunstan *et al.*, 2005), además de su contenido en proteína de elevada calidad por su composición y contenido en aminoácidos (Dunstan *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2009), estando descritas como un grupo con elevado

potencial para uso en acuicultura (Støttrup y Jensen, 1990; Støttrup *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 2001; McKinnon *et al.*, 2003; Knuckey *et al.*, 2005; Dunstan *et al.*, 2005; Veloza *et al.*, 2006), presentando un elevado valor como alimento para invertebrados debido a su completo perfil bioquímico. El valor nutricional de las criptófitas ha sido previamente demostrado en diversos animales filtradores. En el cultivo de copépodos, cuando se compara con otras microalgas de uso generalizado en acuicultura, *Isochrysis* spp., las microalgas del género *Rhodomonas* generan una alta eficiencia de producción de huevo y tasa de crecimiento naupliar además de conducir a más altas concentraciones de los ácidos grasos 18:3n3, 18:4n3, EPA y DHA (Støttrup *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001; McKinnon *et al.*, 2003; Veloza *et al.*, 2006; Knuckey *et al.*, 2005; Milione y Zeng, 2007; Zhang *et al.*, 2013), indicando una transferencia eficiente de los nutrientes esenciales en la cadena fitoplancton-zooplancton en estos ensayos. Se ha descrito un efecto similar en *Artemia*, al incrementar su tasa de crecimiento cuando son alimentadas con las criptófitas, además de mejorar el perfil bioquímico de las mismas (Thinh *et al.*, 1999; Seixas *et al.*, 2008; 2009). Otros autores han registrado buenos resultados en el cultivo de rotíferos del género *Synchaeta* cultivados con las criptófitas *Cryptomonas* spp., *Rhodomonas* spp. (Stemberger, 1981; Oltra *et al.*, 2000) así como en *Brachionus plicatilis* cultivado con *Rhodomonas salina* (Guevara *et al.*, 2011). Además presentaron excelentes resultados en el cultivo de gasterópodos (Aldana-Aranda y Patiño-Suarez, 1998) y en larvas y juveniles de diferentes especies de bivalvos (Ferreiro *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; McCausland *et al.*, 1999; Leonardos y Lucas, 2000; Milione and Zeng, 2007; Tremblay *et al.*, 2007; Gagné *et al.*, 2010; Nascimento, 2010) (Tabla 2). Sin embargo, su utilización en acuicultura está todavía limitado debido a la dificultad de cultivo de las especies de este grupo (Renaud *et al.*, 1999; Knuckey *et al.*, 2005), no obstante algunos autores han demostrado recientemente que es posible mantener cultivos concentrados de *Rhodomonas lens* con elevadas productividades en sistema continuo (Coutinho, 2008; Seixas *et al.*, 2008; 2009; Freire, 2015).

Tabla 2 - Resumen de algunos trabajos en que se utilizaron especies del grupo Cryptophyceae en la alimentación de animales filtradores.

Autor	Especies de Cryptophyceae	Condiciones de cultivo microalgas	Animales filtradores probados	Resultados
Stemberger, 1981	<i>Cryptomonas erosa</i> var. <i>reflexa</i> <i>Cryptomonas ozolinu</i> <i>Cryptomonas ovata</i> <i>Cryptominas</i> sp.	Batch, medio WC, luz:oscuridad 14:10h (4300 lx)	<i>Asplanchna priodonta</i> <i>A. Herricki</i> <i>Polyarthra major</i> <i>Synchaeta pectinata</i>	Resultados positivos en el crecimiento y reproducción de los rotíferos.
Enright et al., 1986	<i>Rhodomonas</i> sp.	Batch, medio f/2; Luz continua (300 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ m)	Larvas <i>Ostrea edulis</i>	Demostró ser un óptimo alimento para juveniles de ostra.
Laing y Millican, 1986	<i>Rhodomonas salina</i> (3C)	Semicontinuo o continuo, medio Erdschreiber	Juveniles <i>Ostrea edulis</i>	Mayor valor nutritivo para la dieta monoalgal <i>Rhodomonas salina</i> .
Jonasdóttir, 1994	<i>Rhodomonas lens</i>	Batch, medio f/2; luz:oscuridad 14:10h	<i>Acartia hudsonica</i>	Constituye un importante alimento para <i>Acartia</i> sp.
Avila et al., 1997	<i>Rhodomonas salina</i> (3C; CCMP 1319)	Cultivadas según el metodo de Guillard (1975)	<i>Hermisenda crassicornis</i>	Mayor crecimiento y larvas más saludables para la metamorfosis com la dieta mixta: <i>Isochrysis galbana</i> y <i>R. salina</i> (1:1).
Brown et al., 1998	<i>Rhodomonas salina</i>	Semicontinuo (20-40% cada dos días), medio fE, luz:oscuridad 12:12h(100 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Larvas de <i>Crassostrea gigas</i>	Dieta monoalgal produjo elevada tasa de crecimiento.
McCausland et al., 1999	<i>Rhodomonas salina</i> (CS-24)	Semicontinuo (20-40% - cada 2 días), medio fE, luz continua (50-75 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Juveniles <i>Crassostrea gigas</i>	Suplemento más efectivo en dietas de juveniles <i>C. gigas</i> .
Thinh et al. 1999	<i>Cryptomonas</i> CRFI01	Batch, medio f; 80–100 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .	<i>Artemia salina</i>	Promovió mayor tasas de crecimiento en <i>Artemia</i> . Mayor contenido de EPA, DPA y ratio EPA:DPA.

## Introducción

Leonardos y Lucas, 2000	<i>Rhinomonas reticulata</i>	Continuo, medio f/2, luz:oscuridad 14:10h, dos intensidades: 890– $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL) y 275–337 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Larvas <i>Mytilus edulis</i>	Elevado valor nutricional debido a su contenido proteico, carbohidratos y PUFAs.
Oltra <i>et al.</i> , 2000	<i>Cryptomonas</i> sp. <i>Rhodomonas salina</i> <i>R. baltica</i>	Semicontinuo, medio f/2, luz:oscuridad de 12:12h, 80 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$	<i>Synchaeta cecidia valentina</i>	Resultados equiparables a los obtenidos con <i>Tetraselmis</i> sp.
Tang <i>et al.</i> , 2001	<i>Rhodomonas salina</i>	Batch, medio L, luz:oscuridad de 12:12h (60-100 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	<i>Acartia tonsa</i>	<i>R. salina</i> presentó el mayor valor nutritivo.
McKinnon <i>et al.</i> , 2003	<i>Rhodomonas</i> sp. (NT-15)	Medio f	<i>Bestiolina similis</i> <i>Parvocalanus crassirostris</i>	<i>Rhodomonas</i> sp. incrementó la producción de huevos en los copépodos.
Dunstan <i>et al.</i> , 2005	<i>R. salina</i> (CS-24) <i>R. maculata</i> <i>C. placoidea</i>	Semicontinuo (10-20%), medio fE, luz:oscuridad 12:12h (70–100 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Juveniles <i>Crassostrea gigas</i>	<i>Rhodomonas salina</i> (elevado contenido de 22:6n 3) produjo mayor tasas de crecimiento que <i>R. maculata</i> y <i>C. placoidea</i> .
Knuckey <i>et al.</i> , 2005	<i>Cryptomonad</i> sp. (CS-412) <i>Rhodomonas</i> sp. (NT-15)	<i>Rhodomonas</i> sp.: semicontinuo (30% cada 3 días); <i>Cryptomonad</i> sp.: batch; medio f; luz:oscuridad 14:10h (120 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	<i>Acartia sinjiensis</i>	<i>Rhodomonas</i> sp. confirmada como excelente alimento para <i>Acartia</i> . <i>Cryptomonad</i> sp. (CS-412) tasas de crecimiento similares a <i>Rhodomonas</i> .
Veloza <i>et al.</i> , 2006	<i>Rhodomonas salina</i> (CCMP 1319)	Sistema semicontinuo (renovaciones no diarias), medio f/2, luz:oscuridad 12:12h	<i>Acartia tonsa</i>	Mayor contenido de DHA. Utilizada como microalga con elevado valor nutricional.

Milione y Zeng, 2007	<i>Rhodomonas maculata</i> (CS-85)	Medio f, com ciclo de luz:oscuridad 12:12h	<i>Acartia sinjiensis</i>	Promueve la producción de huevos, supervivencia y crecimiento de nauplios pero menos eficaz para copepoditos y adultos.
Tremblay <i>et al.</i> , 2007	<i>Rhodomonas salina</i>	Continuo, medio Conway, luz continua	<i>Pecten maximus</i>	Adición de <i>R. salina</i> a la dieta incrementó el crecimiento larvario y tasa de metamorfosis en vieira. Adición de <i>R. salina</i> a la dieta mejoró el estado general de las larvas con un aumento de la materia orgánica y lípidos.
Coutinho, 2008	<i>Rhodomonas lens</i> (CCMP739)	Semicontinuo (TR30%), Algal (8mM), luz:oscuridad 12:12h (80 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	<i>Brachionus plicatilis</i>	Mejor evolucion del cultivo alimentado con <i>R. lens</i> en comparación con T-ISO.
Seixas <i>et al.</i> 2009	<i>Rhodomonas lens</i> (CCMP739)	Semicontinuo (30%), medio ALGAL (4mM); luz:oscuridad 12:12h (197 + 166 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	<i>Artemia</i> sp.	Demostrada excelente alimento para optimizar el crecimiento de <i>Artemia</i> , así como mejorar su composición bioquímica.
Dahl <i>et al.</i> , 2009	<i>Rhodomonas salina</i>	Semicontinuo (TR30% -2 días), medio f/2, luz continua, 30 $\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$	<i>Nitocra spinipes</i>	Mayor tasa de supervivencia y éxito reproductivo en los copépodos.
Gagné <i>et al.</i> , 2010	<i>Rhodomonas salina</i>	Semicontinuo (TR40%), medio f/2, luz continua	<i>Pecten maximus larvae</i>	Inclusión de <i>R. salina</i> en la dieta resultó en crecimiento más rapido de <i>P. maximus</i> . Elevado contenido de brassicasterol.

## Introducción

Nascimento, 2010	<i>Rhodomonas lens</i> (CCMP739)	Semicontinuo (TR30% -2-3días), medio ALGAL (4mM), luz continua	<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>R. lens</i> (25% del peso de la dieta) incrementó la supervivencia y crecimiento larvario de <i>R. philippinarum</i>
Zhang <i>et al.</i> , 2013	<i>Rhodomonas baltica</i> <i>Rhinimonas reticulata</i> var. <i>reticulata</i> (CCAP 995/2)	Medio f/2, luz:oscuridad 14:10h	<i>Arcatia tonsa</i>	Promovieron la mayor producción de huevos y éxitode huevos eclosionados después de 15 días.
Fernández-Reiriz <i>et al.</i> , 2015	<i>Rhodomonas lens</i> (CCMP739)	Batch, fertilizante industrial.	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mayor ingestión y absorción de las proteínas con <i>R. lens</i> frente a <i>T. suecica</i> y T- ISO.
Freire 2015	<i>Rhodomonas lens</i> (CCMP739)	Sistema semicontinuo (TR40%), medio Algal (8mM), ciclo de luz:oscuridad 12:12h (242 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	<i>Brachionus plicatilis</i>	Mayor crecimiento y mayor contenido de proteína y ácidos poliinsaturados en los enriquecidos con <i>R. lens</i> de la tasa de renovación del 40 %.



## **Objetivos**





### **Objetivo general**

Mejora de cultivos larvarios de moluscos bivalvos a través de la mejora de la composición bioquímica de la dieta mediante:

- la manipulación de técnicas de cultivo de las microalgas
- la introducción de especies de criptófitas en la dieta.

### **Objetivos particulares**

Evaluación del crecimiento, productividad y composición bioquímica de diferentes especies de criptófitas en sistema de cultivo *batch* y semicontinuo.

Evaluación del efecto de diferentes intensidades de luz en el crecimiento, productividad y composición bioquímica de las especies *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea* en sistema de cultivo *batch* y semicontinuo.

Evaluación del efecto de las criptófitas *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea* en el crecimiento y composición bioquímica de *Brachionus plicatilis*.

Evaluación del efecto de la tasa de renovación en la composición bioquímica de la dieta y su efecto en el crecimiento y supervivencia de larvas de moluscos bivalvos.

Evaluación de la introducción de las criptófitas *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea* en el crecimiento y supervivencia de larvas de moluscos bivalvos.





## **Materiales y Métodos**



## 1. Descripción de las especies

### 1.1. Criptófitas

Las criptófitas son un pequeño grupo Chromista con 152 especies. La única clase del filo, *Cryptophyceae* se divide en 3 Ordenes Cryptomonadales, Pyrenomonadales y Tetragonidiaceae. Las criptófitas son células eucariotas unicelulares desnudas, con dos flagelos casi iguales con una morfología oval y aplanada. Pueden aparecer estados palmeloides o cocoides. Habitan tanto en aguas dulces como marinas y su tamaño celular varía entre 10-50  $\mu\text{m}$ . Algunas especies forman zooxantelas viviendo como simbióticas de animales. Presentan uno o dos plastos con o sin pirenoides. Los cloroplastos presentan tilacoides agrupados en pares, sin lamela ceñidora. Además de clorofila a y c presentan  $\alpha$ -caroteno y xantofilas siendo dominante la aloxantina, sin embargo falta el  $\beta$ -caroteno. Poseen pigmentos ficobilínicos (ficocianina y ficoeritrina), pero no se presentan en los ficobilisomas, sino en el espacio intratilacoidal, por lo que se ha postulado su origen en la simbiosis con cianofíceas. Utilizan como material de reserva almidón extraplastidial asociado con los plastos y el núcleo. Los flagelos salen de un reservorio tapizado por tricocistes, ambos son pleuronemáticos. Puede haber una pared celular de celulosa y presentan un periplasto de tres capas aunque también pueden presentar placas poligonales externas. La reproducción es por bipartición, mediante zoosporas y cistes. Presentan un núcleo extra (nucleomorfo) como residuo de la endosimbiosis secundaria que les ha dado origen siendo la característica principal que los distingue.

La mayoría son fotosintéticas y poseen plastídios con pigmentación diversa, pudiendo ser heterotróficas o mixotróficas. Las criptófitas adquirieron fotosíntesis a través de una endosimbiosis secundaria después de haber asimilado un endosimbionte de algas rojas (Archibald y Keeling 2002). Como resultado, las criptófitas son extremadamente complejas genética y biológicamente; su plastidio tiene cuatro membranas y contienen cuatro compartimentos celulares con diferente DNA (plastidio, mitocondria, núcleo y nucleomorfo) (Archibald, 2007).

Las criptófitas son de especial interés debido una vez que contienen tanto clorofilas *a* y *c* y ficobiliproteínas, una vez que es poco usual coexistieren dos sistemas fotosintéticos, un soluble (ficobiliproteínas) y un insoluble (Chl *a/c2*).

Su pigmentación puede regularse a través de la luz, obteniéndose concentraciones superiores de ficoeritrina con exposición a baja luz (Chaulob *et al.*, 2015). Las criptófitas están particularmente adaptadas a bajas temperaturas, bajas intensidades luminosas y bajas concentraciones salinas (Chaulob *et al.*, 2015).

Las especies de la colección del Grupo de Biotecnología y Acuicultura o de la USC pertenecen a la orden Pyrenomonadales y se distribuyen por dos familias diferentes. En este trabajo se trabajó con las cuatro especies, *Rhinomonas reticulata* var. *reticulata* (CCAP 995/2), *Rhodomonas salina* (RCC 1506) y *Rhodomonas lens* (CCMP 739) pertenecientes a la familia Pyrenomonadaceae y *Chroomonas placoidea* (CCAP 978/8) pertenece a la familia Chroomonadaceae.

### 1.1.1. Género *Rhinomonas*

Son células de tamaño reducido (6-10  $\mu\text{m}$ ), nadadoras biflageladas y generalmente ovoides con *rhinote* anterior; cloroplasto, pirenoide y nucleomorfo únicos. Tienen un cloroplasto con ficobiliproteína Cr-ficoeritrina 545 y un periplasto con placas interna y externa más o menos hexagonales. La reproducción se realiza por división celular simple. No se forman colonias palmeloides. Las placas superficiales del periplasto se componen de pequeños bastoncillos similares a las subunidades en un arreglo cristalino y tienen bordes visibles. Estructura “raphe-like” presente en la parte posterior de la célula. El nucleomorfo está localizado en una invaginación pirenoidal y la matriz pirenoidal nos es atravesada por tilacoides. Las *Rhinomonas* apenas fueron encontradas en aguas marinas. Aparentemente es un género poco común especies poco conocidas de dos colecciones en Inglaterra y sudeste de Australia, y hay informes de otras tres especies en Inglaterra y Japón ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)).

*Rhinomonas reticulata* var. *Reticulata* (CCAP 995/2):

*R. reticulata* presenta un elevado valor nutritivo debido a su alto contenido proteico (15,9–21,8 pg.célula<sup>-1</sup>) y de ácidos grasos poliinsaturados (70%), principalmente el 18:3n3

(12-17%) y el EPA podría representar hasta un 20 % del total de ácidos grasos cuando es cultivada en sistema continuo (Leonardos y Lucas, 2000). Fue demostrada como un buen alimento para *Mytilus edulis* (Leonardos y Lucas, 2000), siendo utilizada como alimento en semillas y juveniles de *Pecten maximus* (Laing y Psimopoulos, 1998) y en especies del género *Acartia* (Zhang *et al.*, 2014).

La cepa de *R. reticulata* utilizada en este trabajo procede de la colección “The Culture Centre of Algae and Protozoa”, Cambridge, Inglaterra (CCAP).

### 1.1.2. Género *Rhodomonas*

Las microalgas de este género son generalmente ovoides y biflageladas y, usualmente, con un cloroplasto, pirenoide y nucleomorfo, pero en algunas especies estos se dividen poco después de la división celular de modo que hay dos cloroplastos, dos pirenoides y dos nucleomorfos para la mayor parte del ciclo celular. El cloroplasto contiene la ficobiliproteína Cr-ficoeritrina 545 y su color varía desde rojo-marrón hasta amarillo y, a veces, las células viejas adquieren un color verde. El periplasto tiene una capa interna y externa de material fibrilar envolviendo la membrana plasmática. Reproducción por división celular simple. Se forman con frecuencia colonias palmeloides donde suele ocurrir la división celular. Las placas internas del periplasto son más o menos de forma rectangular con firme adhesión a la membrana plasmática a lo largo de sus márgenes posteriores y están organizadas en filas longitudinales de desplazamiento. El nucleomorfo se encuentra en una invaginación del compartimento periplastidial en el pirenoide y la matriz del pirenoide no está atravesada por tilacoides. Es cosmopolita y común, aunque raramente abundante en aguas marinas y salobres y son conocidos dos especies de agua dulce en Europa. ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org))

#### *Rhodomonas salina* (RCC 1506)

*Rhodomonas salina* (Wislouch) Hill & Wetherbee (1989) es la criptófita más utilizada en acuicultura debido, principalmente, a su alto contenido de proteínas (53-63%), lípidos (23-28%) y ácidos grasos poliinsaturados (65-75%) (McCausland *et al.* 1999; Dunstan *et al.* 2005; Tremblay *et al.*, 2007).

### *Rhodomonas lens*

Esta microalga es de elevado interés para acuicultura pues presenta elevados contenidos proteicos (50-60%) y de PUFAs (61,4%) de los cuales ácidos grasos n-3: 18:3n3 (26,4%), 18:4n3 (18,3%), 20:5n3 (8,4%) y 22:6n3 (6,9%) (Seixas *et al.* 2008; 2009).

#### 1.1.3. Género *Chroomonas*

Las microalgas del genero *Chroomonas* son nadadoras, de forma elíptica, biflageladas y forman colonias espesas mucilaginosas palmeloides. Tienen un cloroplasto único, pirenoide y nucleomorfo. El cloroplasto contiene la ficobiliproteína Cr-ficocianina 645 (y, raramente, Cr-ficocianina 630), cuyo color puede variar de azul celeste al azul-verde y verde. Con o sin mancha ocular. Periplasto con placas interna y superficial que intercalan con la membrana plasmática. La reproducción es por división celular simple en el estado palmeloide. Las placas internas del periplasto son rectangulares y tienen sitios de unión a la membrana plasmática fuertes a lo largo de sus bordes posteriores. Las placas superficiales del periplasto son también rectangulares y compuestas por pequeñas subunidades en un arreglo cristalino y rodeado de bordes fibrilares. El nucleomorfo no está asociado con el pirenoide. La matriz del pirenoide es atravesada por uno o dos tilacoids. La mancha ocular está situada en un lóbulo mediano del cloroplasto y tiene un sistema vacuolar asociado. El género *Chroomonas* tiene distribución cosmopolita en hábitats marinos y de agua dulce, en todos los continentes. (www.algaebase.org)

### *Chroomonas placoidea*

Muy pocos trabajos fueron realizados con la microalga *Chroomonas placoidea*.

Esta criptófita se caracterizó por bajo contenido del ácido docosahexaenoico 22:6n3 (<0,5% total de ácidos grasos) y significativa proporción del ácido 22:5n6 (4,5%), y la presencia de 24-ethylcholesta-5,22E-dien-3b-ol (35% del total de esteroides) y 64% de contenido proteico (Dunstan *et al.*, 2005).



#### 1.1.4. Obtención de las especies de criptófitas

A través del proyecto Assemble Marine el Grupo de Biotecnología y Acuicultura de la USC adquirió 11 especies de microalgas de la clase *Cryptophyceae* de las colecciones de Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) y Roscoff Culture Collection (RCC) (Tabla 3).

Las cepas adquiridas llegaron muy diluidas y estresadas presentando un color verde pálido, posiblemente por carencia de nutrientes. Las microalgas se pasaron a tubos de 15mL de vidrio a los cuales se adicionó agua de mar estéril y medio de cultivo (como descrito en Materiales y Métodos) ajustándose a 8 mg átomo N/l. De las 11 especies adquiridas solamente sobrevivieron 3 (Figura 4).

Las 3 especies supervivientes *Chroomonas placoidea* (CCAP978/8), *Rhinomonas reticulata* (CCAP 995/2) y *Rhodomonas salina* (RCC 1506) se subieron a matraces Erlenmeyer de 250 mL y quincenalmente se repasaban a nuevo medio de cultivo con nutrientes aplicándose una dilución de aproximadamente 66%, que servirían de pre-inoculo para los ensayos.

La criptófita *Rhodomonas lens* (CCMP 739), previamente adquirida por el Grupo de Biotecnología y Acuicultura de la USC a la colección de National Centre for Marine Algae and Microbiota (NCMA, previamente CCMP), se mantuvo en iguales condiciones de cultivo en los matraces de Erlenmeyer de 250 mL, que servirían de pre-inoculo a los ensayos.



Figura 4 - Aspecto macroscópico de algunas de las cepas de criptófitas adquiridas a las colecciones de CCAP y Roscoff.

Tabla 3 – Especies de criptófitas adquiridas a través del proyecto Assemble Marine por el Grupo de Biotecnología y Acuicultura de la USC.

Especie	código	Colección de origen
<i>Chroomonas placoidea</i>	CCAP 978/8	Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)
<i>Rhinomonas reticulata var. reticulata</i>	CCAP 995/2	Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)
<i>Rhodomonas lens</i>	CCMP 527	National Center for Marine Algae and Microbiota (anteriormente CCMP)
<i>Unknwon</i>	RCC 1504	Roscoff Culture Colection (RCC)
<i>Unknwon</i>	RCC 1505	Roscoff Culture Colection (RCC)
<i>Rhodomonas salina</i>	RCC 1506	Roscoff Culture Colection (RCC)
<i>Unknwon</i>	RCC 1507	Roscoff Culture Colection (RCC)
<i>Unknwon</i>	RCC 1508	Roscoff Culture Colection (RCC)
<i>Unknwon</i>	RCC 1509	Roscoff Culture Colection (RCC)
<i>Unknwon</i>	RCC 1510	Roscoff Culture Colection (RCC)
<i>Rhodomonas sp.</i>	RCC 1978	Roscoff Culture Colection (RCC)
<i>Rhodomonas báltica</i>	RCC 350	Roscoff Culture Colection (RCC)

## 1.2. Otras especies de microalgas

### 1.2.1. *Isochrysis aff. galbana* Parke (LB 927/21)

La microalga *Isochrysis aff. galbana* Parke (LB 927/21) pertenece a la División *Prymnesiophyta*, Clase *Prymnesiophyceae*, Orden *Isochrysidales*, Familia *Isochrysidaceae* y género *Isochrysis*. La clase *Haptophyceae* (= *Prymnesiophyceae*) fue propuesta por Christensen (1962) en ese momento incluidos en la división *Chrysophyta* y que presentaban características morfológicas que los diferenciaban de otras crisófitas. Posteriormente se consideró necesario crear una nueva división, *Prymnesiophyta* y también se propuso cambiar el nombre de la clase de *Haptophyceae* a *Prymnesiophyceae* (Hibberd, 1976). Se conocen unos 50 géneros y aproximadamente 500 especies de primnesiófitas (Green *et al.*, 1990) pero constantemente se descubren nuevas especies.

Las primnesiófitas pueden medir hasta 30  $\mu\text{m}$  de diámetro pero la mayoría de las especies tienen un tamaño comprendido entre 2 y 20  $\mu\text{m}$  (Jeffrey y Vesk, 1997). Son de color amarillo-marrón y presentan variedad en su forma, pudiendo ser esféricas, ovaladas, elipsoidales, fusiformes o aplanadas (Heimdal, 1993). La mayoría son de vida libre, móviles, cocoides o

palmeloides aunque también hay especies formadoras de colonias y filamentos (Green *et al.*, 1990). Son mayoritariamente marinas pero también las hay de agua dulce. La reproducción, en algunos casos, puede ser sexual con alternancia de fases haploides y diploides (Gayral y Fresnel, 1983; Green *et al.*, 1990). En las formas filamentosas algunas células se dividen dando 8 o 16 células flageladas que se dispersan para dar lugar a nuevos filamentos (Green y Parke, 1975).

Las células están recubiertas de escamas que pueden estar o no calcificadas; las especies que presentan placas calcificadas (cocolitos) y se denominan de cocolitoforos. Las escamas están compuestas de polisacáridos y proteínas. Se forman en el complejo de Golgi y se liberan en la superficie de la célula mediante la fusión de la vesícula que las contiene con la membrana plasmática (Klaveness y Paasche, 1979; Hibberd, 1980; Romanovicz, 1981). Los cocolitos son sintetizados también en el Golgi o en un sistema vacuolar independiente.

Poseen dos flagelos isocontos lisos, con la excepción de la orden *Pavlovales* en la que los flagelos son diferentes. En la mayoría de las especies asociado a los flagelos se nota un orgánulo filiforme exclusivo de las primnesiófitas, el haptonema, del que la clase recibió su nombre inicial. La longitud del haptonema varía según las especies y su interior consta de seis o siete microtúbulos dispuestos en círculo y rodeados de una membrana de retículo endoplásmico. El haptonema parece tener de fijar la célula a un substrato (Parke *et al.*, 1971).

Presentan uno o dos cloroplastos periféricos con lamelas formadas por tres tilacoides y sin lamela periférica. El pirenoide está en el interior del plasto o formando un abultamiento en su superficie. Los cloroplastos están rodeados por una membrana del retículo endoplásmico que también incluye al núcleo. Los pigmentos de las primnesiófitas incluyen clorofilas a, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, y c<sub>3</sub>, y β-caroteno, fucoxantina, diatoxantina y diadinoxantina. Se definieron cuatro tipos de composiciones pigmentarias en función de la presencia de los derivados de clorofila c y fucoxantina (Jeffrey y Wright, 1994). La mancha ocular aparece solamente en algunos miembros de las pavlovaes. Las primnesiófitas acumulan crisolaminarina y glóbulos lipídicos como sustancias de reserva.

El género *Isochrysis* comprende especies con dimensiones de 3x5 µm (Brown *et al.*, 1997) que presentan escamas únicamente en el haptonema. Este está muy reducido y mide 1 o 2 µm. Son microalgas muy utilizadas en acuicultura por su riqueza en lípidos y particularmente en ácidos grasos poliinsaturados siendo *I. galbana* Parke la primera microalga empleada como alimento vivo en los cultivos de moluscos (Bruce *et al.*, 1940). La cepa de *Isochrysis galbana* Parke utilizada fue aislada de la ría de Arosa por el Profesor Jaime Fábregas (USC).

### 1.2.2. *Nannochloropsis gaditana* Lubián

*Nannochloropsis gaditana* pertenece a la división *Eustigmatophyta*, Clase *Eustigmatophyceae*, Orden *Eustigmatales*, Familia *Miniosidaceae*, Género *Nannochloropsis* (Hibberd, 1981). La División *Eustigmatophyta* se separó de la División *Xantophyta* debido a las características de la estructura celular (Hibberd y Leedale, 1970; 1971; 1972) y a su composición de pigmentos (Guillard y Lorenzen, 1972; Whittle, 1976; Whittle y Casselton, 1969; 1975; Schnepf *et al.*, 1996). Actualmente el género *Nannochloropsis* cuenta con 7 especies siendo la *Nannochloropsis oceanica* var. *sinensis* var. *nov* la última especie descubierta (Cao *et al.*, 2013).

Las eustigmatófitas son algas esféricas o de forma oval y miden entre 2 y 18 µm. Siempre se presentan aisladas sin formar grupos. Presentan un color verde-amarillo que puede hacer que se confundan con miembros de la división *Chlorophyta* (Santos, 1996). Habitan tanto aguas dulces como saladas y pueden también localizarse en el suelo. Se reproducen mediante fisión binaria dando lugar a dos o cuatro autosporas que se liberan al romper la pared celular de la célula madre. La división tiene lugar durante la fase de oscuridad (Flynn *et al.*, 1993). La mayoría de las especies también producen zoosporas (Hibberd, 1990).

Presentan un único cloroplasto parietal que en las células vegetativas de la mayoría de las especies contiene un pirenoide de grande tamaño y forma poliédrica unido a la pared interna por un pedúnculo estrecho (Hibberd, 1990). Las lamelas están formadas por grupos de tres tilacoides pero no hay lamela periférica. El cloroplasto está recubierto por el retículo

endoplásmico. El núcleo de la célula contacta con el cloroplasto, pero no está recubierto por la membrana del retículo endoplásmico. Las zoosporas presentan una serie de características exclusivas de la división y algunas especies poseen dos flagelos, pero la mayoría solamente contiene un en el extremo anterior de la zoospora aunque esté presente un segundo corpúsculo basal. En el extremo anterior de la zoospora también se encuentra un punto ocular de grande tamaño, independiente del cloroplasto, que es de color naranja-rojo y está formada por una serie de glóbulos. Este punto ocular, o estigma, tan característico es el que da el nombre a la división. Las zoosporas carecen del aparato de Golgi y pirenoide (Hibberd y Leedale, 1970; 1971; 1972).

La composición de pigmentos de las eustigmatófitas es también única, presentando únicamente clorofila *a* y el carotenoide más abundante es la violaxantina que se encuentra formando parte del complejo colector de luz (Brown, 1987; Owens et al., 1987; Sukenik et al., 1992). La presencia de  $\beta$ -caroteno, vaucheriaxantina y cantaxantina también es característica de las eustigmatófitas. Las diferencias en el perfil de pigmentos en la división puede resultar útil para la caracterización de especies (Establier e Lubián, 1982; Lubián e Establier, 1982), igual que los esteroides (Patterson et al., 1994) aunque a veces sea necesario examinar secuencias de DNA (Andersen et al., 1998).

Las especies del género *Nannochloropsis* son ligeramente ovoides, con diámetro de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , y carecen de fases móviles flageladas (Hibberd, 1981). Debido a su morfología, durante mucho tiempo se consideraban como “chlorellas marinas” (Maruyama et al., 1986; Gladu et al., 1995). La mayoría de las especies se encuentran en hábitats marinos, pero recientemente se descubrió una especie de *Nannochloropsis* en ecosistemas de agua dulce (Krienitz et al., 2000). En acuicultura las especies del género *Nannochloropsis* son apreciadas por ser ricas en proteínas y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega$ -3) y por ser de fácil cultivo (Volkman et al., 1993; Watanabe et al., 1983). La especie *Nannochloropsis gaditana* se distingue de las demás especies del género por su composición de pigmentos, presentando  $\alpha$ -caroteno, además del  $\beta$ -caroteno (Lubián y Establier, 1982). La cepa de *Nannochloropsis gaditana* (CCMP 527) utilizada en este trabajo procede del National Center for Marine Algae and Microbiota (antes CCMP) Bigelow, Maine, USA.

### 1.2.3. *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher

La microalga verde *Tetraselmis suecica* pertenece al filo *Chlorophyta*, Clase *Chlorodendrophyceae*, Orden *Chlorodendrales*, Familia *Chlorodendraceae* y género *Tetraselmis*. Tradicionalmente fueron consideradas como miembros de las prasinófitas por compartir varias características ultraestructurales con las *Chlorophyta* Trebouxiophyceae, Ulvophyceae y Chlorophyceae, incluyendo la mitosis cerrada y el ficoplasto (Mattox y Stewart, 1984; Melkonian, 1990; Sym y Pienaar, 1993). Se ha confirmado recientemente una relación filogenética con estas *Chlorophytas* por datos moleculares (Fawley et al., 2000; Guillou et al., 2004; Marín, 2012).

Los miembros más conocidos de la clase *Chlorodendraceae* son organismos unicelulares con cuatro flagelos, sin embargo algunas especies de *Tetraselmis* (originalmente se consideró que perteneciera al género *Prasinocladus*) pueden formar colonias en algunos estadios del ciclo de vida (Proskauer, 1950; Norris et al., 1980; Sym y Pienaar, 1993).

Las células móviles de *Chlorodendrophyceae* generalmente se comprimen lateralmente y poseen cuatro flagelos hemodinámicos e iguales que emergen en la parte anterior de la célula. Las células son cubiertas por una teca, que es una pared celular delgada formada por la fusión extracelular de escamas (Manton & Parke, 1965; Sym y Pienaar, 1993). Los flagelos están cubiertos con pelos y escamas pentagonales (Melkonian, 1990). Las células poseen generalmente un cloroplasto que incluye una mancha ocular visible y pirenoide (solo en *Tetraselmis*).

La reproducción sexuada en la clase es desconocida y algunas especies pueden formar quistes de paredes gruesas vegetativas, que pueden ser ampliamente esculpidas (McLachlan & Parke, 1967; Norris et al., 1980; Sym y Pienaar, 1993). La mayoría de las *Chlorodendrophyceae* son planctónicas u organismos bénticos marinos, siendo algunas especies dulciacuícolas (John et al., 2002). Algunas especies están descritas como endosimbiontes de animales como del nematodo *Symsagittifera (Convoluta) roscoffensis* (Parke y Manton, 1965; Provasoli et al., 1968; Serodio et al., 2011).



*Tetraselmis* incluye cerca de 39 especies actualmente aceptadas, incluyendo taxones previamente asignado a los géneros *Platymonas*, *Prasinocladus* y *Aulacochlamys* (Norris et al, 1980; Sym y Pienaar, 1993).

La especie *Tetraselmis suecica* es de las especies de microalgas más utilizada en acuicultura siendo ampliamente utilizada cultivos de moluscos bivalvos, así como en el cultivo de crustáceos por a su valor nutricional, debido a su contenido en los ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo los ácidos grasos ARA y EPA en cantidades moderadas (Brown et al., 2002). La cepa de *Tetraselmis suecica* utilizada en este trabajo fue aislada de la ría de Arosa por el Profesor Jaime Fábregas, USC (Fábregas, 1982).

#### 1.2.4. *Chaetoceros* sp.

Pertenece al filo *Bacillariophyta*, Clase *Mediophyceae*, Subclase *Chaetocerotophycidae*, Orden *Chaetocerotales*, Familia *Chaetocerotaceae* y Género *Chaetoceros*, formando parte de un filo con más de 100.000 especies.

Al tratarse de una especie que pertenece a la División *Chrysophyta*, se caracterizan por poseer cromatóforos dorados-marrones en los que se encuentra clorofila *a* y *c*,  $\beta$ -caroteno y xantofila, principalmente la fucoxantina y la diatoxantina y desarrollan una pared silíceo (Matin-Jézéquel et al., 2000). Las diatomeas se encuentran mayoritariamente en medios marinos, pero también pueden encontrarse en ambientes dulciacuólicas y salobres (Vymazal, 1995), y se caracterizan por su estructura polimerizada de sílice, sus pigmentos y variedad morfológica. Las células se encuentran rodeadas por una pared celular única hecha de sílice amorfo (dióxido de silicio amorfo hidratado) y proteína, denominado frústulo o teca. Estos frústulos están generalmente formados por dos partes que se unen como las piezas de una caja de Petri, denominadas semitecas o valvas. El silicio amorfo es un componente esencial de la pared celular de las diatomeas y de este modo, su disponibilidad es un factor clave en la regulación del crecimiento de la diatomea en la naturaleza (revisado por Matin-Jézéquel et al. 2000). De acuerdo con la conformación del frústulo de sílice, hay dos tipos principales de

diatomeas: Las *pennales* (pennadas), que presentan simetría bilateral; y las céntricas, que presentan simetría radial (Sheehan *et al.*, 1998).

El género *Chaetoceros* son un grupo de diatomeas que incluye aproximadamente 218 especies (Ferrario *et al.*, 2004). Pueden encontrarse en la forma individualizada o en colonias céntricas bipolares (Spaulding y Edlund, 2008). De cada vértice de la célula emergen espículas (*setae*) de espesuras variadas. *Chaetoceros* se caracteriza principalmente por su cadena de formación de células y estructura de sus espículas. Una de las características más conspicuas es el número de espículas que poseen las células (Rines and Hargraves 1988, Hasle and Syvertsen 1996, Hernández-Becerril 1996). Las espículas pueden ser terminales o intercalares, si están en el final de una cadena o en el medio, respectivamente.

El género *Chaetoceros* es uno de los géneros más utilizado en acuicultura, siendo ampliamente utilizado en la alimentación de moluscos bivalvos (Brown *et al.* 2002). En cuanto a su valor nutricional se caracterizan por tener elevadas cantidades de lípidos y bajas cantidades de proteínas cuando comparadas con la generalidad de las microalgas (Brown *et al.*, 1997). Su perfil de ácidos grasos presenta elevados valores de EPA ( $\approx 20\%$ ), pero bajos valores de DHA y ARA ( $<5\%$ ), expresados en porcentaje del total de ácidos grasos (Brown *et al.*, 2002). La cepa *Chaetoceros* sp. utilizada en este trabajo fue obtenida de la colección Luis Lubián del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN-CSIC, Cádiz).

### 1.3. Rotífera

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

Pertenece al Filo *Rotifera*, Clase *Monogomonta*, Orden *Ploima*, Familia *Brachionidae*, Género *Brachionus*. El filo *Rotifera* o *Rotatoria* comprende cerca de 2000 especies de pequeños organismos con una talla que oscila entre 100  $\mu\text{m}$  y 1 mm. La mayoría son habitantes de agua dulce, pero también hay especies de agua marinas litorales y algunas viven en musgos y en ambientes semiacuáticos. Hay formas sésiles y también coloniales, pero la mayor parte de los rotíferos son de vida libre.



Los rotíferos son organismos pseudocelomados con una cavidad corporal que deriva del blastocelo embrionario. El cuerpo de un rotífero es más o menos cilíndrico o con forma de saco y está dividido en cabeza, tronco y un pié terminal. A veces hay un cuello bien definido entre la cabeza y el cuerpo. El pié en las formas sésiles termina en un disco adhesivo y en las nadadoras en dedos móviles, de un a cuatro según las especies. Toda la cabeza, salvo el deambulatorio, está recubierto por una cutícula intracelular incluida en la epidermis, que es sincitial. La cutícula suena estar engrosada formando una estructura llamada lorica.

Los rotíferos se alimentan de partículas en suspensión y microorganismos que son conducidos por el movimiento de los cilios de la girola cara a la boca, aunque también hay especies depredadoras que capturan activamente a sus presas.

El ciclo de vida de *Brachionus plicatilis* se puede cerrar mediante dos modos de reproducción (Figura 3). Durante la partenogénesis las hembras amícticas producen huevos (diploide,  $2n$ ) que se desarrollan y eclosionan en hembras amícticas. En el núcleo míctico, las condiciones ambientales cambian las condiciones reproductivas lo que hace que haya hembras mícticas y amícticas no distinguibles; las hembras producen huevos mícticos haploides ( $n$ ). La eclosión de huevos mícticos no fertilizados produce machos haploides ( $n$ ). Estos machos son de menor tamaño que las hembras, no tienen tracto digestivo y contienen un testículo que proporciona espermatozoides que fertilizan huevos mícticos para dar lugar a hembras amícticas diploides ( $2n$ ).

*B. plicatilis* es una especie que no selecciona su alimento (polífago), es un filtroalimentador, escogiendo el alimento en función de su tamaño, de forma que los individuos más grandes prefieren partículas de mayor tamaño. Estos organismos pueden alimentarse de diversos tipos de partículas, microalgas, usualmente cianofíceas, clorofíceas, feofíceas, etc., bacterias y levaduras aunque su alimentación está generalmente constituida por microalgas de géneros como *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp., *Monochrysis* sp., *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp., *Isochrysis* sp. y *Phaeodactylum* sp. o de levaduras (*Saccaromyces cerevisiae* y *Candida* sp.), algas secas en polvo y algunos productos comerciales como el “Culture Selco®”, siendo estos últimos los alimentos más comunes utilizados en la producción en gran escala en los criaderos.

Este filtrador es usado ampliamente en acuicultura como vehículo para proporcionar nutrientes esenciales a especies animales en cultivo. Para el uso en acuicultura se han diferenciado dos especies, inicialmente consideradas morfotipos, de rotífero: *Brachionus rotundiformis* (tipo S) y *Brachionus plicatilis* (tipo L). La diferenciación de ambos tipos se basa en distintas características morfológicas: a parte del tamaño, la *lorica* es más grande en los de tipo L y los de tipo S muestran espinas puntiagudas en la *lorica* mientras que los de tipo L contienen espinas anguladas.

Los rotíferos utilizados proceden de las instalaciones de INSUIÑA S. L. en Mougás, Oia (Pontevedra).

### 1.4. Bivalvia

La clase Bivalvia es el segundo grupo con mayor diversidad del filo Mollusca, representando uno de los más importantes miembros de los ecosistemas marinos y dulciacuícolas, con aproximadamente 10.000 especies descritas. Aunque prácticamente datado, los bivalvos siguen creando alguna discordancia principalmente en los grupos más pequeños y algunas características (Starabogatov, 1992; Morton 1996; Salvini-Plawen y Steiner, 1996; Walker 1998; Amler, 1999). Análisis combinados suportan la monofilia de los bivalvos y parafilia de bivalvos protobraquiados, y monofilia de Autolamellibranchiata, Pteriomorphia, Heteroconchia, Paleoheterodonta y Heterodonta

Los bivalvos se caracterizan por su simetría lateral y la presencia de dos valvas calcáreas unidas por una bisagra elástica dorsal y ligamientos. Las valvas se cierran y abren debido a la existencia de dos músculos aductores, anterior y posterior. Lateralmente se encuentran ctinidios (o pelos) filtradores rodeando la masa visceral. Los bivalvos poseen un pié musculado que puede presentarse modificado o muy reducido según el tipo de medio donde viven. Las especies sésiles se adhieren al substrato por cimentación como las ostras, o mediante una serie de filamentos que constituyen el biso como los mejillones. Especies que viven en substratos blandos como la arena, poseen un pié modificado que les permite excavar.

#### 1.4.1. Subclase Heterodonta

Heterodonta es un gran grupo que incluye más de 40 familias de almejas, berberechos entre otras, contando con aproximadamente 4.000 especies. Los Heterodonta poseen una bisagra compleja compuesta por un número relativamente pequeño de dientes, que pueden también estar ausentes. Su concha carece de una capa de nácar, pero puede comprender una microestructura lamelar, lamelar cruzada o capa prismática. Primitivamente son isomiarios, con músculos aductores iguales, pero poseen una grande variedad de configuraciones del músculo aductor. Poseen eulamelibranquias con ctenidios (o pelos). Las márgenes del manto están ampliamente fusionadas, especialmente la posterior, formando longos inhalantes y exhalantes sifones.

Son mayoritariamente marinos, sin embargo también se encuentran en estuarios y en ecosistemas dulciacuícolas. Generalmente son infaunales, pero también suelen ser epibisales.

##### 1.4.1.1. Orden Veneroidea

Es un grupo muy variable de organismos en su mayoría marinos, viviendo también algunos en estuarios y en ecosistemas de agua dulce. Se incluyen los comensales y pequeños parásitos poco conocidos. Representan más de 30% de los bivalvos existentes, contando con aproximadamente 3000 especies. Se caracterizan por una concha normalmente equivalva y complejas capas exteriores lamelares cruzadas y capas interiores lamelares cruzadas complejas. Poseen bisagra que comprende dientes cardinales y laterales, generalmente débilmente desarrollados. Los músculos aductores varían de acuerdo su hábitat; Poseen ctenidios eulamelibranquios y las márgenes del manto están ampliamente fusionadas, convirtiéndose en sifones largos.

La mayoría son animales de madriguera activos con un pie grande, siendo algunos epibisales.

En este trabajo se ha trabajado con las especies *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) y *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) que pertenecen a la Familia Veneridae.

#### 1.4.2. Subclase Pteriomorpha

En este importante grupo, se incluyen los más deseados moluscos como las ostras (Ostracidae y Pteriidae), vieiras (Pectinidae), mejillones (Mytilidae), entre otros, incluyendo aproximadamente 1.500 especies. Representan los primeros bivalvos que se alimentan por filtración.

Su concha es altamente variable en su forma y estructura. El músculo aductor anterior está reducido o ausente y el posterior se ha trasladado para una posición más central de las valvas (anisomarios o monomarios). La dentición en la bisagra es variable. Poseen filibranquias laterales que comprenden hemibranchias de filamentos, unidos y debilmente emparejados.

Son mayoritariamente marinos viviendo fijados a través del biso (epibisales), cementados o son infaunales.

##### 1.4.2.1. Orden Ostreoidea

La orden Ostreoidea, que comprende las ostras y vieiras, incluye aproximadamente 600 especies. En este grupo, las valvas son desiguales y variables, y generalmente carecen de dientes en la bisagra. Su concha es de calcita foliada, y la valva superior es de calcita prismática en la parte exterior. Sin embargo, en la mayoría de las vieiras se encuentran capas cruzadas laminares interiores. Algunas de las especies poseen dos músculos aductores (dimarios) pero la mayoría de las especies son monomarias poseyendo un solo musculo aductor. Poseen ctenidios (o pelos) pseudolamelibranchiales. El manto carece de fusiones, y el pie generalmente se pierde en la fase adulta. Son marinos y pueden ser epibisales, vivir cementadas o libremente.

En este trabajado se ha trabajado con dos especies de la familia Ostreidae, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) y *Ostrea edulis* (Linnaeus , 1758).

## 2. Sistemas de cultivo de las microalgas

El cultivo de las microalgas se realizó en pequeños fotobiorreactores tubulares de vidrio fondo cóncavo y 30mm de diámetro con 80mL de cultivo (Figura 5) colocados en una gradilla adecuada, situada en una cámara isotérmica con una temperatura ambiental de  $22 \pm 1$  °C. Los reactores han estado conectados a un sistema de aireación con un flujo de aire continuo de  $150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  suplementado con pulsos de  $\text{CO}_2$  de 10 segundos a cada 10 minutos durante el periodo de luz, con la finalidad de mantener el pH entre 7,5 y 8. Los fotobiorreactores fueron sometidos a luz en fotoperiodo circadiano de (12h luz:12 h oscuridad) con lámparas OSRAM Daylight L36W/7 para condiciones de baja irradiancia (LL,  $73,4 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y alta irradiancia (HL,  $147 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y Philips Master L36/965 para las condiciones de muy alta irradiancia (HHL,  $228,7 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La intensidad luminosa se midió con un luxímetro Neurtext HD 8366 utilizando el factor de conversión propuesto pro Ginzburg (1987) para la conversión lux a  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  siendo  $1 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} = 51,2 \text{ lux}$ .

El agua de mar utilizado en los diferentes sistemas de cultivo microalgales se filtró a través de filtros de celulosa de  $5 \mu\text{m}$  y se ajustó la salinidad a 35 ppt con agua destilada, midiéndose la salinidad con un refractómetro Bellingham and Stanley. Tras el ajuste se autoclavó a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Una vez estéril, se procedió al enriquecimiento del agua con medio Algal:  $\text{NaNO}_3$ , 8 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,44 mM;  $\text{ZnCl}_2$ , 4  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnCl}_2$ , 6,8  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaMoO}_4$ , 5,44 $\mu\text{M}$ ;  $\text{CoCl}_3$ , 0,76  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$ , 0,92  $\mu\text{M}$ ; citrato férrico, 60 $\mu\text{M}$ ; tiamina, 0,14  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; biotina, 26,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , vitamina B<sub>12</sub>, 18,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; EDTA, 4,7  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (ajustado Fábregas et al., 1984).



Figura 5 - Sistema de cultivo de microalgas (*Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea*) en fotobiorreactores de 80 mL.

Los cultivos se inocularon con 15-20% del volumen de cultivo y se cultivaron en *batch* hasta alcanzar el inicio de la fase estacionaria. Una vez alcanzada la fase estacionaria se inició el régimen semicontinuo retirándose diariamente una parte del cultivo substituyéndose por medio fresco y realizándose durante la primera hora del ciclo de luz, que es el momento más conveniente para su ejecución (Otero, 1995). La tasa renovación es el porcentaje de volumen de cultivo retirado a cada día. En los ensayos realizados se aplicaron diferentes tasas de renovación: 30% para los ensayos del primero capítulo, y 10 y 40% para los ensayos del segundo capítulo. Se consideró que se había alcanzado la estabilización de los cultivos cuando la densidad celular de los cultivos se mantuvo constante durante al menos tres días consecutivos.

### 3. Sistema de cultivo de los rotíferos

El rotífero *Brachionus plicatilis* se mantuvo de forma rutinaria en botellas de 1 L con agua de mar autoclavada a 121°C durante 20 minutos, sometidos a aireación y a un ciclo circadiano de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, en una cámara de cultivo termostatizada a  $22 \pm 1$  °C. Los rotíferos se alimentaron con microalgas frescas de varias especies: *Tetraselmis*



*suecica*, *Isochrysis galbana*, T-ISO y *Rhodomonas lens*. Para su mantenimiento se realizó el filtrado de los rotíferos para posteriormente pasarlos a una nueva botella de 1L con agua de mar limpia y estéril. Este proceso se realizó también un día antes de empezar el ensayo de crecimiento de rotíferos.

Para realización del ensayo de crecimiento de rotíferos, los rotíferos fueron transferidos para botellas de 1 L de capacidad (Figura 6), sometidos a un flujo de aire constante de 120 mL.min<sup>-1</sup>. Los cultivos se iniciaron con una densidad de 50 rotíferos·mL<sup>-1</sup> en 450 mL de volumen inicial.



Figura 6 - Sistema de cultivo do rotífero *Brachionus plicatilis* en botellas de 1 L con diferentes dietas.

#### 4. Sistema de cultivo de los moluscos bivalvos

Las larvas D (Figura 7) de las diferentes especies de moluscos bivalvos utilizadas en este trabajo fueron obtenidas mediante inducción del desove de los progenitores en los siguientes criaderos de moluscos bivalvos localizados en Galicia, España:

- Cofradía de Pescadores de San Bartolome de Noia, Noia;
- Estación de Ciencias Mariñas de Toralla ECIMAT, Vigo;
- Remagro S.A., O Grove, Pontevedra;
- Almeja Ría de Arosa S.L., La Coruña

Los progenitores se indujeron para el desove y luego de 24 o 48 horas, las larvas D se transportaron en un matraz de 500 mL hasta el laboratorio de la USC. Las larvas se filtraron y

contaron en una cámara de recuento de Sedgwick Rafter y posteriormente se distribuyeron por los tanques de 2,3 L (Figura 6) con una densidad inicial de aproximadamente 5-30 larvas.mL<sup>-1</sup> dependiendo de la especie y el número de larvas disponibles y aireación continua. El agua de mar utilizada fue previamente filtrada por dos filtros de 40 y 10 µm y ajustada la salinidad a 35 ppt con agua destilada. Los tanques se colocaron en un laboratorio con temperatura aproximada de 21 °C.

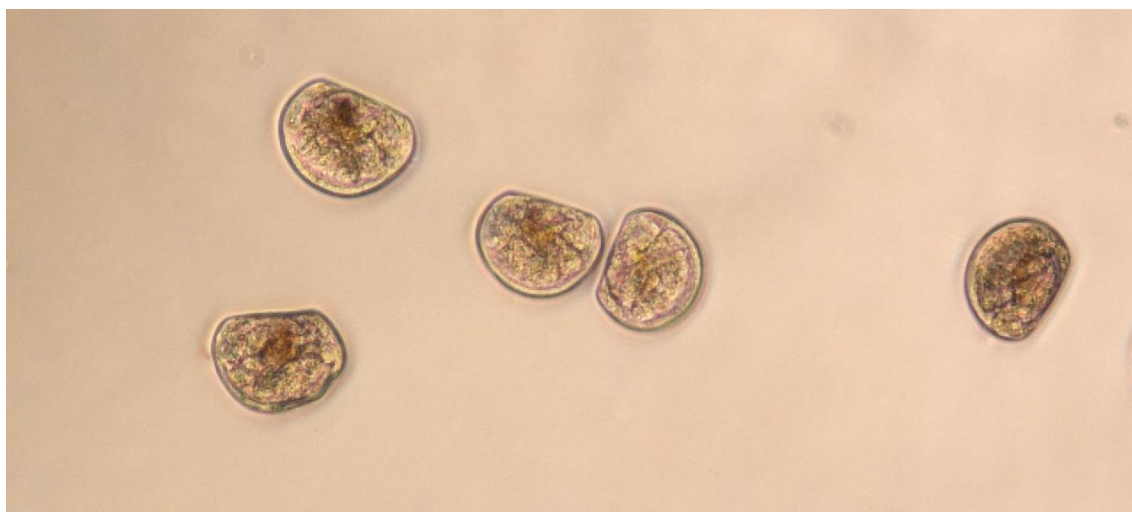


Figura 7 - Larvas D de *Ruditapes philipinarum*.

En este trabajo se ha utilizado el antibiótico cloranfenicol para evaluación del efecto de la carga bacteriana aportada con la dieta y su efecto en el crecimiento y supervivencia larvaria de moluscos bivalvos. La concentración de antibiótico se ensayó a 2,5 mg.L<sup>-1</sup>.

Cada 2 o 3 días las larvas eran filtradas por mallas de diferentes tamaños, siendo una malla de mayor tamaño para filtrar porquerías y otra menor donde las larvas quedaban retenidas y limpias, siendo posteriormente devueltas al tanque con agua limpia. Semanalmente se realizaron conteos en una cámara de recuento Sedwick Rafter y se midieron las larvas. Inicialmente se utilizó un micrómetro en un microscopio Olympus BX 50, cambiándose posteriormente para un microscopio Nikon Eclipse 50i con una cámara fotográfica Nikon Digital sight Fi 1 con el software NiS-ELEMENTS D2.30 sp 4.





Figura 8 - Sistema de cultivo de larvas de moluscos bivalvos en tanques de 2,3L de capacidad.

Las dietas para alimentación de las larvas fueron estipuladas siguiendo el manual de la FAO, utilizando como referencia el peso de *Isochrysis galbana* y  $100 \text{ células} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  para cada tanque. Se utilizó como dieta control una dieta mixta con 3 especies, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros* sp. en la razón 1:1:1 (peso seco). Para la conversión a dieta mixta se utilizó como referencia el peso celular de las diferentes especies. La inclusión de las criptófitas en la dieta resultó en la sustitución de 10 y/o 25% del peso total de la dieta control por las especies *R. lens* y/o *C. placoidea*.

## 5. Recuento celular

El recuento de la densidad celular en los cultivos en régimen semicontinuo se realizó sobre el volumen retirado al renovar antes de adicionar medio fresco. La densidad celular se calculó mediante el recuento de alícuotas al microscopio Olympus BX 50 en un hematocitómetro Improved Neubauer (Brand). Para ello se realizaron diluciones en agua de mar, de forma que el número de células contadas por campo de recuento de  $1 \text{ mm}^2$  se encontrase entre 30 y 300 (ICSH, 1988).

## 6. Cálculo de la tasa crecimiento

Se utilizó la misma magnitud,  $r$  ( $\text{día}^{-1}$ ) para designar la tasa de crecimiento de los cultivos de microalgas y la tasa de crecimiento de los cultivos de rotíferos. Se calculó según la siguiente fórmula (Scott y Baynes, 1978; Wood et al., 2005):

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

donde  $N_t$ =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.

## 7. Determinación del peso seco

Los cultivos de microalga se centrifugaron entre 30 y 50 mL de biomasa por triplicado en tubos Falcon®, previamente pesados en una balanza de alta precisión Precisa 125 A. Las muestras se centrifugaron a 9000 rpm en una centrifuga Hettick Universal 32R a 4°C y se congelaron a -20°C para su posterior liofilización en un liofilizador Labconco Lyph-lock 6 durante 24 horas. Tras la liofilización, los tubos Falcon® con la biomasa liofilizada, fueron nuevamente pesados en la misma balanza de alta precisión. El peso seco es la diferencia entre el peso del tubo de Falcon® con la biomasa liofilizada y el peso inicial del tubo de Falcon® vacío (Zhu y Lee, 1997).

El cálculo de peso seco de los rotíferos se hizo en pequeños filtros de 40µm, pesados previamente

Se filtraron 300 mL de cultivo de rotíferos por triplicado en pequeños filtros de 40 µm, previamente pesados en una balanza de alta precisión Precisa 125 A. Las muestras se lavaron con agua destilada y se congelaron a -20°C para su posterior liofilización en un liofilizador Labconco Lyph-lock 6 durante 24 horas. Tras la liofilización, filtros con los rotíferos liofilizados, fueron nuevamente pesados en la misma balanza de alta precisión. El peso seco es la diferencia entre el peso del filtro con la biomasa liofilizada y el peso inicial del filtro vacío.

## 8. Análisis elemental (C-H-N)

Los análisis de la composición elemental (Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno, CHN) se realizaron por triplicado sobre alícuotas de la biomasa liofilizada homogenizada. Se pesaron 1-2 mg de muestra en una balanza analógica Sartorius ( $d=\pm 0,001$  mg) en una cápsula especial de estaño. Para la realización de los análisis se utilizó un autoanalizador Flash EA 1112 de Thermo Finnigan.

El método analítico se basa en la oxidación instantánea y completa de la muestra, que convierte todas las sustancias orgánicas e inorgánicas en productos de la combustión. Los gases resultantes de la combustión pasan a través de un horno de reducción y son barridos al interior de la columna cromatográfica (Poapak PQS) por el gas transportador, en este caso helio, donde son separados para su detección por un detector de conductividad térmica que emite una señal proporcional a la concentración de los componentes individuales de la muestra. El instrumento se calibra con acetanilida, estándar aconsejado para muestras con alto contenido orgánico, siendo la concentración de las muestras calculada mediante un algoritmo de regresión lineal en el área de los picos generados por el detector. Para la realización de estos cálculos el autoanalizador está equipado con un ordenador (EAGER 300).

## 9. Determinación del contenido proteico

Para el cálculo del contenido de proteína de la biomasa se utilizó el valor del contenido de N obtenido por análisis elemental (C:H:N). Para ello se utilizó el factor de conversión 5,8 propuesto por Gnaiger y Bitterlich (1984) en sustitución del clásico factor de conversión 6,25 (FAP/WHO, 1973). Se demostró que para diversas muestras de origen marino incluyendo algas, bacterias, protozoos e invertebrados, este factor es más ajustado que el factor 6,25 (Gnaiger y Bitterlich, 1984). Otros estudios demostraron que un factor de 6,0 sería más correcto en el caso de las diatomeas (Laws, 1991). A pesar de en nuestro trabajo ser utilizada una diatomea, se optó por la utilización del factor de Gnaiger y Bitterlich (1984) en todos los casos de forma a uniformizar el método.

## 10. Determinación de ficobiliproteínas.

Para la extracción de las ficobiliproteínas se centrifugaron 3 mL de cultivo fresco por triplicado a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. En el caso de que las muestras no fuesen procesadas en el momento, se congelaron a -18 °C para su posterior análisis. Se añadió 1mL de agua destilada al pellet y se rompió la pared empleando un sonicador durante aproximadamente 15 segundos. Se congelaron los tubos a -18 °C durante dos horas y posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente, empleando nuevamente un sonicador durante 15 segundos. Este paso se realiza para asegurar la extracción total y completa del pigmento. Se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos, y el extracto soluble en donde se encuentran los pigmentos (Figura 9) se leyó en un espectrofotómetro Helios Omega UV-Vis de Thermo Scientific. Las cantidades de ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) y aloficocianina (APC) se calcularon a partir de las mediciones de densidad óptica a 565, 620 y 650 nm. Los cálculos se realizaron según las formulas propuestas por Bennet Y Bogoard (1973) que corresponden a fórmulas establecidas por ecuaciones simultáneas, y el coeficiente de extinción de cada uno de los pigmentos (Bryant et al., 1979).

La ecuación para la ficocianina (PC) es:

$$PC \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} = (A_{620} - 0,7 A_{650})/7,38$$

La ecuación para la aloficocianina (APC) es:

$$APC \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} = (A_{650} - 0,19 A_{620})/5,65$$

La ecuación para la ficoeritrina (PE) es:

$$PE \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} = (A_{565} - 2,8 PC - 1,34 APC) / 12,70$$

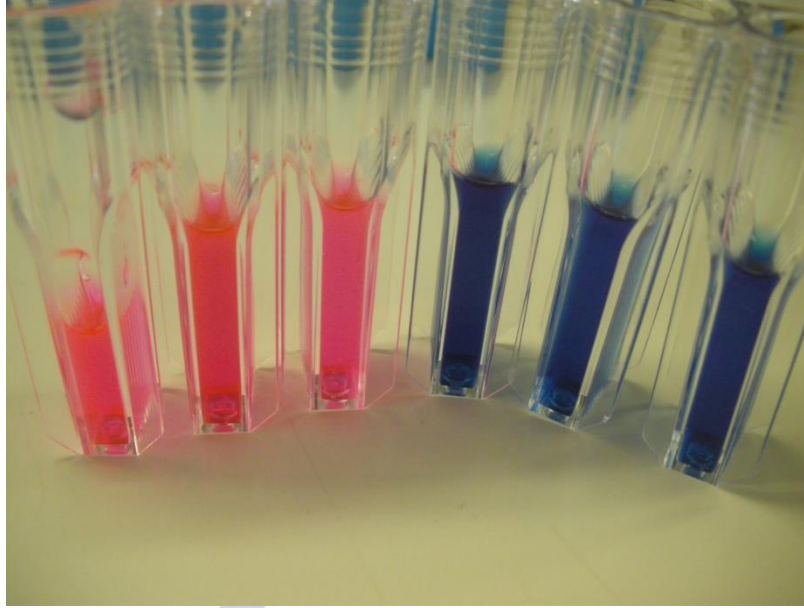


Figura 9 - Ficobiliproteínas de *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea* extraídas para lectura en el espectrofotómetro.

### 11. Determinación del contenido de carbohidratos.

La determinación de carbohidratos de este trabajo se ha realizado por el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) que continúa siendo el más utilizado porque no es sensible al contenido proteico de la muestra y la reacción colorimétrica es muy estable. Su única interferencia posible vendría dada por las pentosas que son componentes de los ácidos nucleicos pero su simplicidad lo convierte en el método más extendido en las investigaciones de este tipo (Kochert, 1978). El fenol es un alcohol muy reactivo que reacciona con los carbohidratos dando lugar a un complejo coloreado de amarillo a marrón según la concentración de carbohidratos. Esta reacción coloreada es lineal a longitud de onda de 485 nm.

Para el análisis se utilizaron 3 mL de cultivo microalgal centrifugado (3000 rpm, 10 min, 4°C) y posteriormente congelado a -18 °C. Las muestras fueron resuspendidas en 4 mL de NaOH 1 N y sonicadas para facilitar la hidrólisis. Se repartió por triplicado 1 mL de esta disolución. Paralelamente se preparó un blanco con 1 mL de NaOH 1 N y se distribuyeron en tubos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 mL de una disolución de glucosa anhidra de 1 mg.mL<sup>-1</sup> en NaOH 1 N

enrasándose los tubos hasta un volumen de 1 mL con NaOH 1 N. A los tubos se le añadieron 25  $\mu$ L de fenol al 80 % en agua destilada y se mezclaron en un agitador Vortex. Inmediatamente se adicionaron 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (riqueza 95,5%,  $d=1,84$ ) y agitando el tubo en el Vortex. Tras reposar 30 minutos a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia de las muestras a 485 nm en un espectrofotómetro Helios Omega UV-Vis de Thermo Scientific en cubetas de plástico de 1 cm. Los valores de la muestra de glucosa se ajustaron a una recta por mínimos cuadrados de donde, por extrapolación, se dedujo el contenido de carbohidratos de las muestras problema.

## **12. Determinación del contenido lipídico.**

Para determinación de lípidos totales se ha utilizado el método estándar de extracción propuesto por Bligh y Dyer (1959). Se realizó un extracto lipídico de 20-30 mg de la muestra liofilizada. Las muestras se extrajeron con 20 mL de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2 V:V) y se centrifugaron para quedarse con el sobrenadante. Se añadieron al sobrenadante 12 mL cloroformo y 12 mL de agua. Se separaron las fases mediante centrifugación y se pasó la fase apolar a un balón volumétrico de 150mL previamente secados en una estufa a 60°C durante 24h y pesado en una balanza de alta precisión *Precisa 125 A*. Se secaron las muestras en un rotavapor Memmert a 40 °C. Tras secar los balones con la biomasa se secaron en una estufa a 60°C durante 24h y se volvieron a pesar en la balanza *Precisa 125 A*. El contenido lipídico se calculó mediante la diferencia del peso final e inicial de los tubos sobre el peso de la muestra.

## **13. Determinación del contenido de ácidos grasos.**

El análisis de ácidos grasos se realiza en dos fases, en primer lugar, una extracción de los lípidos y a continuación una esterificación mediante la cual se obtienen los ésteres metílicos de los ácidos grasos, que son analizados en el cromatógrafo. La extracción lipídica previa de los ácidos grasos se realizó siguiendo el método de Bligh y Dier (1959) como se ha descrito anteriormente. Para ello se realizó un extracto lipídico de 5 mL de cultivo fresco de microalga centrifugado (3000 rpm, 10 min, 4°C), y entre 50 mL de cultivo de rotífero filtrado



y lavado posteriormente con agua destilada, posteriormente congelados. Las muestras se extrajeron con 3 mL de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2 V:V) separando la fase polar mediante la acción de 1,8 mL de cloroformo y 1,8 mL de agua. Ambas las fases se separaron por centrifugación y se separó la fase apolar a un nuevo tubo añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de una disolución 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de triheptadecanoín (17:0) como estándar interno. Los extractos lipídicos, previa evaporación del cloroformo bajo flujo de nitrógeno, se sometieron a metanólisis durante 2,5 horas a  $85^\circ\text{C}$  mediante la adición de 2 mL de  $\text{HCl}:\text{CH}_3\text{OH}$  al 5 % en peso (Sato y Murata, 1988). Los metil ésteres de ácidos grasos así obtenidos se separaron de la fase polar mediante una doble extracción con hexano. El volumen final de hexano se redujo entre 300 y 500  $\mu\text{L}$  para su análisis en un cromatógrafo de gases-espectrofotómetro (GC-MS).

Para identificación de los ácidos grasos de las muestras de las criptófitas (Capítulo 1, sección 1 y 2) se utilizó un cromatógrafo de gases (GC-MS) PerkinElmer 800-8000 Series mientras que para las muestras de los rotíferos y microalgas de los Capítulo 1 (sección 3) y Capítulo 2 se utilizó un Thermo Scientific Trace 1300 GC; en ambos se utilizó una columna Omegawax<sup>TM</sup>250 fused silica (Supelco) de 30 m – 0,25 mm. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: volumen inyectado, 1  $\mu\text{L}$ ; gas portador, He; flujo gas portador en la columna 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; relación splitless, 1:99; temperatura inyector,  $230^\circ\text{C}$ . Método del cromatógrafo: tiempo splitless, 1min; temperatura,  $35^\circ\text{C}$ , 1 min; rampa de  $35^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta  $200^\circ\text{C}$ ;  $250^\circ\text{C}$ , 55 min. Método de adquisición de espectros de masas: retardo del solvente, 4,5 min; rango masas, 0,50-400; tiempo inter-scan, 30 segundos. Por otra parte para los análisis de los ácidos grasos mediante un cromatógrafo Trace1300 con un detector FID usando una columna Omegawax<sup>TM</sup> 250 fused silica (Supelco) de 30 m y 0,25 mm de diámetro Las condiciones de análisis fueron las siguientes: volumen inyectado, 1  $\mu\text{L}$ ; gas portador, Helio; flujo de gas portador en la olumna, 0,8  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ; relación *splitless* (1:100); temperatura inyector:  $250^\circ\text{C}$ . Ciclo del romatógrafo: tiempo *splitless* 1 min. Temperatura:  $50^\circ\text{C}$ , 2 min.; rampa de  $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta  $220^\circ\text{C}$ ;  $220^\circ\text{C}$ , 55 min.

Esta identificación fue confirmada mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos con los tiempos de retención de un patrón comercial de metil-ésteres de ácidos grasos cuantitativo Supelco FAME Mix y un cualitativo Supelco Menhaden Fish Oil. El cálculo de la concentración se realizó mediante la integración del área bajo los picos, que en el sistema GC-MS es directamente proporcional a la masa.

Adicionalmente se confirmó la identificación de los picos mediante comparación de los os espectros de masas de la librería de espectros de masas WIST/NBS.

#### **14. Determinación de UFCs**

La cuantificación de bacterias y víbríos en los cultivos microalgales, utilizados en la dieta de las larvas de moluscos, se cuantificaron en placas de petri estériles con medios de cultivo de agar triptosa soja (TSA-1) y agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS), respectivamente. Se recogió biomasa de los cultivos microalgales y tras la realización de diluciones seriadas se sembró 100  $\mu$ L en las placas de agar. Después de 24h en estufa a 25°C se contaron las Unidades Formadoras de Colonia (CFUs) en las placas de petri con medio agar TCBS para cuantificación de bacterias del género *Vibrio*. Para cuantificación de las CFUs en el medio agar TSA-1 se esperó aproximadamente 7 días para su conteo. En el conteo se tuvo en cuenta que el número de CFUs contadas por placa de petri se encontrase entre 30 y 300 (ICSH, 1988).

#### **15. Tratamiento estadístico**

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el software R version 2.12.2 : test T para datos pareados y ANOVA con test a posteriori Tukey HSD y Bonferroni.(R Core Team (2015). R: A language and enviromental for statistical Computing, Vienna, Austria.



**Capítulo 1 – Estudio del crecimiento y composición  
bioquímica de diferentes especies de microalgas  
del grupo Chryptophyceae y su potencial  
utilización en la alimentación del rotífero  
*Brachionus plicatilis***

UNIVERSIDADE  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA



## 1. Crecimiento, productividad y composición bioquímica de las especies de Cryptophyceae *Rhinomonas reticulata*, *Rhodomonas salina*, *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea* en cultivo continuo y discontinuo.

### 1.1. Justificación y diseño experimental

Se ha demostrado previamente en el laboratorio de la USC la posibilidad de mantener cultivos semicontinuos concentrados de la criptófita *Rhodomonas lens*, aplicándose diferentes tasas de renovación (Coutinho, 2008) en fotobiorreactores de 80mL, siendo igualmente posible cultivarla en fotobiorreactores de mayor volumen, 1 y 5L (Seixas *et al.*, 2008; 2009). A pesar de la mayor sensibilidad de estas microalgas a la luz fue posible cultivar la *R. lens* con elevada irradiancia ( $242 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en fotobiorreactores de 80mL, incrementando la productividad (Freire, 2015). Además, se comprobó el elevado valor nutritivo y potencial utilización en acuicultura de esta especie, al incrementar el crecimiento y valor nutricional de *Brachionus plicatilis* y de *Artemia* sp. cuando se alimentaron con *R. lens* (Coutinho, 2008; Seixas *et al.*, 2008; 2009; Freire, 2015).

Tomando como base estos resultados previos obtenidos en el grupo y teniendo en cuenta que a pesar del potencial de las criptófitas para su utilización en acuicultura descrito para diversas especies del grupo (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Zhukova y Aizdaicher, 1995; Dunstan *et al.*, 2005), se carece la información de una comparación de la productividad y composición bioquímica de especies de este grupo cultivadas en sistemas semicontinuos optimizados, se consideró necesaria la realización de un estudio comparativo en el que diversas especies de criptófitas fuesen cultivadas en el mismo sistema de cultivo para poder evaluar su potencial productivo y composición bioquímico en condiciones controladas.

Por ello, de las 12 especies de criptófitas de las colecciones de CCAP y ROSCOFF obtenidas por el grupo de Biotecnología Marina y Acuicultura de la USC, a través del proyecto ASSEMBLE (descrito en Material y Métodos), además de la cepa de *Rhodomonas lens* (CCMP 739) obtenida con anterioridad a la colección de NCMA (antes CCMP), se eligieron las cuatro microalgas que habían presentado mejor crecimiento en matraces Erlenmeyer de 250mL en cultivo estático (datos no presentados): *Rhodomonas salina* (RCC

1506), *Rhinomonas reticulata* var. *reticulata* (CCAP 995/2) y *Chroomonas placoidea* (CCAP 978/8) (Tabla 3, sección Material y Métodos) para evaluar el crecimiento celular, productividad y composición bioquímica en sistema discontinuo y semicontinuo en mini-fotobiorreactores.

La comparación de las especies *R. reticulata*, *R. salina*, *R. lens* y *C. placoidea* se hizo en tubos de cultivo de 80 mL (mini-fotobiorreactores) con una intensidad luminosa de  $147 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , con un ciclo de luz 12:12, con salinidad ajustada a 35‰ y utilizando la formulación de medio Algal (Fábregas *et al.*, 1984) ajustado a 8mM de  $\text{NO}_3$ , tal como se describe en Materiales y Métodos. El volumen de inóculo utilizado correspondió aproximadamente a 20% del volumen final de cultivo en el mini-fotobiorreactor, siendo la densidad inicial en los cultivos de  $1,63 \times 10^6$ ,  $2,07 \times 10^6$ ,  $5,48 \times 10^6$  y  $4,86 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para la *R. reticulata*, *R. salina*, *R. lens* y *C. placoidea* respectivamente,

Se dejaron crecer los cultivos hasta que alcanzaron la fase estacionaria temprana, empezándose el régimen semicontinuo mediante la aplicación de una tasa de renovación diaria de 30%. En la fase estacionaria del cultivo discontinuo y la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos se recogió la biomasa microalgal para su posterior análisis bioquímico tal como describe en la sección Materiales y Métodos.

## 1.2. Resultados y discusión

### 1.2.1. Crecimiento y productividad

La mayor densidad celular en la fase estacionaria del cultivo discontinuo se obtuvo en la especie *C. placoidea*, seguida de *R. lens* y *R. salina*, presentando *R. reticulata* la menor densidad celular (Figura 10). Para las especies *R. reticulata* y *C. placoidea* el final de la fase logarítmica se alcanzó después de 7 días con unas densidades celulares máximas de  $3,81 \pm 0,23 \times 10^6$  y  $14,7 \pm 1,64 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, mientras que para *R. salina* el final de esta fase se observó al día 9 con una densidad celular de  $12,3 \pm 1,12 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> (Figura 10). La mayor densidad celular de *R. lens* se observó al día 6 con  $14,15 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Para *R. lens* el inicio del régimen semicontinuo se llevó a cabo en el día 7, en el

que se observó una ligera disminución en la densidad celular con respecto al máximo. La elevada inestabilidad de los cultivos de *R. lens* una vez alcanzada la fase estacionaria ya ha sido descrita con anterioridad (Coutinho, 2008; Freire, 2015). Las densidades celulares obtenidas en la fase estacionaria superan los valores obtenidos en trabajos realizados por otros autores con *Chroomonas placoidea*, *Cryptomonas* sp., *Proteomonas sulcata*, *Rhodomonas* sp., *Rhodomonas salina*, *Rhodomonas maculata* (Brown *et al.*, 1991; Brown and Miller, 1992; Dunstan *et al.*, 2005; Lafarga de la Cruz *et al.*, 2006; Renaud *et al.* 1999; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005; Zhukova y Aizdaicher, 1995). Estos autores trabajaron con base en el médium f/2 (Guillard y Ryther, 1962) obteniendo densidades celulares máximas alrededor de 1 orden de magnitud menores que las obtenidas en este trabajo: entre 0,69 y  $3,08 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> y 1,33 y  $1,57 \times 10^6$  para *Chroomonas salina* y *Rhodomonas* sp., respectivamente. Coutinho (2008) demostró la ineficiencia del medio f/2 para el cultivo de *R. lens*, obteniendo densidades celulares igualmente bajas ( $4,57 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) con este medio. El medio f/2 ya había sido descrito como limitante en nitrógeno para la mayoría de las microalgas marinas (Goldman *et al.*, 1979; Herrero *et al.*, 1991; Olson, 1988; Sakshaug *et al.*, 1983), requiriendo estas microalgas altas concentraciones de nitrógeno, al igual que otras microalgas rojas como *Porphyridium cruentum* (Arad *et al.*, 1988; Fábregas *et al.*, 1998). Otros autores han obtenido valores de densidad celular en fase estacionaria superiores a los obtenidos en este trabajo para *Chroomonas* sp. (Bermúdez *et al.* 2004) y *R. lens* (Coutinho 2008), utilizando las mismas condiciones de cultivo, llegando sus cultivos a 64,52 y  $25,33 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. En el caso de *Chroomonas* sp. (Bermudéz *et al.*, 2004), el menor peso celular de la microalga (10-20 pg.célula<sup>-1</sup>), llevó a un mayor crecimiento celular, justificando la elevada densidad celular obtenida, además la elevada temperatura de cultivo (29°C) pudo influenciar positivamente el crecimiento celular. La menor densidad obtenida en la fase estacionaria del régimen *batch* en este trabajo, en comparación con los obtenidos por Coutinho (2008), se puede deber al agotamiento de nutrientes. Otra posible hipótesis para este descenso es la acumulación de alguna sustancia tóxica en el medio, llevando a un bloqueo del crecimiento celular (Richmond, 2008). El incremento de la densidad celular obtenida en esta especie una vez iniciado el régimen semcontinuo podría apoyar esta hipótesis.

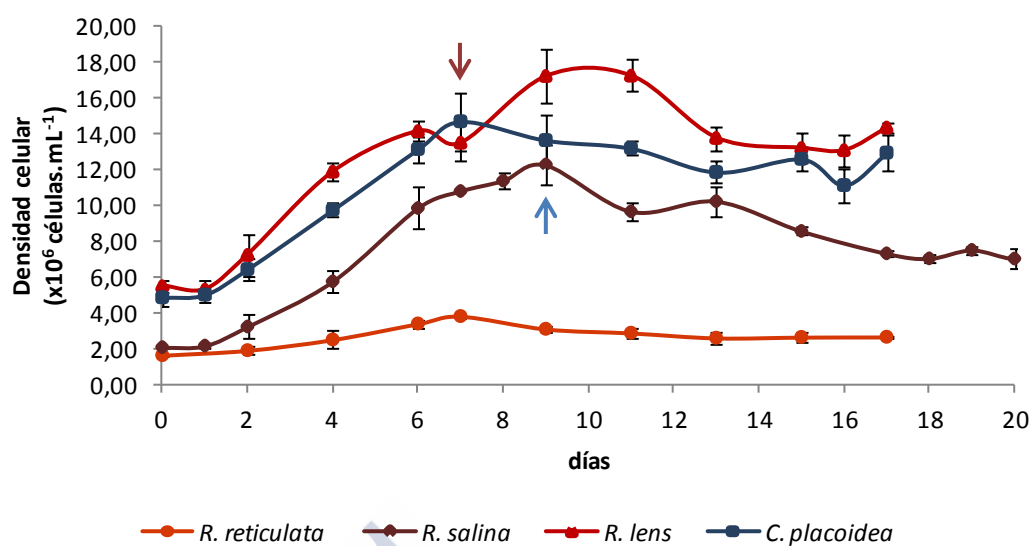


Figura 10 – Densidades celulares de las diferentes especies de criptófitas en cultivo *batch* y semicontinuo con TR 30%. Las flechas indican el inicio régimen semicontinuo (día 7 para las especies *C. placoidea*, *R. lens* y *R. reticulata* y 9 para la especie *R. salina*). Los cultivos se realizaron en minifotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro con nutrientes ajustados a 8mM de NO<sub>3</sub> y mantenidos con una irradiancia de 147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (n=3).

La mayor tasa de crecimiento en la fase *batch* se obtuvo para la especie *R. salina* (0,81 día<sup>-1</sup>), seguida de *C. placoidea* (0,57 día<sup>-1</sup>), *R. lens* (0,50 día<sup>-1</sup>) y *R. reticulata* (0,44 día<sup>-1</sup>). Estos resultados son semejantes a los obtenidos por otros autores que obtuvieron tasas de crecimiento entre 0,53-0,72 día<sup>-1</sup> y 0,74 día<sup>-1</sup> para *Rhodomonas* sp. y *R. salina*, respectivamente (Bartual *et al.*, 2002; Velenzuela *et al.*, 2005).

El régimen semicontinuo se inició con una tasa de renovación diaria de 30%, estabilizándose los cultivos a partir del día 13 para las especies *R. reticulata*, *R. lens* y *C. placoidea* y día 17 para *R. salina*. La mayor densidad de estabilización se obtuvo para *R. lens* con  $13,60 \pm 0,80 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, seguida de las microalgas *C. placoidea*, *R. salina* y *R. reticulata* con  $12,14 \pm 0,60 \times 10^6$ ,  $7,45 \pm 0,58 \times 10^6$  y  $2,70 \pm 0,09 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 10). Tal y como era de esperar, las densidades celulares obtenidas en la fase estacionaria de cultivo discontinuo (*batch*) fueron superiores a las obtenidas en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo (*steady state*) (Otero y Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1997b) (Figura 11). Por el contrario, esta diferencia no fue tan evidente para *R. lens* cuyos

valores son idénticos en ambas las fases de cultivo ( $13,5$  y  $13,6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>), posiblemente por autolimitación del crecimiento en cultivo *batch*, por una posible limitación de nutriente, como referido anteriormente. *R. reticulata* presentó valores muy inferiores a las demás microalgas, sin embargo, Leonardos y Lucas (2000) trabajaron con densidades de estabilización inferiores en sistema continuo ( $0,2 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) para esta especie, a pesar de utilizaren una mayor irradiancia. En estos experimentos la utilización del medio f/2 podrá haber limitado el crecimiento celular, tal y como se describió en el caso de *R. lens* (Coutinho, 2008). Para *R. lens*, Coutinho (2008) y Seixas *et al.* (2009) obtuvieron densidades de estabilización muy inferiores debido a limitación de los cultivos por luz, estabilizándose sus cultivos en  $6,71 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> y  $3,7 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, frente a los  $13,6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> obtenidos en el sistema tubular con la misma tasa de renovación. Al igual que para la densidad en fase estacionaria, la densidad obtenida por Bermúdez *et al.* (2004) obtuvieron densidades de estabilización en cultivo semicontinuo bastante superiores en *Chroomonas* sp. ( $28,2 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) en condiciones de cultivo similares de irradiancia, nutrientes y tasa de renovación debido al menor peso celular de microalga.

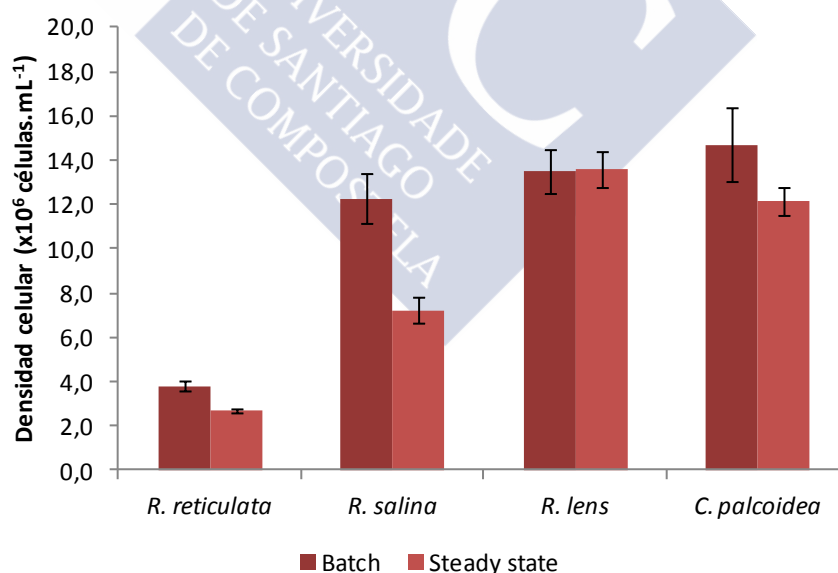


Figura 11 – Densidades celulares máximas estacionaria de cultivos discontinuos (batch) y densidades de estabilización en cultivo semicontinuo (steady state), con una tasa de renovación diaria de 30%. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro con nutrientes ajustados a 8mM de NO<sub>3</sub> y mantenidos con una irradiancia de 147 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (n=3).

El mayor peso celular en la fase de cultivo semicontinuo se observó en *R. reticulata*, 210,05 pg.célula<sup>-1</sup> seguido de *R. salina*, *R. lens* y *C. placoidea* con 125,57pg.célula<sup>-1</sup>, 94,18 y 93,1 pg.célula<sup>-1</sup> respectivamente. El peso obtenido por *R. lens* (94,18 pg.célula<sup>-1</sup>) es inferior a los obtenidos por Freire (2015) (105,57 pg.célula<sup>-1</sup>) y superior a los obtenidos por Coutinho (2008) (67,83 pg.célula<sup>-1</sup>) en condiciones similares. Estas diferencias en el peso celular se podrían justificar con la diferente irradiancia utilizadas en el cultivo de *R. lens* en los diferentes trabajos, incrementándose el peso celular con el aumento de la irradiancia. Por el contrario, Seixas *et al.* (2008; 2009) obtuvieron valores de peso seco celular superiores, 133,5 y 120,8 pg.célula<sup>-1</sup>, aplicando la misma tasa de renovación en botellones de 1 y 5 L, lo que se podría justificar por la menor irradiancia efectiva y menor concentración de nitrógeno en el medio usado en estos trabajos. El peso celular obtenido para *R. salina*, 125,57 pg.célula<sup>-1</sup>, fue similar a los 117,3 y 122,5 pg.célula<sup>-1</sup> descritos por Brown (1991) y Brown y Miller (1992) para *C. salina* en la fase de crecimiento logarítmica de cultivos *batch*.

La productividad en peso de las diferentes especies de microalgas una vez alcanzada la densidad de estabilización de los cultivos semicontinuos mostraron el mismo patrón que las densidades celulares, de forma que la mayor productividad se obtuvo en *R. lens* con 384 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> seguida de *C. placoidea* con 339 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, *R. salina* con 280 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> y *R. reticulata* con 170 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> (Figura 12).



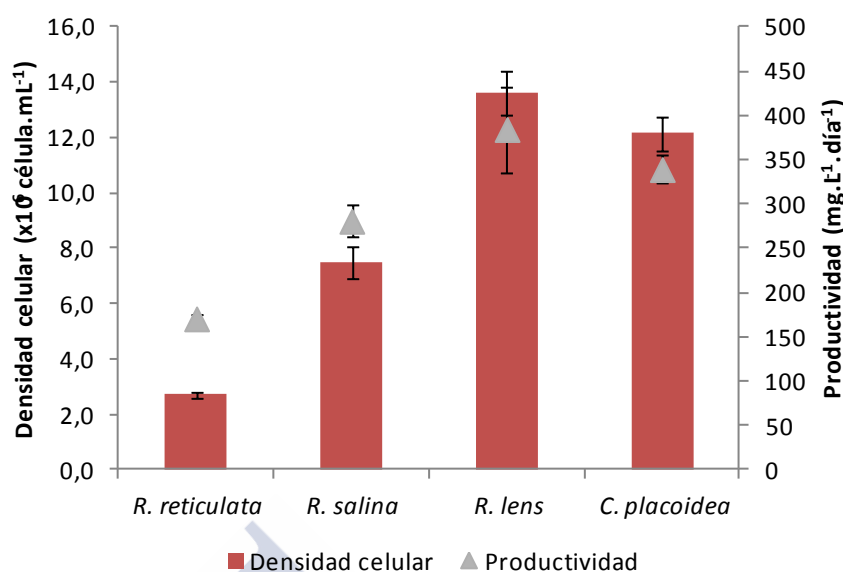


Figura 12 – Densidades celulares de estabilización y productividades en peso seco de las diferentes especies de criptófitas (*R. reticulata*, *R. salina*, *R. lens* y *C. placoidea*) en la fase de estabilización (*steady state*) de cultivos semicontinuos mantenidos con una tasa de renovación diaria de 30%. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro con nutrientes ajustados a 8mM de NO<sub>3</sub> y mantenidos con una irradiancia de 147 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (n=3).

La productividad volumétrica en peso obtenida para *R. lens* en este trabajo presentó valores muy superiores a los obtenidos por Coutinho (2008), que alcanzó 86,76 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> para *R. lens* cultivada en condiciones similares, siendo probablemente la menor irradiancia utilizada lo que limitó el crecimiento celular. En los cultivos de *R. lens* de Seixas *et al.* (2008; 2009), los valores de productividad representaron casi la mitad de la productividad obtenida en este trabajo (140 y 120,8 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, respectivamente), a pesar de mayor peso celular obtenido en los sistemas de mayor volumen, la densidad de estabilización fue bastante inferior, como resultado de la menor luz disponible en los cultivos debido al diámetro de los fotobiorreactores utilizados. A pesar de los elevados valores de densidad celular obtenidos por Bermúdez *et al.* (2004), los valores de productividad fueron inferiores, alcanzando 127 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> para *Chroomonas* sp., en condiciones de cultivo similares. Estos cultivos podrán estar limitados por luz debido al mayor volumen utilizado (150 mL) y posiblemente mayor diámetro de los fotobiorreactores utilizados. Las productividades obtenidas por las criptófitas

en este trabajo presentaron valores muy competitivos superando, en algunos casos, los obtenidos por otras especies en condiciones muy similares de cultivo en otros trabajos realizados en el laboratorio de la USC. Fábregas *et al.* (1996) obtuvo 250 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> para *Phaeodactylum tricornutum* y Ferreira *et al.* (2008; 2009 y 2011) 152 y 263 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> para *Nannochloropsis gaditana* y *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO), respectivamente.

### 1.2.1. Composición bioquímica

La relación C:N está relacionada con la tasa de crecimiento (Chaup y Laws, 1990; Otero *et al.*, 1998), indicando el estado nutricional derivado de la disponibilidad de nitrógeno. En la fase estacionaria del cultivo discontinuo la relación C:N ha presentado valores altos indicando la falta de disponibilidad de nutrientes, siendo superiores para *R. lens* y *C. placoidea*: 9,63 y 9,07, respectivamente, mientras que se registraron valores menores en *R. reticulata* y *R. salina*: 7,24 y 7,00, respectivamente (Figura 13A).

Los valores de la relación C:N obtenidos al final del cultivo discontinuo para *R. lens* y *C. placoidea* fueron muy superiores a los obtenidos por Coutinho (2008), que obtuvo una relación de 4,37, en condiciones limitantes de nutrientes, debido a la mayor irradiancia utilizada en este trabajo.

En la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos, el menor crecimiento y productividad de *R. reticulata* (Figura 12) se reflejó en una mayor relación C:N (7,8), que en las demás criptófitas: *R. salina* (6,1) > *C. placoidea* (5,61) > *R. lens* (5,08), (Figura 13B). Como sería de esperar, los valores de la relación C:N disminuyeron en la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos al aplicarse tasas de renovación diarias de un 30%. No obstante, en *R. reticulata*, se verificó un incremento de la relación C:N en la fase de cultivo semicontinuo. La disminución de la densidad celular y bajo crecimiento llevó a una mayor irradiancia efectiva para las células de *R. reticulata*, justificando el incremento de la relación C:N.

En general, las criptófitas presentaron valores de relación C:N más bajos que otras microalgas cultivadas en condiciones idénticas y comúnmente utilizadas en acuicultura como

*N. gaditana* (7,4) (Ferreira *et al.*, 2009); T-ISO (8,6-10,6) (Ferreira *et al.*, 2008; 2011); *I. galbana* (8,8) (Seixas *et al.*, 2008), reflejando el elevado contenido proteico de estas microalgas.

La elevada relación C:N obtenida en los cultivos discontinuos de *C. placoidea* y *R. lens* se derivó de un bajo contenido proteico obtenido para estas especies, alcanzando un 29,93 y 25,58%, respectivamente, mientras que *R. reticulata* y *R. salina* registraron valores superiores: 37,6 y 42,8% de peso seco, respectivamente. Las criptófitas se caracterizan por su elevado contenido proteico, ya demostrado por otros autores que obtuvieron valores entre 53 y 68% para varias especies de criptófitas en la fase logarítmica de crecimiento en cultivos discontinuos (Dunstan *et al.*, 2005). Sin embargo en la fase estacionaria de cultivos discontinuos se obtuvieron valores inferiores a 45%, similares a los obtenidos por Coutinho (2008) en las mismas condiciones.

La disminución de la relación C:N en los cultivos semicontinuos resultó en un incremento en el contenido proteico (% peso seco) de las microalgas. *R. lens* en la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos (*steady state*) presentó el mayor contenido proteico (57,48%) superando los valores de *R. salina* (48,1%), *C. placoidea* (46,45%) y *R. reticulata* (38,8%), siendo estos valores inversamente proporcionales a los valores de la relación de C:N (Figura 13B). A pesar de presentar el menor contenido proteico en porcentaje de peso, el contenido proteico celular en *R. reticulata* representa 81,53 pg.célula<sup>-1</sup>, seguido de *R. salina* (60,45 pg.célula<sup>-1</sup>), *R. lens* (54,13 pg.célula<sup>-1</sup>) y *C. placoidea* (43,24 pg.célula<sup>-1</sup>).

El elevado contenido proteico característico de las criptófitas fue demostrado por Seixas *et al.*, (2008) al obtener un 62% de contenido proteico en *R. lens*, mientras que las microalgas comúnmente utilizadas en acuicultura *T. suecica*, *I. galbana* y T-ISO obtuvieran alrededor de 42-44%, cultivadas en sistema semicontinuo, corroborado por otros autores (Otero *et al.*, 1997b; Otero y Fábregas, 1997; McCausland *et al.*, 1999; Renaud *et al.*, 1999; Dunstan *et al.*, 2005; Coutinho, 2008; Ferreira *et al.*, 2008; 2011). Dunstan *et al.* (2005) sugiere también que la proteína de este género es de alta calidad sobre la base de los resultados obtenidos sobre su composición en aminoácidos.

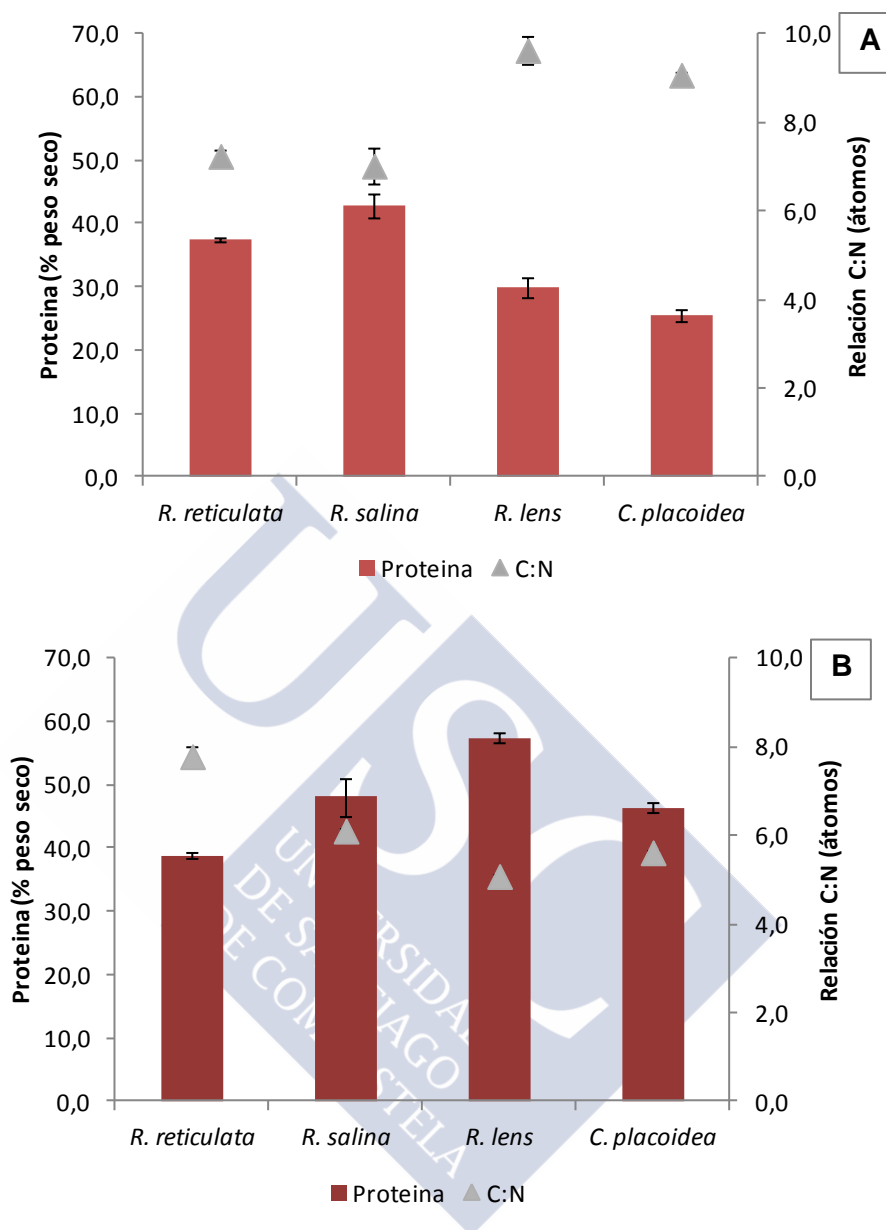


Figura 13 - Contenido proteico (% peso seco) y relación C:N para *R. reticulata*, *R. salina*, *R. lens* y *C. placoides* en la fase estacionaria del cultivo discontinuo (A) y en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo, con tasa de renovación diaria de 30%(B). Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro con nutrientes ajustados a 8mM de NO<sub>3</sub> y mantenidos con una irradiancia de 147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (n=3).

Las criptófitas se caracterizan por su elevado contenido en ficobiliproteínas, siendo éste muy diferente en las distintas especies de criptófitas estudiadas debido a su diferente morfología, representando hasta un 27,57% en *C. placoidea* y un 19,39, 9,97 y 9,82% del total de proteína para *R. salina*, *R. lens* y *R. reticulata* respectivamente en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo (Figura 14). Como era de esperar se observó mayor contenido de ficoeritrinas en las microalgas rojas *R. reticulata*, *R. salina* y *R. lens*, representando entre 50 y 90% del contenido total de ficobiliproteína, mientras que para la especie verde-azul *C. placoidea* la aloficocionina y ficocianina son las ficobiliproteínas mayoritarias, representando un 75% del total de ficobiliproteínas. El mayor contenido de ficoeritrinas se ha observado en *R. salina*, 6,05 pg.célula<sup>-1</sup>, ligeramente superior a los obtenidos por *R. reticulata*, *R. lens* y *C. placoidea* con 6,64, 5,01 y 3,40 pg.célula<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 14).

Los bajos valores de la relación C:N, relacionados con el elevado contenido proteico y presencia de ficobiliproteínas ha sido encontrado en otros trabajos para especies de corptófitas. Freire (2015), en las mismas condiciones de cultivo y más irradiancia (242  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), obtuvo la misma relación C:N para *R. lens* (5,08), presentando valores similares para el contenido proteico (56,34%) y contenido en ficoeritrina ligeramente superior en peso, 6,16 pg.célula<sup>-1</sup>, representando alrededor de un 10% de la proteína, al igual que lo obtenido en este trabajo. Para la misma especie cultivada en botellones de 5L, Seixas *et al.* (2008 y 2009) obtuvo una relación C:N de aproximadamente 4,5, en concordancia con el elevado contenido proteico de esta especie (55-62%), de los cuales 12% son ficoeritrina (7,8 pg.célula<sup>-1</sup>). El mayor contenido en ficoeritrina observado en Seixas (2008; 2009) se puede deber a la menor disponibilidad de luz cuando las células se cultivan en el botellón de 5L (30 cm de diámetro).

La elevada relación C:N y bajo contenido proteico obtenido en los cultivos semicontinuos de *R. reticulata*, derivada de su baja densidad celular de estabilización y que indica estrés del cultivo debido a excesiva exposición a la luz (fotosaturación) justifica su elevado contenido lipídico (47,8%), aproximadamente el doble de las demás especies: *C. placoidea* (17,8%), *R. salina* (23,0%) y *R. lens* (15,8%) (Figura 15). El contenido de carbohidratos en las cuatro especies ha sido diferente, con el menor contenido registrado en *R. lens* con 8,78%, mientras que las demás presentaron valores superiores a 10%: 9,46% (*R. reticulata*) < 11,30% (*C.*

*placoidea*) < 12,58% (*R. salina*) (Figura 15). El contenido lipídico obtenido en este trabajo fue ligeramente inferior a los obtenidos por Coutinho (2008) en las mismas condiciones de cultivo para *R. lens* (22,23%), pero son superiores a los obtenidos por Seixas *et al.* (2008 y 2009) que obtuvo 12% de lípidos para *R. lens*, una vez que cultivada en botellón la luz incidente fue menor y consecuentemente menor contenido lipídico. Seixas *et al.* (2008 y 2009) obtuvo valores para el contenido de carbohidratos ligeramente superiores en *R. lens* (11%), sin embargo el contenido en carbohidratos obtenido por Coutinho (2008) fue superior para la misma microalga (17,6%) en condiciones similares de cultivo. Valores similares fueron obtenidos por Dunstan *et al.* (2005) para diferentes especies de criptófitas en la fase log de cultivo *batch* con fracciones de lípidos y carbohidratos entre 18-28% y 9-24% respectivamente.

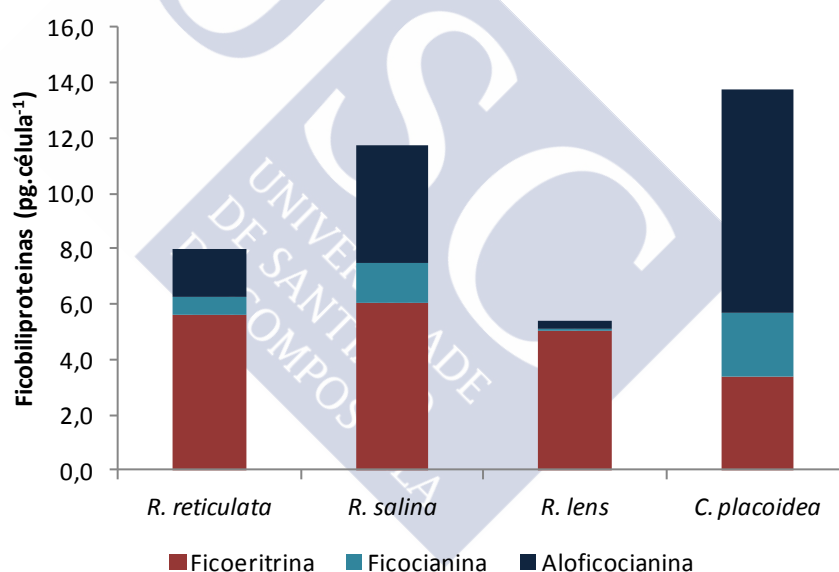


Figura 14 - Contenido de ficobiliproteínas (pg.célula<sup>-1</sup>) de las diferentes especies de criptófitas en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo, con tasa de renovación diaria de 30%. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro con nutrientes ajustados a 8mM de NO<sub>3</sub> y mantenidos con una irradiancia de 147 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (n=3).

La elevada relación C:N y bajo contenido proteico obtenido en los cultivos semicontinuos de *R. reticulata*, derivada de su baja densidad celular de estabilización y que indica estrés del

cultivo debido a excesiva exposición a la luz (fotosaturación) justifica su elevado contenido lipídico (47,8%), aproximadamente el doble de las demás especies: *C. placoidea* (17,8%), *R. salina* (23,0%) y *R. lens* (15,8%) (Figura 15). El contenido de carbohidratos en las cuatro especies ha sido diferente, con el menor contenido registrado en *R. lens* con 8,78%, mientras que las demás presentaron valores superiores a 10%: 9,46% (*R. reticulata*) < 11,30% (*C. placoidea*) < 12,58% (*R. salina*) (Figura 15). El contenido lipídico obtenido en este trabajo fue ligeramente inferior a los obtenidos por Coutinho (2008) en las mismas condiciones de cultivo para *R. lens* (22,23%), pero son superiores a los obtenidos por Seixas *et al.* (2008 y 2009) que obtuvo 12% de lípidos para *R. lens*, una vez que cultivada en botellón la luz incidente fue menor y consecuentemente menor contenido lipídico. Seixas *et al.* (2008 y 2009) obtuvo valores para el contenido de carbohidratos ligeramente superiores en *R. lens* (11%), sin embargo el contenido en carbohidratos obtenido por Coutinho (2008) fue superior para la misma microalga (17,6%) en condiciones similares de cultivo. Valores similares fueron obtenidos por Dunstan *et al.* (2005) para diferentes especies de criptófitas en la fase log de cultivo *batch* con fracciones de lípidos y carbohidratos entre 18-28% y 9-24% respectivamente.

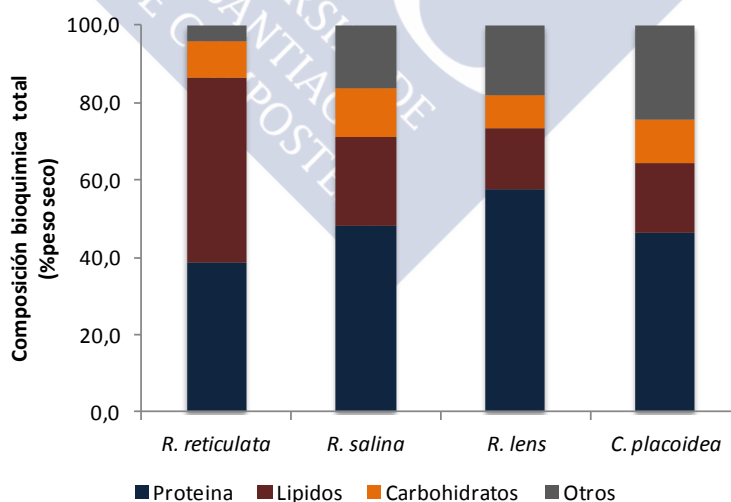


Figura 15 - Contenido celular (% peso seco) de proteínas, lípidos y carbohidratos de las diferentes especies de criptófitas en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo, con una tasa de renovación diaria de 30%. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro con nutrientes ajustados a 8mM de  $\text{NO}_3$  y mantenidos con una irradiancia de  $147 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (n=3).



Como era de esperar (Otero y Fábregas, 1997; Ferreira, 2007; Coutinho, 2008), con la alteración del sistema de cultivo aplicado en los cultivos se registró una marcada disminución del contenido de ácidos grasos saturados en *R. lens* y *C. placoidea*, que fue bastante superior en la fase estacionaria del sistema discontinuo, en que se habían registrado valores de 74,6% y 52,8%, respectivamente. No obstante, a la diferencia del observado en *R. lens* y *C. placoidea*, en *R. reticulata* y *R. salina*, se observaron solo pequeñas diferencias en el perfil de ácidos grasos en ambas fases de cultivo, observándose incluso un ligero incremento en el contenido de ácidos grasos saturados al pasarse a un sistema semicontinuo, que habían representado un 56,1% y un 34,4% del total de ácidos grasos en el sistema discontinuo. El incremento en la fracción de ácidos grasos saturados en los cultivos de *R. reticulata* y *R. salina* puede indicar la acumulación de sustancias de reserva debido al estrés causado por la disminución en la densidad celular, resultando en una mayor irradiancia efectiva por célula en estos cultivos, que se ve también reflejada en la mayor relación C:N observada en estas especies, indicando la posible existencia de algún otro factor que limita el crecimiento o un mecanismo diferente de control del funcionamiento de los fotosistemas y las rutas metabólicas relacionadas con la fijación de C.

Los ácidos grasos monoinsaturados no sufrieron alteraciones en su contenido con el cambio del sistema de cultivo en ninguno de los cultivos, no obstante, inversamente a la disminución de los ácidos grasos saturados, se registró un marcado incremento en el contenido total de PUFAs en *R. lens* y *C. placoidea* que habían representado un 18,5% y un 43,0% del total de ácidos grasos en el final del cultivo discontinuo. El incremento de los ácidos grasos saturados, en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo, en *R. reticulata* y *R. salina* resultó en una disminución del contenido de PUFAs que registraron un 36,4% y un 50,8% en la fase final del cultivo discontinuo, inversamente a lo esperado.

A l igual que el observado en este trabajo para *R. lens* y *C. placoidea*, Dunstan *et al.* (2005) registró un incremento del contenido de ácidos grasos poliinsaturados, a la vez que se observa una disminución del contenido de ácidos grasos saturados de un cultivo *batch* para un cultivo semicontinuo.

En cuanto a la composición de ácidos grasos de las especies *R. reticulata*, *R. salina* y *R. lens* los ácidos grasos mirístico (14:0) y palmítico (16:0) se detectaron en porcentajes muy similares, mientras que en *C. placoidea* se detectó mayoritariamente el 16:0 (Tabla 4), en la



fase de estabilización del cultivo semicontinuo. En *R. reticulata* se obtuvieron las mayores fracciones de los ácidos grasos 14:0 y 16:0, con aproximadamente 24 y 33%, respectivamente, reflejando el mayor contenido de ácidos grasos saturados (60%) asociados a lípidos de reserva, justificando el mayor contenido lipídico detectado. En *R. salina*, el ácido mirístico y el palmítico se detectaron alrededor de un 21 y 25% respectivamente, mientras que en *R. lens* un 17 y 14% respectivamente. El ácido palmítico representó la mayor fracción del perfil de ácidos grasos de *C. placoidea* con un 31% del total de ácidos grasos, mientras que el mirístico apenas representó un 5,5%. Para *R. lens* y *C. placoidea* el contenido de ácidos grasos saturados fue similar con valores entre el 32 y 37%, mientras que para *R. salina* representaron alrededor del 47% del total de ácidos grasos.

El ácido oleico (18:1n9) fue el único ácido graso monoinsaturado detectado en las cuatro especies de criptófitas, con fracciones comprendidas entre aproximadamente 4 y 9% del total de ácidos grasos. El mayor contenido se detectó en *R. salina*, con un 8,38% del total de ácidos grasos, seguido de *R. reticulata* (5,93%), *R. lens* (4,81%) y *C. placoidea* (4,09%).

Otra característica de las criptófitas es su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados especialmente los de cadena corta. El ácido linoleico (18:2n6) se detectó entre un 5 y un 11% del total de ácidos grasos, en los cultivos semicontinuos de *R. reticulata*, *R. salina* y *C. placoidea*, pero en los cultivos de *R. lens* no ha sido detectado, aunque otros autores lo han detectado en bajas cantidades en sus cultivos (Seixas *et al.*, 2008 y 2009). Los ácidos grasos alfa linoleico (18:3n3) y estearidónico (18:4n3) representan una importante fracción de ácidos grasos poliinsaturados en las criptófitas. El primero (18:3n3), presente en las cuatro microalgas, se detectó mayoritariamente en los cultivos de *C. placoidea* (23,41%) y *R. lens* (19,40%), representando la mitad en los cultivos de *R. reticulata* (10,87%) y *R. salina* (8,57%). El 18:4n3 representó la mayor fracción en los ácidos grasos detectados en *R. lens*, con un 31 % del total de ácidos grasos. En los cultivos de *C. placoidea*, el 18:4n3 representó casi un 20% del total de ácidos grasos, mientras que se detectó en menor cantidad en *R. reticulata* (7,04%) y *R. salina* (5,43%).

De los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3) se detectó en las cuatro criptófitas, alcanzando casi un 10% del total de ácidos grasos en *R. salina*, y un 7,55 y 5,99% en *R. lens* y *C. placoidea*, respectivamente, mientras que en

los cultivos de *R. reticulata* representó menos de un 2% del total de ácidos grasos. El ácido graso docosahexaenoico (DHA, 22:6n3) registró un 12,56% del total de ácidos grasos en los cultivos de *R. salina*, cuatro veces superior al detectado en *R. lens* (3,21%), mientras que en *R. reticulata* representó menos de 1%. En los cultivos de *C. placodea* no se ha detectado el ácido graso DHA, no obstante el ácido graso docosapentaenoico (DPA, 22:5n6) representó un 2,67% del total de ácidos grasos, que no fue detectado en ninguna otra criptófitia.

Es de destacar el elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) obtenido en los cultivos semicontinuos de *R. lens* y *C. placodea*, 62,30 y 58,49% del total de ácidos grasos, respectivamente, mientras que en *R. salina* representaron aproximadamente un 45% del total de ácidos grasos. El menor contenido de PUFAs se registró en *R. reticulata*, logrando solamente un 33,39% del total de ácidos grasos.

Los perfiles de ácidos grasos de las cuatro criptófitas descritos en este trabajo coinciden con los referenciados por otros autores para especies del grupo, siendo característicos del grupo de las *Cryptophyceae* el ácido mirístico (14:0), el ácido palmítico (16:0), el ácido oleico (18:1n9), el ácido linoleico (18:3n3), el ácido estearidónico (18:4n3), presentando también en menores cantidades el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6n3) (Brown *et al.*, 1989 y 1997; Dunstan *et al.*, 2005, Guevara *et al.*, 2011; Leonardos y Lucas, 2000; Tremblay *et al.*, 2007; Zhukova y Aizdaicher, 1995). Leonardos y Lucas (2000) produjeron *R. reticulata* en sistema continuo en diferentes condiciones de nutrientes y luz, obteniendo diferentes proporciones de ácidos grasos; siendo el perfil de ácidos grasos obtenido en condiciones de elevada intensidad luminosa y limitado por nitrógeno por estos autores similar al obtenido en nuestro trabajo, obteniendo elevadas fracciones de ácidos grasos saturados (49,6%) y bajas fracciones de PUFAs (33,2%). Leonardos y Lucas (2000) demostraron que es posible disminuir o aumentar las fracciones de ácidos grasos saturados e insaturados hasta un 12,9 y 78,0% respectivamente, bajando la intensidad luminosa. En el presente trabajo los cultivos de *R. reticulata* siempre presentaron bajas densidades celulares, resultando en una irradiancia efectiva excesiva. Se pudo observar un perfil idéntico tanto en *batch* como en *steady state*, sin embargo, el menor contenido de ácidos grasos saturados y el mayor contenido de PUFAs se obtuvieron en condiciones *batch*, posiblemente por la menor cantidad de luz disponible por célula debido a la mayor densidad celular en la fase final del cultivo discontinuo.

Dunstan *et al.* (2005) obtuvieron para *R. salina* en sistema semicontinuo una menor cantidad de ácidos saturados y mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, 16,1 y 66,4% respectivamente, ya que las microalgas se cultivaron en mayor volumen (10L) y se alcanzaron menores densidades siendo la irradiancia efectiva en las células menor, sin embargo se obtuvieron fracciones similares de 20:5n3 y 22:6n3. Guevara *et al.* (2011) y Tremblay *et al.* (2007) obtuvieron un perfil de ácidos grasos saturados y poliinsaturados similares a los descritos en este trabajo (30-37 % y aproximadamente 47%), sin embargo, en Guevara *et al.* (2011) el muestreo es de la fase log en el crecimiento *batch*.

El perfil de ácidos grasos obtenidos en *R. lens* es similar a los obtenidos por Coutinho (2008) en cultivos semicontinuos en sistemas idénticos y a los obtenidos por Seixas *et al.* (2008 y 2009) en botellones de 5L. La fracción de PUFAs rondó los 60%, siendo la fracción de ácidos grasos saturados inferior a 30% mientras que en este trabajo llegó a un 32%, siendo estas diferencias justificadas por la luz incidente, ya que la irradiancia en los cultivos fue superior en este trabajo.

El ácido graso 22:5n6 detectado solo en *C. placoidea* había sido ya descrito por Dunstan *et al.* (2005), presentando un perfil de ácidos grasos similar al obtenido también en *steady state*. Sin embargo estos autores obtuvieron menor contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y PUFAs más elevados, lo que es justificable por la menor irradiancia efectiva en sus cultivos.

Las criptófitas *R. lens* y *C. placoidea* mostraron crecimiento y productividades superiores frente las criptófitas *R. salina* y *R. reticulata*. La utilización de sistemas semicontinuos con TR 30% permitió obtener valores de productividad competitivos con otras especies comúnmente utilizadas en acuicultura, con una biomasa con composición bioquímica estable, confirmando los resultados obtenidos previamente por Coutinho (2008), Seixas *et al.* (2008; 2009) y Freire (2015) para *R. lens*, y contrariamente a la inestabilidad generalmente aceptada de los cultivos de estas especies y descrita en los cultivos discontinuos por Knuckey *et al.* (2005) para *Rhodomonas* sp.

La composición bioquímica de las criptófitas se caracterizó por su elevado contenido proteico, que en sistema semicontinuo se incrementó marcadamente en *R. lens* y *C. placoidea* hasta un 58 y 47%, respectivamente, al igual que el contenido de PUFAs que incrementó

hasta un 62 y 59%, respectivamente, confirmando la importancia del tipo de sistema de cultivo en la obtención de biomasa de elevado valor nutricional para su utilización en acuicultura en la alimentación y/o enriquecimiento de animales filtradores. Contrariamente a lo esperado, en *R. reticulata* y *R. salina* el contenido de ácidos grasos saturados se incrementó mientras que el contenido de PUFAs disminuyó en el sistema semicontinuo indicando mayor sensibilidad de estas especies a la luz, registrándose igualmente una menor productividad, que podrá indicar también algún requerimiento nutricional específico no cubierto.

Las elevadas productividades obtenidas por las criptófitas, en particular *R. lens* y *C. plaocidea* (384 y 339 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>) en este trabajo que presentaron valores bastante superiores a los obtenidos por otras especies en condiciones muy similares de cultivo en otros trabajos realizados en el laboratorio de la USC, que se encuentran entre las más elevadas descritas en la bibliografía. Fábregas *et al.* (1996) obtuvo 250 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> para *Phaeodactylum tricornutum* y Ferreira *et al.* (2008; 2009 y 2011) 152 y 263 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> para *Nannochloropsis gaditana* y *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO), respectivamente. Estos resultados confirman el potencial de estas especies para su aplicación en acuicultura y en otros campos biotecnológicos.



Tabla 4 - Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las cuatro especies de criptófita en la fase estacionaria del cultivo discontinuo y en la fase de estabilización de los cultivos en la fase semicontinua, con tasa de renovación diaria de 30%. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro con nutrientes ajustados a 8mM de NO<sub>3</sub> y mantenidos con una irradiancia de 147 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (n=3).

Ácidos grasos	<i>R. reticulata</i>		<i>R. salina</i>		<i>R. lens</i>		<i>C. placoides</i>	
	fase estacionaria	<i>steady state</i>	fase estacionaria	<i>steady state</i>	fase estacionaria	<i>steady state</i>	fase estacionaria	<i>steady state</i>
<b>14:0</b>	23,68 ± 2,17	25,75 ± 3,46	15,54 ± 1,26	20,65 ± 3,32	42,52 ± 1,14	16,64 ± 1,07	12,11 ± 3,05	5,45 ± 1,11
<b>16:0</b>	30,62 ± 0,54	33,76 ± 1,59	16,92 ± 3,70	24,63 ± 2,77	30,98 ± 0,18	13,88 ± 1,73	38,96 ± 1,67	31,04 ± 2,94
<b>16:1</b>	0,63 ± 0,01	0,55 ± 0,03	n.d.	n.d.	n.d.	1,12 ± 0,64	n.d.	n.d.
<b>18:0</b>	1,75 ± 0,26	2,40 ± 0,38	2,40 ± 0,69	1,44 ± 1,05	1,10 ± 0,10	1,25 ± 0,33	1,71 ± 0,22	0,93 ± 0,06
<b>18:1n9</b>	3,72 ± 0,28	4,14 ± 0,58	8,70 ± 1,68	8,38 ± 0,79	6,86 ± 0,77	4,81 ± 0,09	4,19 ± 0,18	4,09 ± 0,35
<b>18:2n6</b>	8,80 ± 0,78	11,20 ± 1,01	6,61 ± 1,02	5,23 ± 0,54	0,74 ± 0,01	n.d.	8,34 ± 0,18	6,94 ± 0,73
<b>18:3n6</b>	0,96 ± 0,09	1,22 ± 0,11	1,11 ± 0,14	0,78 ± 0,23	n.d.	n.d.	0,17 ± 0,02	0,29 ± 0,03
<b>18:3n3</b>	12,96 ± 1,48	10,85 ± 1,16	13,09 ± 1,50	8,57 ± 1,41	9,26 ± 0,16	19,40 ± 0,93	19,90 ± 1,91	23,41 ± 1,50
<b>18:4n3</b>	10,11 ± 1,02	7,12 ± 0,83	10,75 ± 0,21	5,43 ± 0,80	6,19 ± 0,31	30,99 ± 1,41	10,32 ± 0,91	19,11 ± 1,93
<b>20:4n6</b>	0,27 ± 0,07	0,38 ± 0,10	1,80 ± 0,13	1,62 ± 1,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>20:4n3</b>	0,11 ± 0,10	0,12 ± 0,05	0,61 ± 0,09	1,26 ± 0,79	0,14 ± 0,01	1,15 ± 0,10	0,17 ± 0,03	0,08 ± 0,14
<b>20:5n3</b>	2,36 ± 0,74	1,73 ± 0,50	7,71 ± 1,40	9,44 ± 4,69	1,40 ± 0,08	7,55 ± 0,54	3,09 ± 0,68	5,99 ± 0,32
<b>22:5n6</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04 ± ,89	2,67 ± 0,10
<b>22:6n3</b>	0,82 ± 0,29	0,77 ± 0,34	9,14 ± 2,76	12,56 ± 2,69	0,80 ± 0,07	3,21 ± 0,38	n.d.	n.d.
<b>∑ Saturados</b>	56,05 ± 2,27	61,92 ± 4,60	34,86 ± 2,88	46,72 ± 5,05	74,60 ± 0,94	31,78 ± 1,42	52,78 ± 4,48	37,42 ± 4,0
<b>∑ Monoinsaturados</b>	4,35 ± 0,27	4,69 ± 0,57	8,70 ± 1,68	8,38 ± 0,79	6,86 ± 0,77	5,93 ± 0,70	4,19 ± 0,18	4,09 ± ,35
<b>∑ PUFA</b>	36,40 ± 4,52	33,39 ± 4,04	50,81 ± 5,33	44,89 ± 4,24	18,54 ± 0,60	62,30 ± 1,61	43,03 ± 4,30	58,49 ± 3,68

n.d. – no detectado



## 2. Evaluación del crecimiento de las criptófitas *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea* sometidas a dos intensidades luminosas

### 2.1. Justificación y diseño experimental

La luz desempeña un papel primario en la fotosíntesis, pudiendo actuar modificando los requerimientos nutritivos de las especies microalgales. Asimismo, las microalgas necesitan, por un lado, la cantidad de luz necesaria que permita la tasa de crecimiento y por otro lado, que la intensidad no sea tan elevada que pueda provocar un descenso de la tasa de crecimiento debido a fotoinhibición (García-Sánchez *et al.*, 1996; Mechuk *et al.*, 1998). La respuesta a variaciones en la intensidad luminosa se refleja principalmente sobre la tasa de crecimiento (Ginzburg, 1987), así como en el contenido de pigmentos, actividad enzimática (Dionisio *et al.*, 1989 a,b) y composición bioquímica general de las microalgas (Ben-Amotz y Avron, 1983; Dubinsky *et al.*, 1986; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Kitano *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 2002; Bartual *et al.*, 2002).

La presencia de las ficobiliproteínas en las criptófitas las hace más sensibles a los cambios de intensidad luminosa, lo que se refleja en la concentración de estos pigmentos y a la utilización del nitrógeno presente en el medio. Este sistema de pigmentos permite a las criptófitas absorber una amplia gama de longitudes de onda y optimizar su crecimiento en longitudes de onda azules y verdes. En general, algas con más pigmentos accesorios tienen irradiancias óptimas de crecimiento más bajas y los grupos que contienen ficobiliproteínas se adaptan mejor a la luz tenue (Brown y Richardson, 1968), habiendo sido identificada la preferencia de las microalgas de este grupo por intensidades luminosas más bajas (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Bartual *et al.*; 2002). Sin embargo, en trabajos previos llevados a cabo en el laboratorio de la USC, mostraron que es posible cultivar la criptófita *R. lens* con alta intensidad luminosa (Freire, 2015), incrementando la productividad de la misma, con ligeros cambios en la composición bioquímica, frente a los resultados obtenidos por Coutinho (2008) con menor intensidad luminosa.

Así, con el propósito de verificar su mayor sensibilidad a alta intensidad de luz, se estudió el crecimiento celular e influencia de la luz en la composición bioquímica de las microalgas



*R. lens* y *C. placoidea* que ya se habían mostrado más robustas en el escalado inicial desde cultivo de cepa a volúmenes mayores en el laboratorio (datos no presentados).

La comparación del crecimiento de las especies *R. lens* y *C. placoidea* en diferentes condiciones de luz, se hizo en tubos de cultivo de 80 mL con dos intensidades luminosas diferentes (LL – 74 y HL – 147  $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) con un ciclo de luz 12:12, con salinidad ajustada a 35‰ y utilizando la formulación de medio Algal (Fábregas *et al.*, 1984) ajustado a 8mM de  $\text{NO}_3$ , tal como se describe en Materiales y Métodos.

Se dejaron crecer los cultivos hasta que alcanzaron la fase estacionaria, iniciándose el cultivo semicontinuo mediante la aplicación de una tasa de renovación diaria de 30% de volumen de cultivo. En la fase estacionaria de los cultivos discontinuos y la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos se recogió la biomasa microalgal por centrifugación para posterior análisis bioquímico tal como describe en la sección Materiales y Métodos.

## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Crecimiento y productividad

Los cultivos se iniciaron con densidades muy similares  $4,86$  y  $5,48 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$  para *C. placoidea* y *R. lens* respectivamente. Durante la fase de crecimiento exponencial en el cultivo *batch* se pudo observar una tasa de crecimiento ligeramente superior en las condiciones de menor intensidad luminosa en ambas microalgas: *R. lens* LL ( $0,56 \text{ día}^{-1}$ ) > HL ( $0,50 \text{ día}^{-1}$ ); *C. placoidea* LL ( $0,58 \text{ día}^{-1}$ ) > HL ( $0,57 \text{ día}^{-1}$ ).

La fase estacionaria se alcanzó el día 7, empezándose en este día el régimen semicontinuo con tasa de renovación diaria de 30%. Las densidades celulares máximas obtenidas por *R. lens* se observaron al día 6 de crecimiento en ambas intensidades luminosas con  $15,38 \pm 0,51$  y  $14,15 \pm 0,51 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ , siendo la mayor densidad obtenida por la microalga en condiciones de menor intensidad de luz (LL). El régimen semicontinuo se inició al día 7 de cultivo, empezando a estabilizarse a partir del día 13 densidades de estabilización de  $11,94 \pm 1,00$  y  $13,60 \pm 0,58 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ , siendo significativamente superior la densidad alcanzada por la *R. lens* en condiciones de mayor intensidad luminosa (HL), (Test-t,  $p < 0,05$ )



(Figura 16A). Para la especie *C. placoidea* las dos intensidades de luz no mostraron tener efecto en el crecimiento discontinuo de esta microalga que presentaron densidades muy similares al final de la fase de crecimiento alcanzando  $14,93 \pm 1,15$  y  $14,7 \pm 0,71 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, para LL y HL respectivamente el día 7. Una vez alcanzada la fase estacionaria del cultivo discontinuo en el día 7, se inició el cultivo semicontinuo con tasa de renovación diaria de 30%, estabilizándose los cultivos a partir del día 13.

Los cultivos de *C. placoidea* también alcanzaron densidades celulares de estabilización muy similares con las dos intensidades de luz probadas, estabilizándose en  $12,14 \pm 0,81 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> con la mayor intensidad de luz mientras que en condiciones de menor intensidad de luz se estabilizó en  $11,62 \pm 0,51 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> (Figura 16B). A pesar de que esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Test-t,  $p > 0,05$ ), parece existir una tendencia al cultivo sometido a mayor irradiancia a incrementar su densidad celular en el tiempo.

En ambas especies de microalgas se observaron densidades celulares similares en las dos intensidades de luz sin embargo, en *R. lens* las mayores densidades de la fase estacionaria se observaron en condiciones de menor intensidad luminosa, mientras que las mayores densidades de la estabilización de los cultivos en la fase semicontinua se observaron en condiciones de mayor intensidad de luz (Figura 17).

En los cultivos semicontinuos el efecto de la luz produjo pequeñas diferencias en las densidades celulares de estabilización en ambas especies. En *R. lens*, el incremento de la irradiancia resultó en un incremento de la densidad celular de estabilización desde  $11,9 \times 10^6$  ( $74 \mu\text{mol photon.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) hasta  $13,6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> ( $147 \mu\text{mol photon.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Al incrementar ulteriormente la irradiancia con respecto a la más elevada utilizada en este experimento ( $229 \mu\text{mol photon.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) en los cultivos de *R. lens* (capítulo 1.3) se obtuvieron valores de densidades celulares de solo ligeramente superiores,  $15,6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, por lo que el incremento de la densidad celular obtenida no es proporcional al incremento de irradiancia indicando que los cultivos pueden estar próximos al punto de saturación por luz.

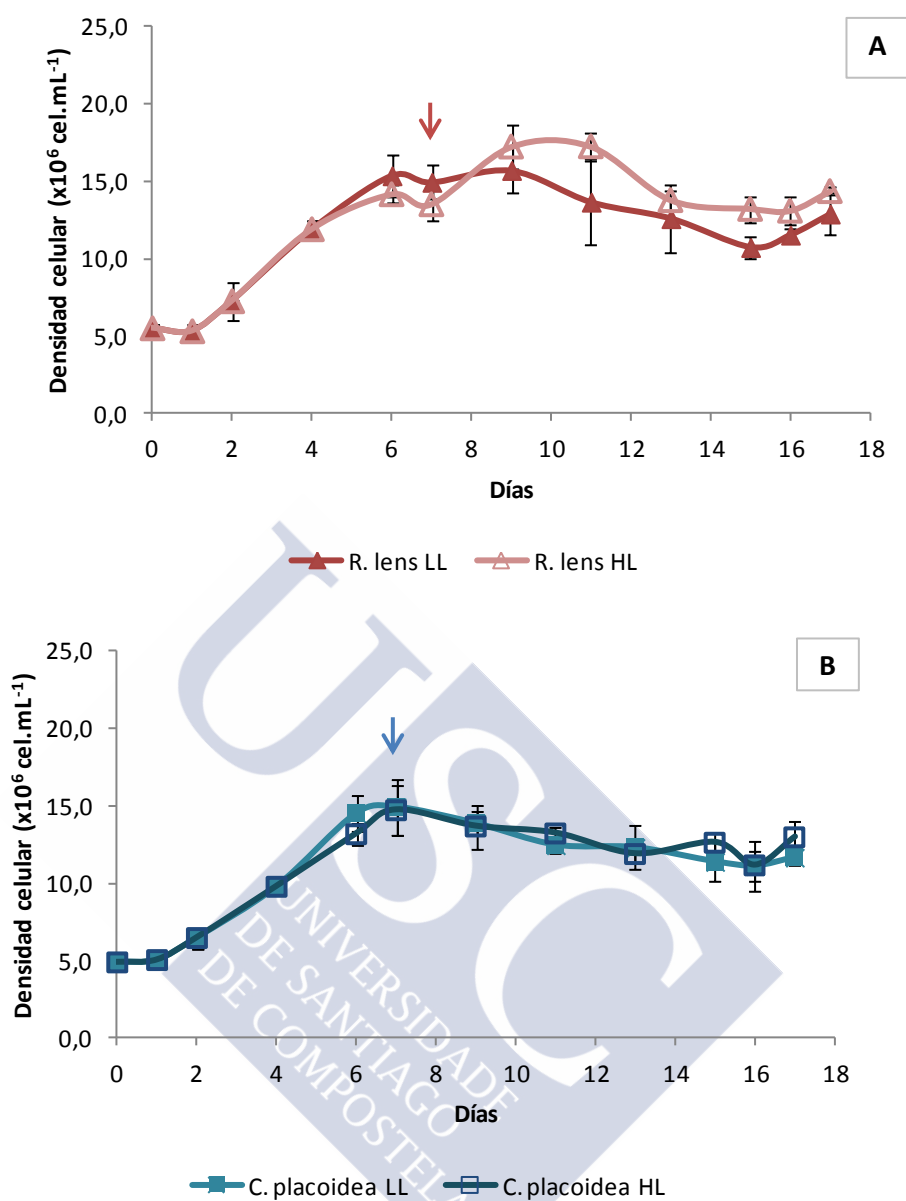


Figura 16 – Densidades celulares de las especies de criptófitas *R. lens* (A) y *C. placoidea* (B) sometidas a dos intensidades luminosas. Los primeros 7 días corresponden a la fase de cultivo discontinuo (*batch*), iniciándose el semicontinuo (flecha) con tasa de renovación diaria de 30% de volumen. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL de 3,3 cm de diámetro mantenidos con dos irradiancias diferentes (LL – 74 y HL – 147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) y nutrientes ajustados a 8mM de  $\text{NO}_3$  (n=3).

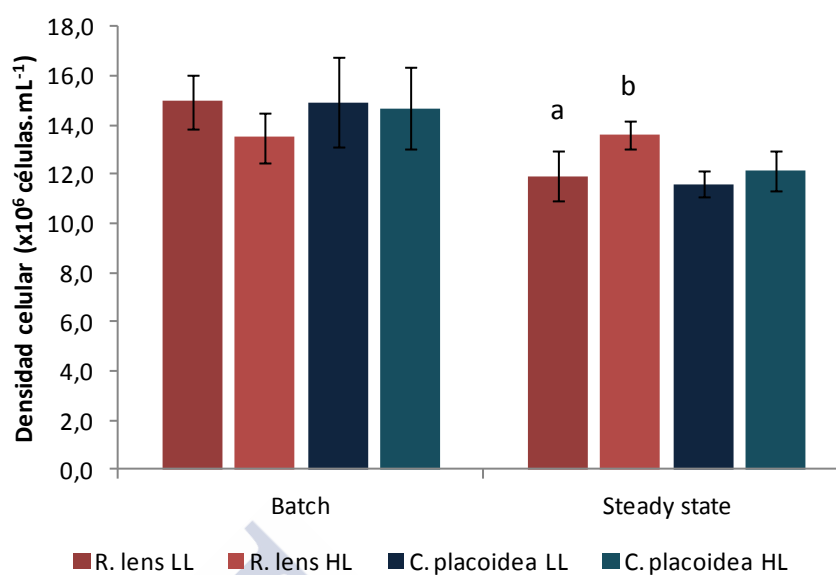


Figura 17 - Densidades celulares máximas en la fase estacionaria de cultivos discontinuos (*batch*) y densidades de estabilización en cultivo semicontinuo (*steady state*), con una tasa renovación diaria de 30% del volumen, para *R. lens* y *C. placoidea*. Los cultivos se realizaron en tubos de 80mL con 3,3 cm de diámetro mantenidos con dos irradiancia diferentes (LL – 74 y HL – 147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) y con nutrientes ajustados a 8mM de  $\text{NO}_3$  (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos dentro de la misma especie (Test-t,  $p < 0,05$ ).

En el estado de equilibrio de los cultivos semicontinuos la mayor productividad volumétrica en peso se obtuvo en el cultivo con mayor densidad de estabilización, pero las diferencias en peso son más acusadas de las diferencias observadas en número de células, ya que en los cultivos de *R. lens* sometidos a mayor irradiancia (HL), se alcanzaron  $384 \pm 48,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ , mientras que en condiciones de menor intensidad luminosa, la misma especie alcanzó  $300 \pm 1,9 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}$ . Esta diferencia está también presente en el peso celular, siendo la *R. lens* en HL más pesada que en LL,  $94,18 \text{ pg.célula}^{-1}$  y  $83,81 \text{ pg.célula}^{-1}$ , respectivamente (Figura 18).

Al igual que en *R. lens*, la mayor productividad y peso celular se observaron en condiciones de mayor intensidad luminosa para la especie *C. placoidea*, con  $339 \pm 15,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  y  $93,10 \text{ pg.célula}^{-1}$  respectivamente, siendo estos valores significativamente superiores (Test-t,  $p < 0,05$ ) a los obtenidos en condiciones de menor intensidad luminosa alcanzando  $277 \pm 10,9 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  de productividad y  $79,34 \text{ pg.célula}^{-1}$  de peso celular (Figura 18). Al

igual que en *R. lens* la irradiancia incidente tuvo un efecto mucho mayor sobre el peso celular que sobre el número de células.

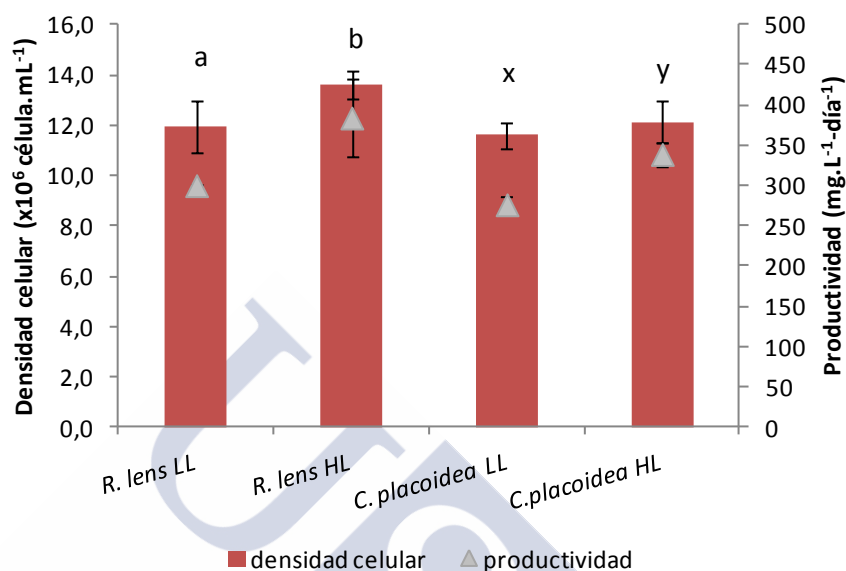


Figura 18 - Densidad celular de estabilización (*steady state*) y productividad en peso seco en cultivo semicontinuo, con una tasa renovación diaria de 30% del volumen, para *R. lens* y *C. placoidea*. Los cultivos se realizaron en tubos de 80mL con 3,3 cm de diámetro mantenidos con dos irradiancias diferentes (LL – 74 y HL – 147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) y nutrientes ajustados a 8mM de  $\text{NO}_3$  (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas en entre tratamientos dentro de la misma especie (Test-t,  $p < 0,05$ ), a, b para las densidades celulares, x, y para las productividades.

### 2.2.2. Composición bioquímica

La relación C:N, relacionada con la tasa de crecimiento y estado celular (Chaup y Laws, 1990; Otero *et al.*, 1998), fue ligeramente menor en los cultivos en condiciones de menor intensidad luminosa en la fase estacionaria de cultivos discontinuos en ambas microalgas, indicando mayor fijación de carbono en los cultivos sometidos a mayor irradiancia (*R. lens* – 9,63 y 9,23; *C. placoidea* – 9,07 y 8,54; HL y LL, respectivamente) (Figura 19A). El elevado valor de la relación C:N obtenido en la fase estacionaria del cultivo discontinuo, debido a la

limitación de nitrógeno en el medio, se reduce marcadamente en ambas microalgas en la fase de estabilización (*steady state*) de los cultivos semicontinuos, con valores inferiores a 6 para esta relación.

Con la disminución de la irradiancia, la relación C:N en los cultivos semicontinuos de *R. lens* disminuyó ligeramente aunque significativamente de un  $5,08 \pm 0,06$  hasta un  $4,88 \pm 0,02$  (Test-t,  $p < 0,05$ ). *C. placoidea* presentó valores superiores a *R. lens*, sin embargo las diferentes intensidades de luz no produjeron diferencias en la relación C:N para esta especie, obteniéndose valores muy similares,  $5,54 \pm 0,03$  y  $5,53 \pm 0,03$ , para LL y HL respectivamente (Figura 19B).

Como sería de esperar, y al igual que lo observado en el capítulo anterior, se registró un fuerte incremento del contenido proteico en la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos donde se alcanzó más de 45% en ambas criptófitas, frente a los valores inferiores al 30% obtenidos en la fase estacionaria del cultivo discontinuo (Figura 19A).

La disminución de la luz no registró diferencias significativas en el contenido proteico en la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos de ambas criptófitas, sin embargo se pudo observar un ligero incremento del contenido proteico con la disminución de la intensidad luminosa. El mayor contenido proteico se observó en *R. lens* que se incrementó de un  $57,5 \pm 0,9\%$  hasta un  $59,3 \pm 2,1\%$  del peso seco, mientras que en *C. placoidea* la disminución de la irradiancia resultó en un incremento de un  $46,9 \pm 4,0\%$  hasta un  $52,5 \pm 5,5\%$  del peso seco (Figura 19B).

El elevado contenido proteico obtenido corrobora los descritos para las criptófitas (McCausland *et al.*, 1999; Renaud *et al.*, 1999; Dunstan *et al.*, 2005; Coutinho, 2008; Seixas *et al.*, 2008; 2009; Freire, 2015), siendo bastante superior a los registrados para otras especies comúnmente utilizadas en acuicultura como *T. suecica*, T-ISO, *I. galbana*, *N. gaditana* (Otero *et al.*, 1997b; Otero y Fábregas, 1997; Ferreira *et al.*, 2008; 2011; Seixas *et al.*, 2008; 2009).

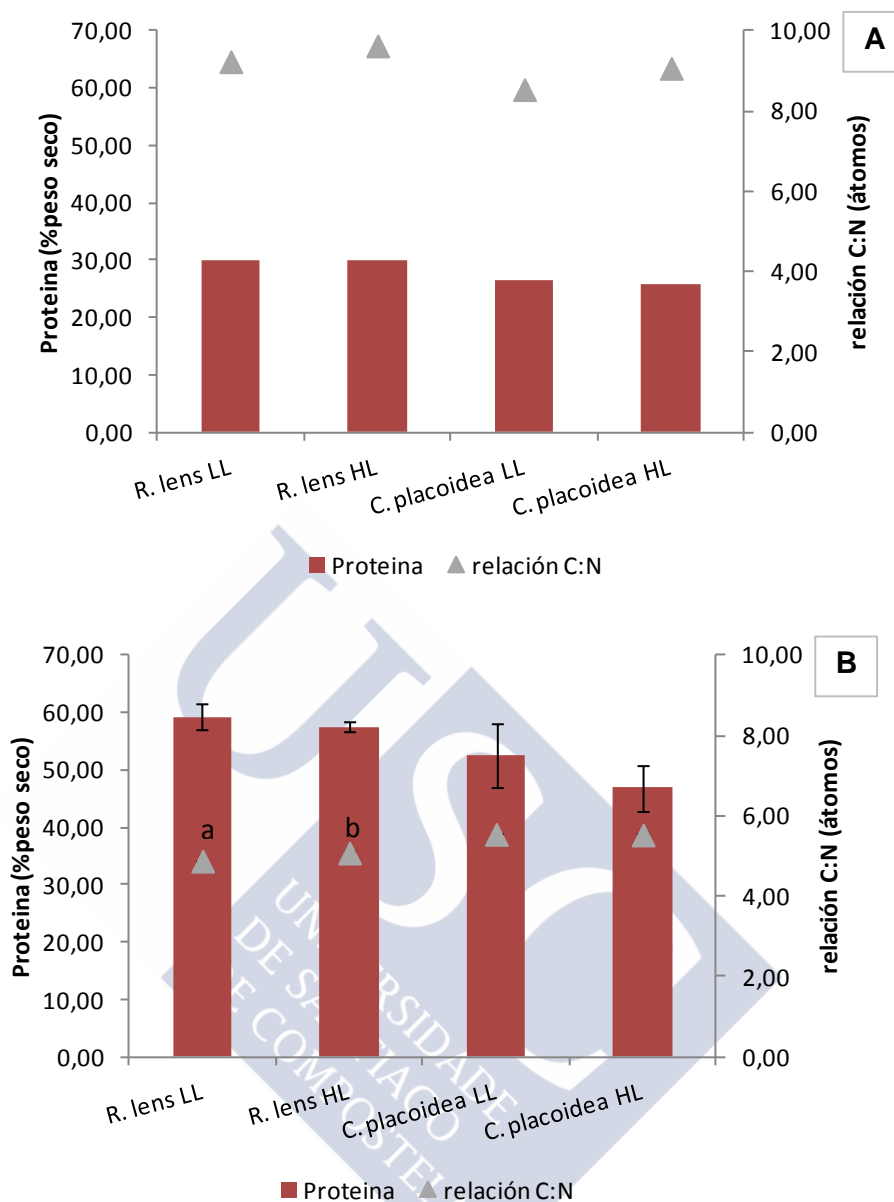


Figura 19- Contenido proteico (% peso seco) y relación C:N para *R. lens* y *C. placoidea* en la fase estacionaria del cultivo discontinuo (A) y en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo (B), con tasa de renovación diaria de 30% de volumen. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro mantenidos con dos irradiancia diferentes (LL – 74 y HL – 147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) y ajustados a 8mM de  $\text{NO}_3$  (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de la misma especie (Test-t,  $p < 0,05$ ).

A pesar de que la relación C:N disminuyó ligera pero significativamente con la disminución de la intensidad luminosa en los cultivos de *R. lens*, la pequeña diferencia

observada en el valor en esa especie, así como lo observado en la relación C:N de *C. placoidea* lleva a creer que las diferentes irradiancias no fueron suficientes para producir diferencias en la composición bioquímica, ya que en T-ISO el incremento de la intensidad de luz llevó a un mayor incremento de relación C:N de 8,6 (Ferreira *et al*, 2011) hasta 10,6 (Ferreira *et al*, 2008). Leonardos y Lucas (2000) incrementó el contenido proteico en diversas especies (*Skeletonema. costatum*, *Chaetoceros muelleri* y *P. lutheri*) al disminuir la intensidad luminosa, en condiciones de nitrógeno saturante (medio f/2), no obstante, la disminución de la intensidad luminosa en *R. reticulata* no produjo diferencias en el contenido proteico, de forma similar a lo observado en los cultivos de *R. lens* y *C. placoidea* en este trabajo. Lo mismo se observa en los resultados de Freire (2015), que triplicó la irradiancia utilizada por Coutinho (2008) en los cultivos de *R. lens*, no registrándose diferencias en el contenido proteico (% de peso seco) en condiciones saturadas de nitrógeno.

El contenido de ficobiliproteínas en ambas criptófitas incrementó con la disminución de la intensidad luminosa, siendo significativamente superior en condiciones LL que en HL en ambas especies (Test-t,  $p < 0,05$ ). Esta diferencia resulta principalmente de la ficobiliproteína dominante de cada especie, ficoeritrina y aloficocianina en *R. lens* y *C. placoidea* respectivamente, que presentaron valores significativamente (Test-t,  $p < 0,05$ ) superiores en condiciones de menor intensidad luminosa. En *R. lens*, una mayor incidencia de luz por célula produjo un descenso de la ficoeritrina, obteniendo  $5,55 \pm 0,07$  y  $5,01 \pm 0,03$  pg.célula<sup>-1</sup> (Test-t,  $p < 0,05$ ) para condiciones de luz LL y HL respectivamente, observándose la misma tendencia con la aloficocianina en *C. placoidea*,  $8,57$  y  $8,07$  pg.célula<sup>-1</sup> (Test-t,  $p < 0,05$ ) para condiciones de LL y HL respectivamente (Figura 20).

El pequeño incremento del contenido proteico y ficobiliproteínas, deriva de la fotoaclimatación de las células a la menor irradiancia ya que al tener menos luz disponible tiene mayor necesidad de pigmentos fotosintéticos proteicos, lo que se ve favorecido por la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

En condiciones de menor intensidad de luz ( $80 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), Coutinho (2008) obtuvo un contenido de ficoeritrinas que representó un 12,4% del contenido proteico, mientras que en Freire (2015), con mayor irradiancia ( $242 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), representaron aproximadamente un 10,4% del contenido proteico al igual que el observado en este trabajo, donde en condiciones de menor irradiancia la ficoeritrina representó casi un 11% mientras que

en condiciones de mayor irradiancia representó un 10% del contenido proteico. En todos los casos, así como en Seixas *et al.* (2009), el contenido de ficoeritrinas presentó entre un 10 y un 12% del contenido proteico de *R. lens*. En los cultivos de *C. placoidea* el contenido de ficoeritrina se comportó de igual forma, incrementándose con la disminución de la irradiancia, al igual que como las demás ficobiliproteínas (aloficocianina y ficocianina).

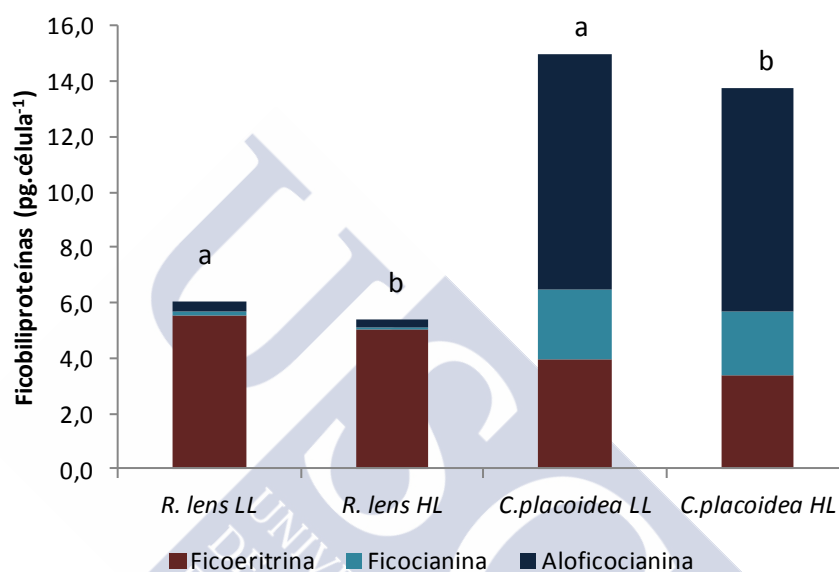


Figura 20 - Contenido de ficobiliproteínas (pg.célula<sup>-1</sup>) en *R. lens* y *C. placoidea* en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo, con tasa de renovación diaria de 30% de volumen. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro mantenidos con dos irradiancias diferentes (LL – 74 y HL – 147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de la misma especie (Test-t, p<0,05).

Tal y como se observó en el capítulo anterior, y como sería de esperar (Ferreira 2007; Coutinho, 2008; Dunstan *et al.*, 2005) el contenido de ácidos grasos saturados disminuyó marcadamente en la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos en comparación con la fase estacionaria de los cultivos discontinuos, al contrario de lo observado para el contenido de PUFAs, que incrementó en ambas condiciones de luz.



La disminución de la irradiancia de 147 (HL) hasta 74 (LL)  $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  resultó en diferencias en el perfil de ácidos grasos en los cultivos discontinuo y semicontinuo en ambas especies (Tabla 5).

La aplicación de menor irradiancia en los cultivos discontinuos de *R. lens* y *C. placoidea* (LL) resultó en una disminución acentuada en el contenido de ácidos grasos saturados de un  $74,60 \pm 0,94\%$  hasta un  $63,36 \pm 5,08\%$  y de un  $52,78 \pm 4,48\%$  hasta un  $43,04 \pm 6,11\%$ , respectivamente. El contenido de ácidos grasos monoinsaturados sufrió pequeñas alteraciones, incrementándose ligeramente con la disminución de la irradiancia hasta un  $8,47 \pm 1,20$  y  $4,55 \pm 0,63\%$  en *R. lens* y *C. placoidea*, respectivamente, derivado a un mayor porcentaje de lípidos de reserva en alta luz mayor relación C:N). Inversamente al observado en el contenido de ácidos grasos saturados, el contenido de PUFAs incrementó marcadamente de un  $18,54 \pm 0,60\%$  hasta un  $28,17 \pm 3,89\%$  en *R. lens*, y de un  $43,03 \pm 4,30\%$  hasta un  $52,41 \pm 5,49\%$  en *C. placoidea*. De los ácidos grasos poliinsaturados se destaca el incremento en la fase estacionaria más acentuado en los ácidos grasos 18:3n3, 20:5n3 en ambas criptófitas, además del DHA y DPA en *R. lens* y *C. placoidea*, respectivamente.

Tal y como se observó en la fase estacionaria de los cultivos discontinuos, en el cultivo semicontinuo el contenido de ácidos grasos saturados disminuyó con la disminución de la irradiancia (LL) en ambas criptófitas. El contenido del ácido mirístico (14:0) en *R. lens* fue significativamente más elevado en condiciones de intensidad luminosa elevada, alcanzando un  $16,64 \pm 1,07\%$ , y bajó hasta el  $11,94 \pm 0,47\%$  con la disminución de la intensidad de luz (LL) (Test-t,  $p < 0,05$ ), mientras que en *C. placoidea* la fracción de este ácido graso no sufrió variaciones con las diferentes intensidades luminosas. El ácido palmítico (16:0), que representó la mayor fracción de ácidos grasos saturados en *C. placoidea*, disminuyó de un  $31,04 \pm 2,94\%$  hasta  $25,90 \pm 4,72\%$  con la disminución de la irradiancia. Tal y como se observó en la fase estacionaria del cultivo discontinuo, el contenido del ácido graso 16:0 en *R. lens* incrementó con la reducción de la intensidad luminosa de un  $13,88 \pm 1,73\%$  hasta  $16,34 \pm 0,31\%$ , pasando a representar la mayor fracción de los ácidos grasos saturados. El contenido de 18:0, que representa valores inferiores a 3% en ambas especies, su contenido en *C. placoidea* fue significativamente superior (Test-t,  $p < 0,05$ ) en condiciones de menor irradiancia (LL) que con mayor irradiancia (HL), con  $2,40 \pm 0,29$  y  $0,93 \pm 0,06\%$ , respectivamente.

Los ácidos grasos monoinsaturados representan una pequeña fracción en el contenido de ácidos grasos de las dos especies de criptófitas utilizadas, representados principalmente por el ácido graso 18:1n9. En ambos cultivos el contenido de ácidos grasos monoinsaturados, al igual que el observado en la fase estacionaria, sufrió pequeñas variaciones con la variación de la intensidad luminosa, incrementándose con la menor irradiancia hasta un  $6,19 \pm 0,35\%$  y un  $5,57 \pm 2,02\%$  en *R. lens* y *C. placodea*, respectivamente.

Las diferentes intensidades luminosas no produjeron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en *R. lens* y *C. placodea* en cultivos semicontinuos. En *R. lens* la menor intensidad incidente (LL) produjo mayor contenido de PUFAs ( $64,46 \pm 0,80\%$ ) que en condiciones de mayor intensidad de luz ( $62,30 \pm 1,61\%$ ), tal y como se observa en los cultivos de *C. placodea* cuyo contenido de PUFAs en condiciones LL ( $61,09 \pm 4,82\%$ ) fue superior al obtenido en HL ( $58,49 \pm 3,68\%$ ).

En los cultivos de *R. lens* el ácido graso 18:3n3 fue el ácido graso poliinsaturado que sufrió mayor variación, siendo significativamente superior (Test-t,  $p < 0,05$ ) cuando los cultivos se sometieron a menor irradiancia que en condiciones de mayor irradiancia:  $23,79 \pm 0,11$  y  $19,4 \pm 0,93\%$ , respectivamente, presentando por el contrario valores idénticos en *C. placodea* en ambas condiciones. Por otro lado, el contenido del ácido graso 18:4n3 disminuyó ligeramente con la disminución de la irradiancia de  $30,99 \pm 1,41$  hasta  $28,06 \pm 0,11\%$  en los cultivos de *R. lens*, mientras que en los cultivos de *C. placodea* presentó valores similares alrededor de un 19% del total de ácidos grasos. El contenido del EPA se incrementó ligeramente con la disminución de la intensidad de luminosa (LL) en ambas las criptófitas, frente a los valores  $7,55 \pm 0,54$  y  $5,99 \pm 0,32\%$  obtenidos con HL, alcanzando  $7,99 \pm 0,38$  y  $6,97 \pm 0,38\%$  en *R. lens* y *C. placodea*, respectivamente. El ácido graso DPA, solamente presente en *C. placodea*, presentó fracciones similares con las dos intensidades luminosas siendo su contenido ligeramente superior cuando se sometieron los cultivos a menor irradiancia que cuando se sometieron a mayor irradiancia, representando  $3,51 \pm 1,32$  y  $2,67 \pm 0,10\%$  respectivamente. El DHA, detectado solamente en *R. lens*, tampoco presentó diferencias significativas en su contenido en ambas condiciones de luz, sin embargo fue ligeramente superior cuando sometieron los cultivos a menor intensidad luminosa con un  $3,54 \pm 0,39\%$ , siendo el valor obtenido en condiciones HL muy similar,  $3,21 \pm 0,38\%$ .

El contenido de los ácidos grasos PUFAs, en particular del 18:3n3, EPA, DHA y DPA, asociados a los lípidos de membrana, se incrementa con la menor irradiancia, comportándose de igual modo que el contenido de ficobiliproteínas, indicando la mayor necesidad de membrana y pigmentos accesorios fotosintéticos en condiciones de menor luz.

Leonardos y Lucas (2000) en condiciones de nutrientes saturantes de nitrógeno en sistema continuo obtuvieron mayor contenido de PUFAs, en condiciones de menor intensidad de luz, mientras que el contenido de ácidos grasos saturados fue superior en condiciones de alta luz en los cultivos de la criptófita *R. reticulata*, tal y como se observó en este trabajo para *R. lens* y *C. placoidea*. Igualmente, Ferreira *et al.* (2008 y 2011) en sistemas semicontinuos de T-ISO obtuvo menor contenido de ácidos grasos saturados y mayor contenido de PUFAs en condiciones de menor intensidad de luz, reflejándose igualmente en los ácidos grasos 18:3n3, 18:4n3 y 22:6n3. Seixas *et al.* (2009), produjo *R. lens* en botellones de 5L, lo que produjo una menor exposición de las células a la irradiancia, obtuvo un perfil similar al obtenido en este trabajo cuando se sometieron los cultivos a menor irradiancia. No obstante el contenido de los ácidos grasos 18:3n3, 20:5n3 y 22:6n3 fueron superiores a los obtenidos en nuestros cultivos, corroborando que una menor irradiancia incrementa el contenido de estos ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, al igual que en este trabajo, en que el 18:4n3 disminuye con menor irradiancia, también el contenido de este ácido graso obtenido por Seixas *et al.* (2009) fue inferior. El ácido graso 18:4n3 funciona como metabolito precursor del EPA y DHA en diferentes organismos (Ghioni *et al.*, 2002; Guil-Gerrero, 2007; Monroig *et al.*, 2013). En las microalgas las rutas de biosíntesis de los ácidos grasos está poco estudiada, no obstante en *Porphyridium cruentum* el 18:4n3 actúa como precursor del EPA (Shiran *et al.*, 1996), pudiendo justificarse la disminución del 18:4n3 con el incremento de los ácidos grasos EPA y DHA en *R. lens*. En condiciones de baja luz, las células de microalgas tienden a aumentar el número y/o tamaño de los cloroplastos (Sukeník *et al.*, 1989) así como la superficie de los tilacoides para aumentar su capacidad de recepción de luz, aumentando su contenido de lípidos polares. Las membranas de los tilacoides de *Nannochloropsis* sp. están constituidas principalmente por galactolípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados (Sukeník *et al.*, 1989 y 1993). A pesar de saberse que los ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA están también presentes en los lípidos neutros (triglicéridos) en criptófitas (Dusntan *et al.*, 2005; Parrish *et al.*, 2012) tal y como registrado en rodófitas (Fábregas *et al.*, 1998; 1999), se observó en

Coutinho (2008) un desplazamiento de los lípidos de reserva por lípidos estructurales, constituidos principalmente por ácidos grasos poliinsaturados, requeridos en células de *R. lens* en crecimiento, tal y como se observa cuando se sometieron los cultivos a menor irradiancia, al igual que el observado en otras especies (Otero *et al.*, 1997b; Ferreira *et al.*, 2008; 2009; 2011).

La irradiancia es importante para el crecimiento de las microalgas, confirmado por el mayor crecimiento y productividad obtenido en ambas criptófitas sometidas a mayor irradiancia. No obstante, los datos presentados sugieren que la máxima irradiancia aplicada en los cultivos de las criptófitas se encuentra en el límite de saturación por luz.

Además, la luz mostró ser una herramienta importante para manipular la composición bioquímica de las criptófitas, permitiendo manipular el contenido proteico y de ficobiliproteínas, además del contenido de ácidos grasos. La menor irradiancia resultó en un incremento en el contenido proteico y de los pigmentos fotosintéticos proteicos (ficobiliproteínas), en particular la ficoeritrina en *R. lens* y de la aloficocianina en *C. placoidea*. Con la disminución de la irradiancia se observó una disminución en el contenido de ácidos grasos saturados mientras que el contenido de PUFAs incrementó.

Tabla 5 - Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en *R. lens* y *C. placoides* la fase final del cultivo *batch* y en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo, con una tasa de renovación diaria de 30%. Los cultivos se realizaron en tubos de 80mL con 3,3 cm de diámetro mantenidos con dos irradiancia diferentes (LL – 74 y HL – 147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de la misma especie (Test-t,  $p < 0,05$ ).

Ácidos grasos	<i>Rhodomonas lens</i>				<i>Chroomonas lens</i>			
	fase estacionaria		<i>steady state</i>		fase estacionaria		<i>steady state</i>	
	<i>Low light</i>	<i>High ligh</i> t	<i>Low light</i>	<i>High ligh</i> t	<i>Low light</i>	<i>High ligh</i> t	<i>Low light</i>	<i>High ligh</i> t
<b>14:0</b>	30,17 ± 4,86	42,52 ± 1,14	11,94 ± 0,47 <sup>a</sup>	16,64 ± 1,07 <sup>b</sup>	8,05 ± 2,13	12,11 ± 3,05	5,04 ± 1,44	5,45 ± 1,11
<b>16:0</b>	31,44 ± 0,95	30,98 ± 0,18	16,34 ± 0,31	13,88 ± 1,73	33,02 ± 4,33	38,96 ± 1,67	25,90 ± 4,72	31,04 ± 2,94
<b>16:1</b>	n.d.	n.d.	0,78 ± 0,23	1,12 ± 0,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>18:0</b>	1,75 ± 0,39	1,10 ± 0,10	1,06 ± 0,33	1,25 ± 0,33	1,97 ± 0,35	1,71 ± 0,22	2,40 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>18:1n9</b>	8,47 ± 1,20	6,86 ± 0,77	5,41 ± 0,12	4,81 ± 0,09	4,55 ± 0,63	4,19 ± 0,18	5,57 ± 2,02	4,09 ± 0,35
<b>18:2n6</b>	1,17 ± 0,19	0,74 ± 0,01	n.d.	n.d.	10,73 ± 0,63	8,34 ± 0,18	7,57 ± 0,99	6,94 ± 0,73
<b>18:3n6</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,22 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,03
<b>18:3n3</b>	13,52 ± 1,51	9,26 ± 0,16	23,79 ± 0,11 <sup>a</sup>	19,40 ± 0,93 <sup>b</sup>	23,78 ± 1,35	19,90 ± 1,91	23,84 ± 1,28	23,41 ± 1,50
<b>18:4n3</b>	8,64 ± 0,84	6,19 ± 0,31	28,06 ± 0,11	30,99 ± 1,41	10,81 ± 1,33	10,32 ± 0,91	18,73 ± 1,12	19,11 ± 1,93
<b>20:4n3</b>	0,28 ± 0,07	0,14 ± 0,01	1,08 ± 0,02	1,15 ± 0,10	0,19 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,16	0,08 ± 0,14
<b>20:5n3</b>	2,72 ± 0,70	1,40 ± 0,08	7,99 ± 0,38	7,55 ± 0,54	4,45 ± 1,30	3,09 ± 0,68	6,97 ± 1,78	5,99 ± 0,32
<b>22:5n6</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,24 ± 0,88	1,04 ± 0,89	3,51 ± 1,32	2,67 ± 0,10
<b>22:6n3</b>	1,83 ± 0,59	0,80 ± 0,07	3,54 ± 0,39	3,21 ± 0,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>∑ Sat</b>	63,36 ± 5,08	74,60 ± 0,94	29,35 ± 0,45 <sup>a</sup>	31,78 ± 1,42 <sup>b</sup>	43,04 ± 6,11	52,78 ± 4,48	33,34 ± 6,09	37,42 ± 4,00
<b>∑ Mono</b>	8,47 ± 1,20	6,86 ± 0,77	6,19 ± 0,35	5,93 ± 0,70	4,55 ± 0,63	4,19 ± 0,18	5,57 ± 2,02	4,09 ± 0,35
<b>∑ PUFA</b>	28,17 ± 3,89	18,54 ± 0,60	64,46 ± 0,80	62,30 ± 1,61	52,41 ± 5,49	43,03 ± 4,30	61,09 ± 4,82	58,49 ± 3,68

n.d. – no detectado



### 3. Evaluación del potencial de las criptófitas *Rhodomonas lens* (CCMP 739) y *Chroomonas placoidea* (CCAP 978/8) para el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*

#### 3.1. Justificación y diseño experimental

Experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron el potencial de la utilización de la criptófita *R. lens* para el crecimiento del rotífero *B. plicatilis* (Coutinho 2008; Freire, 2015). Estos trabajos junto con trabajos previos llevados a cabo con otras especies (Fábregas *et al.*, 1996c; 2001; Ferreira, 2008; 2009; 2011; Seixas *et al.*, 2008; 2009), demostraron la importancia crucial del control de las condiciones de cultivo para la evaluación del valor nutricional de las especies microalgales.

En vista de los resultados descritos en la sección 1.1 en el estudio comparativo de especies de criptófitas en condiciones de producción controlada que simulan la producción a gran escala, que permitieron la selección de *R. lens* y *C. placoidea* como las de mayor potencial por su robustez, productividad y perfil bioquímico, se abordó en primer estudio sobre el valor nutricional de estas dos especies utilizando como modelo el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*.

La selección de las especies para cultivo del rotífero se asienta en la tradición y en la facilidad de cultivo, ignorando el posible potencial de otras especies, como es el caso de las criptófitas. Las criptófitas se consideran como potencialmente importantes para la acuicultura debido a su contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Zhukova y Aizdaicher, 1995), con resultados prometedores en la alimentación de animales filtradores (McCausland *et al.*, 1999; Leonardos y Lucas, 2000; Milione y Zeng, 2007, Tremblay *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2008; 2009, Gagné *et al.*, 2010; Nascimento, 2010) (



**Tabla 2**, en la Introducción).

Varios estudios han demostrado que el tipo de microalga utilizada como alimento afecta a la producción de rotíferos. Yúfera y Pascual (1980) obtuvieron mayores tasas de crecimiento de *Brachionus plicatilis* que con *Tetraselmis suecica*, mientras que Korstad *et al.* (1989) observaron tasas reproductoras más elevadas en rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* frente a los alimentados con *T. suecica*. Por su parte, Scott y Baynes (1978), aunque observan poco efecto de las diferentes especies de microalgas en el crecimiento del rotífero, registraron un mayor crecimiento en los rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum*, frente a rotíferos alimentados con *Pavlova lutheri*, *Dunaliella tertiolecta* e *I. galbana*. Otros autores han registrado buenos resultados en el cultivo de rotíferos del género *Synchaeta* cultivados con las criptófitas *Cryptomonas* spp., *Rhodomonas* spp. (Stemberger, 1981; Oltra *et al.*, 2000).

Las diferencias en la valoración nutricional de las especies pueden ser ocasionadas por la técnica de cultivo, que en el caso de cultivos *batch* genera biomasa de composición bioquímica no controlada dificultando la comparación de resultados. Los cultivos semicontinuos de microalgas demostraron ser una excelente herramienta en la modulación de la calidad nutritiva cuando se utilizan como alimento para *Artemia* (Fábregas *et al.*, 1996c; 1998; 2001; Seixas *et al.*, 2008; 2009) y para *B. plicatilis* (Coutinho, 2008; Ferreira *et al.*, 2008; 2009; 2011), permitiendo la producción de biomasa de composición bioquímica controlada y como tal, facilitando la comparación de diferentes especies.

En este experimento se comparó el crecimiento de *Brachionus plicatilis* cultivado con dietas monoalgales de *R. lens* y *C. placodea*, cultivadas en régimen semicontinuo, con el obtenido con *Nannochloropsis gaditana*, comúnmente utilizada en la producción de rotíferos debido a los buenos resultados obtenidos (Lubzens *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2009), además del elevado contenido en EPA y facilidad de cultivo. Las microalgas se produjeron en tubos con 80 mL de cultivo, utilizando medio Algal ajustado a 8mM, mantenidos con una tasa de renovación diaria de 30% y sometidos a una irradiancia de 229  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (HHL), según se describe en la sección Material y Métodos.

Los cultivos de los rotíferos se llevaron a cabo durante 5 días y se realizaron en botellas de 1 L con un volumen inicial de 500 mL. La densidad inicial de rotíferos fue 50 rotíferos.mL<sup>-1</sup>



<sup>1</sup>, siendo el número inicial de huevos de 29 huevos.mL<sup>-1</sup> (58% del número de rotíferos). Diariamente se hicieron recuentos de la densidad de rotíferos y número de huevos por mililitro, volviendo a añadir la misma cantidad de dieta de forma que se aportase una ración diaria de 3700 células.rotífero<sup>-1</sup>, 3900 células.rotífero<sup>-1</sup> y 66700 células.rotífero<sup>-1</sup> de *R. lens*, *C. placoidea* y *N. gaditana* respectivamente. En todos los casos esta ración fue suficiente, observándose la presencia de células microalgales en el cultivo después de cada periodo de alimentación de 24 horas. La cantidad de microalga utilizada en este experimento se calculó tomando como base los datos de Patiño (1995) para suministrar una cantidad de microalga por rotífero equivalente en peso a 2000 células de *Tetraselmis suecica* por rotífero y día, considerando un peso medio de 108 pg.célula<sup>-1</sup>, 102 pg.célula<sup>-1</sup> y 6 pg.célula<sup>-1</sup> de *R. lens*, *C. placoidea* y *N. gaditana* respectivamente.

### 3.2. Resultados y Discusión

#### 3.2.1. Densidad celular y productividad de las diferentes microalgas

Para la alimentación del rotífero *B. plicatilis* se utilizaron tres especies microalgales que fueron suministradas como dietas monoalgales provenientes de cultivos en régimen semicontinuo con una tasa de renovación diaria de 30%. Las densidades de estabilización alcanzadas fueron  $15,6 \pm 0,9 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para *R. lens*),  $13,6 \pm 0,6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para *C. placoidea* y  $233,2 \pm 12,0 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para *N. gaditana*.

A pesar de las diferencias en densidad celular de estabilización las productividades volumétricas en peso fueron similares para las 3 especies. El menor peso celular se observó en *N. gaditana*, aproximadamente 7 pg, mientras que las criptófitas presentan valores similares, aproximadamente 100 pg.célula<sup>-1</sup>. *R. lens* fue la microalga con mayores valores de productividad alcanzando 563 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, seguida de la productividad alcanzada en *N. gaditana* (551 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>), siendo ambas significativamente superiores a la obtenida por *C. placoidea* (463 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>) (Tuckey HSD, p<0,05) (Figura 21).

La mayor irradiancia aplicada en este experimento, 229  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , en comparación con la aplicada en la sección 1.1. (147  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), resultó en un ligero incremento de la densidad celular de estabilización y productividad volumétrica en peso de

los cultivos de las criptofitas, con respecto a los valores obtenidos en la sección 1.1., donde para una irradiancia de  $147 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (HL), las densidades de estabilización y productividades volumétricas fueron de  $13,6 \pm 0,6 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$  y  $384,3 \pm 48,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  en los cultivos de *R. lens* y  $12,1 \pm 0,8 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$  y  $339 \pm 15,39 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  en *C. placoidea*.

Tal como se describió anteriormente, las densidades celulares y productividades obtenidas en este sistema por las criptófitas son netamente superiores a las descritas por otros autores en condiciones *batch* y/o *steady state* (Brown *et al.*, 1991; Brown y Miller, 1992; Coutinho, 2008; Dunstan *et al.*, 2005; Lafarga de la Cruz *et al.*, 2006; Renaud *et al.*, 1999; Seixas *et al.*, 2008 y 2009; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005; Zhukova y Aizdaicher, 1995). La densidad celular y productividad obtenidas en este trabajo fueron superiores a los valores obtenidos por Freire (2015), cuyos cultivos estabilizaron en  $11 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$  con una productividad de  $350 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  cuando se sometieron a  $242 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Estos valores son similares a los obtenidos en la sección 1.2., corroborando con la hipótesis de los cultivos estarían alcanzando el punto de saturación de luz a partir de los  $140 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Las densidades celulares de estabilización obtenidas para *N. gaditana* representaron el doble de las obtenidas por Ferreira *et al.* (2009), que aplicando una tasa de renovación del cultivo de 30% al día, obtuvo aproximadamente  $100 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$ , siendo la productividad obtenida igualmente muy inferior a obtenida en este trabajo, alcanzando  $152 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ . Las productividades obtenidas en este trabajo fueron también muy superiores a las descritas en otros trabajos realizados en el laboratorio de la USC utilizando los mismos fotobiorreactores y condiciones idénticas de cultivo tanto para *N. gaditana*, como para otras especies como: *P. tricornutum* ( $250 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ; Fábregas *et al.*; 1996b) y T-ISO ( $263 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ; Ferreira *et al.*, 2008), lo que se puede deber a la mayor intensidad luminosa y concentración de nutrientes utilizada en este experimento.

Cuando se cultiva en sistema semicontinuo en botellones de 5L, Seixas *et al.* (2009) registraron la mayor productividad en *R. lens* ( $133 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ) en comparación con otras especies convencionales de microalgas comúnmente utilizadas en acuicultura cultivadas en el mismo sistema: *T. suecica* ( $129 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ); *N. gaditana* ( $116 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ) e *I. galbana* ( $103 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ) corroborando la elevada productividad de esta especie obtenida en el sistema tubular, incluso en las condiciones de elevada irradiancia aplicadas en este trabajo.

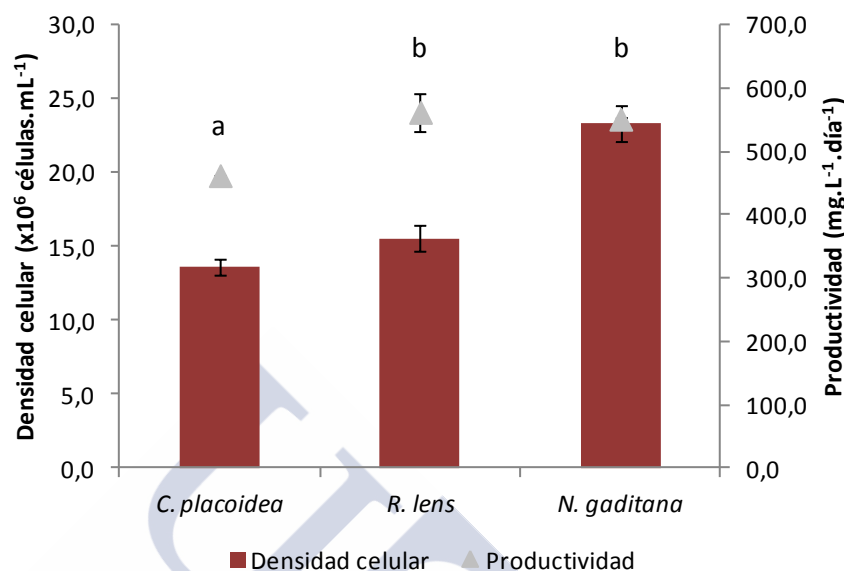


Figura 21 – Densidades celulares de estabilización ( $\times 10$  el caso *N. gaditana*) y productividades de las especies de microalgas utilizadas como dietas para el cultivo de *Brachionus plicatilis*. Los cultivos se realizaron en minifotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro mantenidos con una irradiancia de  $229 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y nutrientes ajustados a  $8\text{mM NO}_3$ . Letras diferentes indican diferencias significativas en las productividades de los cultivos de las diferentes especies (Tuckey HSD,  $p < 0,05$ )

### 3.2.2. Composición bioquímica de microalgas

La relación C:N en las 2 criptófitas presentó valores similares, alcanzando  $5,51 \pm 0,09$  y  $5,65 \pm 0,05$  en *R. lens* y *C. placoidea*, respectivamente. En general, la relación C:N, en las criptófitas presenta valores más bajos que en otras microalgas, siendo inferior al valor de la relación C:N obtenida en *N. gaditana* ( $7,43 \pm 0,05$ ) (Figura 22).

La menor relación C:N de las criptófitas refleja el mayor contenido proteico en los cultivos de *R. lens* y *C. placoidea*, alcanzando un  $50,28 \pm 0,15$  % y un  $47,70 \pm 1,13$  %, mientras que en *N. gaditana* el contenido proteico fue sustancialmente más bajo, representando un  $40,98 \pm 0,68$  % de peso seco (Figura 22).

La mayor irradiancia utilizada en este trabajo resultó en un incremento de la relación C:N, en particular en *R. lens*, derivado de una disminución del contenido proteico en *R. lens*, que habían representado una relación C:N de 5,08 y casi un 58% de contenido proteico (% de peso seco) con una irradiancia de  $147 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , en el capítulo anterior, corroborando con los resultados descritos anteriormente para esta especie, sugiriendo una disminución del contenido proteico con el incremento de la irradiancia. A pesar la disminución relativa de la fracción proteica, se observa un incremento del contenido proteico en ambas criptófitas con el aumento de la irradiancia de 54 hasta 61  $\text{pg.célula}^{-1}$  en *R. lens* y de 44 hasta 54  $\text{pg.célula}^{-1}$  en *C. placoidea*.

Los menores valores de la relación C:N y mayor contenido proteico obtenidos en las criptófitas, frente a *N. gaditana*, corrobora los resultados obtenidos por otros autores. Coutinho (2008) y Seixas *et al.* (2008; 2009) obtuvieron valores menores de la relación C:N y mayor contenido proteico en *R. lens*, que en otras especies comúnmente utilizadas en acuicultura (*N. gaditana*, *I. galbana*, T-ISO, *T. suecica*) cuando se cultivan en las mismas condiciones en sistemas semicontinuos.

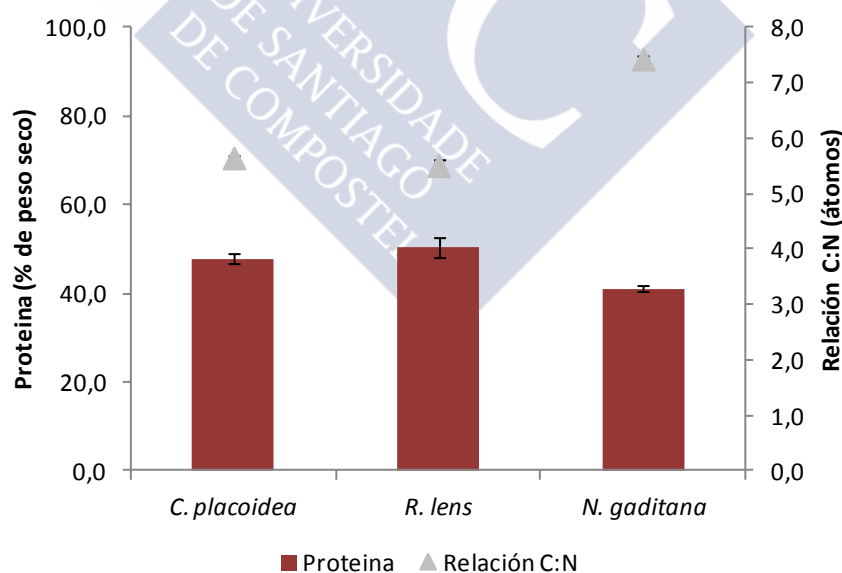


Figura 22 - Contenido proteico (% peso seco) y relación C:N de las especies de microalgas utilizadas como dietas en el cultivo de *Brachionus plicatilis*. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro mantenidos con una irradiancia de  $229 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y nutrientes ajustados a  $8\text{mM NO}_3$ .

El contenido de carbohidratos en los cultivos de *R. lens*, *C. placoides* y *N. gaditana* fueron muy parecidos, con valores entre un 23 y 25% del peso seco (Figura 23).

Con el incremento de la intensidad luminosa de 147 (sección 1.1) hasta 229  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (presente capítulo) se pudo observar un marcado incremento en el contenido de carbohidratos en los cultivos semicontinuos de las criptófitas, incrementándose desde un  $8,78 \pm 2,83\%$  hasta un  $23,32 \pm 0,84\%$  y de un  $11,30 \pm 1,37$  hasta un  $25,10 \pm 0,89\%$  en *R. lens* y *C. placoides*, respectivamente, que se refleja en una relación C:N mayor que en la sección 1.1.

Otros autores describen valores más bajos de carbohidratos para *R. lens*, alcanzando entre un 11% (Seixas *et al.*, 2008; 2009) hasta 15% de peso seco (Coutinho, 2008), en cultivos semicontinuos saturados de nitrógeno. La mayor irradiancia sería la causante del incremento en el contenido de carbohidratos en los cultivos de *R. lens*.

El contenido de carbohidratos en *N. gaditana* también fue superior al obtenido por Ferreira *et al.* (2009) que obtuvo un 20% del peso seco en carbohidratos. Estas diferencias en la composición bioquímica con los valores obtenidos por Ferreira *et al.* (2009) se pueden deber a la mayor intensidad luminosa aplicada en nuestros cultivos (Figura 23).

Las dos especies de criptófitas presentaron valores menores de contenido en lípidos (% de peso seco), con el menor valor registrado en *R. lens*, con un  $20,91 \pm 0,64 \%$ , seguido de *C. placoides*, con un  $23,82 \pm 3,02 \%$ , mientras que en *N. gaditana* los lípidos alcanzaron un  $30,32 \pm 4,20 \%$  de peso seco.

Tal como se observó en el contenido de carbohidratos, también el contenido lipídico se incrementó al someter a los cultivos semicontinuos de *R. lens* y *C. placoides* a la mayor irradiancia utilizada en este experimento, ya que con la menor irradiancia (HL) descrita en el capítulo anterior, se había registrado un  $15,8 \pm 2,4$  y un  $17,8 \pm 2,6\%$  de peso seco, respectivamente.

Coutinho (2008) alcanzó un 22% de lípidos en su cultivo semicontinuo con tasa de renovación de 30%, mientras que Seixas *et al.* (2008; 2009) obtuvo solamente un 11% con la misma tasa de renovación. La diferencia de los fotobiorreactores y volúmenes utilizados resultó en una menor irradiancia en las células de *R. lens* cultivadas en botellones de 5L (Seixas *et al.*, 2008; 2009), resultando en un menor contenido lipídico. Estos resultados sugieren que el incremento de la intensidad luminosa parece promover un incremento en el contenido de lípidos en las criptófitas estudiadas, corroborado con el observado en *R. lens* y *C. placoides* en este trabajo.

*N. gaditana* presentó un contenido lipídico superior a los obtenidos por Ferreira *et al.* (2009) que rondaron el 20% del peso seco, posiblemente afectado por la mayor irradiancia aplicada a los cultivos en este trabajo, al igual que el observado en las criptófitas.

Debido a que la elevada irradiancia utilizada en estos experimentos generó elevados contenidos en carbohidratos y lípidos en comparación con otras condiciones de menor irradiancia, es de esperar que este incremento de las sustancias de reserva se vea reflejado en la composición de los ácidos grasos, con un incremento de la fracción de saturados y insaturados, solamente observado en *R. lens*.

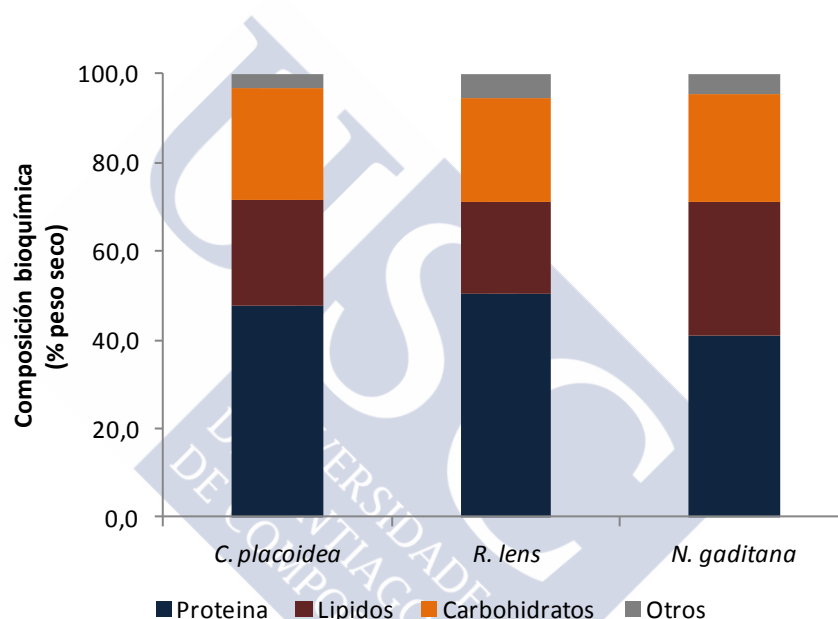


Figura 23 - Composición bioquímica total (proteína, lípidos y carbohidratos) de las especies *C. placoides*, *R. lens* y *N. gaditana*, en la fase de estabilización del cultivo semicontinuo, con tasa de renovación diaria de 30%, utilizadas en el cultivo de *Brachionus plicatilis*. Los cultivos se realizaron en mini-fotobiorreactores de 80mL con 3,3 cm de diámetro mantenidos con una irradiancia de 229  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y nutrientes ajustados a 8mM  $\text{NO}_3$ .

Las especies microalgales utilizadas en la alimentación de rotíferos presentaron diferentes perfiles de ácidos grasos. El menor contenido de ácidos grasos saturados se observó en *C. placoides* con un  $22,78 \pm 0,17\%$ , inferior al obtenido en los cultivos de *R. lens*, con un  $29,85 \pm 1,21$ , mientras que *N. gaditana* alcanzó un  $33,31 \pm 0,97\%$ . El ácido graso 16:0 representó la

mayor fracción de ácidos grasos en *N. gaditana* y *C. placoidea*, con un  $26,94 \pm 1,06$  y  $22,78 \pm 0,17\%$ , respectivamente, mientras que en *R. lens*, los ácidos grasos 14:0 y 16:0 representaron ambos alrededor de un 14% del total de ácidos grasos (Tabla 6).

El contenido de ácidos grasos monoinsaturados representa una menor fracción en las criptófitas, alcanzando un  $7,87 \pm 0,38$  y  $12,19 \pm 1,21\%$  del total de ácidos grasos en *C. placoidea* y *R. lens*, respectivamente, representados mayoritariamente por el ácido graso 18:1n9. Por otro lado, en *N. gaditana* el ácido graso monoinsaturado predominante es el 16:1, que en conjunto con el 18:1n9 alcanzan más del doble de los ácidos grasos monoinsaturados detectados en las criptófitas, con un  $24,24 \pm 0,08\%$ .

El contenido de PUFAs fue marcadamente superior en *C. placoidea* y *R. lens*, que alcanzaron un  $64,11 \pm 1,08$  y  $57,97 \pm 0,45\%$  respectivamente, mientras que en *N. gaditana* representaron un  $42,45 \pm 1,04\%$  del total de ácidos grasos. En ambas criptófitas el contenido de PUFAs fue similar, destacándose el elevado contenido de los poliinsaturados de cadena corta ( $C_{18}$ ), con los ácidos grasos 18:3n3 y 18:4n3 que representaron entre un 22 y 24% y entre un 16 y 18%, respectivamente. De los ácidos grasos de cadena larga, el EPA representó un  $8,79 \pm 0,26$  y un  $8,21 \pm 0,10\%$  del total de ácidos grasos en *C. placoidea* y *R. lens*, respectivamente, bastante inferiores a los  $30,77 \pm 1,19\%$  del total de ácidos grasos detectados en *N. gaditana*. En los tres cultivos microalgales se observaron diferencias en la presencia y/o ausencia de algunos ácidos grasos poliinsaturados como el araquidónico (ARA, 20:4n6), el DHA y DPA. El ácido graso ARA solamente se detectó en *N. gaditana* con un  $6,61 \pm 0,16\%$ , mientras que el DHA se detectó en *R. lens*, con un  $6,81 \pm 0,13\%$  del total de ácidos grasos, y el DPA se detectó en *C. placoidea* con un  $5,19 \pm 0,27\%$ .

La mayor irradiancia aplicada en los cultivos en este ensayo, frente la irradiancia aplicada en los cultivos de *R. lens* y *C. placoidea* en la sección 1.1., produjo diferencias en el contenido de ácidos grasos de las criptófitas, sin embargo de forma distinta. En *C. placoidea* se observó una abrupta disminución del contenido de ácidos grasos saturados, debido a una grande disminución del contenido del ácido graso 16:0, mientras que en *R. lens* se observó una ligera disminución del contenido de ácidos grasos saturados. El total de ácidos grasos monoinsaturados incrementó en ambas microalgas, doblando su contenido con la mayor



irradiancia aplicada en este capítulo. El contenido de PUFAs incrementó hasta un 64% en *C. placoidea*, bajando en *R. lens* de un  $62,30 \pm 1,61\%$  (con  $147 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) hasta un  $57,97 \pm 0,45\%$  para  $229 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Sin embargo, en ambas se observó un ligero incremento de los ácidos grasos 18:2n6 y 18:3n3, y un mayor incremento de los ácidos grasos EPA, DPA y DHA, mientras que el 18:4n3 disminuyó marcadamente en *R. lens* y ligeramente en *C. placoidea*.

En el ensayo del efecto de la intensidad luminosa en las criptófitas, discutido anteriormente, se observó, en general, un incremento del contenido de ácidos grasos saturados y disminución del contenido de monoinsaturados y PUFAs con el incremento de la irradiancia. El incremento de la intensidad luminosa, aplicada en este experimento resultó en un incremento en el contenido de ácidos grasos saturados, corroborando con los resultados ya discutidos, sin embargo el contenido de ácidos grasos monoinsaturados, que antes habían bajado con el aumento de la irradiancia, doblaron su contenido con el incremento de la irradiancia aplicada en este capítulo ( $229 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Inversamente a lo observado en el capítulo anterior, el contenido de PUFAs en *C. placoidea* se incrementó con el aumento de la irradiancia, mientras que en *R. lens* se produjo una ligera disminución tal y como se había observado anteriormente. No obstante, es destacable el incremento del EPA en ambas microalgas y del DPA y DHA en *C. placoidea* y *R. lens*, respectivamente. El incremento de estos PUFAs con el incremento de la luz, indica que estos ácidos grasos se encuentran también en triglicéridos, como ya se ha observado en otras especies de criptófitas (Dunstan *et al.* 2005), y en la rodófitas *Porphyridium cruentum* (Fábregas *et al.*, 1998; 1999).

En general, el perfil de los ácidos grasos de ambas criptófitas se asemeja a los descritos anteriormente por otros autores (Dunstan *et al.*, 2005; Coutinho, 2008; Seixas *et al.*, 2008; 2009; Freire, 2015), variando la proporción de algunos ácidos grasos de forma consonante a las condiciones de cultivo.

El perfil de ácidos grasos del cultivo de *N. gaditana* se asemeja al obtenido por Ferreira *et al.* (2009) que utilizó menor concentración de nutrientes ( $\text{NO}_3$  ajustado a 4mM) y menor intensidad luminosa ( $162 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) en los mismos fotobiorreactores, logrando alcanzar un 27% de contenido de EPA y un total de 40% de PUFAs, ligeramente inferiores a los obtenidos en este trabajo. Los ácidos grasos más abundantes encontrados están de acuerdo con los descritos para el género *Nannochloropsis* (Ferreira *et al.*, 2009; Sukenik *et al.*, 1993;



Volkman *et al.*, 1993) donde se destacan el ácido palmítico (16:0), el palmitoleico (16:1) y el eicosapentanoico (EPA, 20:5n3).

Además del mayor contenido proteico de elevada calidad, debido a su composición en aminoácidos, en general, las criptófitas presentaron mejor perfil de ácidos grasos, con menor contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y elevado contenido de PUFAs. No obstante el mayor contenido de EPA fue obtenido por *N. gaditana* al igual que el ARA, que solamente se detectó en esta microalga, sin embargo las criptófitas presentaron una mayor variedad en el contenido de PUFAs, destacándose el elevado contenido de los ácidos grasos de C<sub>18</sub>, además del contenido de los ácidos grasos DPA y DHA en *C. placoidea* y *R. lens*, respectivamente, representando en ambos casos más del 5% del total de ácidos grasos.

### 3.2.3. Efecto de la especie de microalga sobre el crecimiento del rotífero

Se observó un retardo en el inicio del crecimiento de la población de rotíferos que no comenzó su crecimiento hasta las 72 horas. Este efecto fue independiente de la dieta suministrada, pudiendo estar también asociado a la manipulación de los rotíferos previamente al experimento. El crecimiento observado es muy pequeño y gradual en los dos primeros días, observándose diferencias en el crecimiento de los rotíferos solamente desde el tercer día. Están descritas señales de comunicación *quorum sensing* en *B. plicatilis* que a través de una proteína inductora de la mixis (MIP) inducen la producción de machos en la población cuando las condiciones son adversas, llevando a la producción de cistes (Kubanek y Snell, 2008). Aunque no se haya detectado machos o cistes en el cultivo, la gran dilución efectuada en el inculo de los rotíferos puede haber afectado a alguno de los mecanismos de comunicación, retrasando el crecimiento inicial de los rotíferos.

Los rotíferos alimentados con *C. placoidea* presentaron un crecimiento superior, siendo la densidad de rotíferos alcanzada en el quinto día, 255 rotíferos.mL<sup>-1</sup>, significativamente superior a la densidad de los rotíferos alimentados con *R. lens* y *N. gaditana* (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Por otro lado, *N. gaditana* resultó más efectiva en el crecimiento de *B. plicatilis* que *R. lens*, alcanzando una densidad 224 rotíferos.mL<sup>-1</sup>, significativamente superior a la densidad

alcanzada por los rotíferos alimentados con *R. lens*, 182 rotíferos.mL<sup>-1</sup>, en el quinto día (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 24).

El mayor crecimiento de los rotíferos alimentados con *C. placoidea* se debe a la mayor producción de huevos diaria de los rotíferos al largo del ciclo de crecimiento, que en el cuarto día de cultivo fue significativamente superior que en los rotíferos alimentados con *R. lens* y *N. gaditana* (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Los rotíferos alimentados con *N. gaditana* también presentaron una producción de huevos elevada, siendo, en ambos, significativamente superior (ANOVA,  $p < 0,05$ ) a la producción de huevos de los rotíferos alimentados con *R. lens*, desde el tercer día de crecimiento. A pesar de, en general, se observar una mayor producción de huevos en los rotíferos alimentados con *C. placoidea*, en el último día de crecimiento se observó una producción de huevos ligeramente superior en los rotíferos alimentados con *N. gaditana* que se podría derivar de los ciclos reproductivos del rotífero de duración 48-72 horas (Lubzens, 2003).

Asimismo, la mayor tasa de crecimiento se registró en los rotíferos alimentados con *C. placoidea* ( $0,35 \pm 0,02 \text{ día}^{-1}$ ), ligeramente superior a la tasa de crecimiento obtenida con la *N. gaditana* ( $0,32 \pm 0,01 \text{ día}^{-1}$ ), y significativamente superior a los obtenidos con *R. lens* ( $0,28 \pm 0,03 \text{ día}^{-1}$ ) (Bonferroni multiple comparison test,  $p < 0,05$ ).

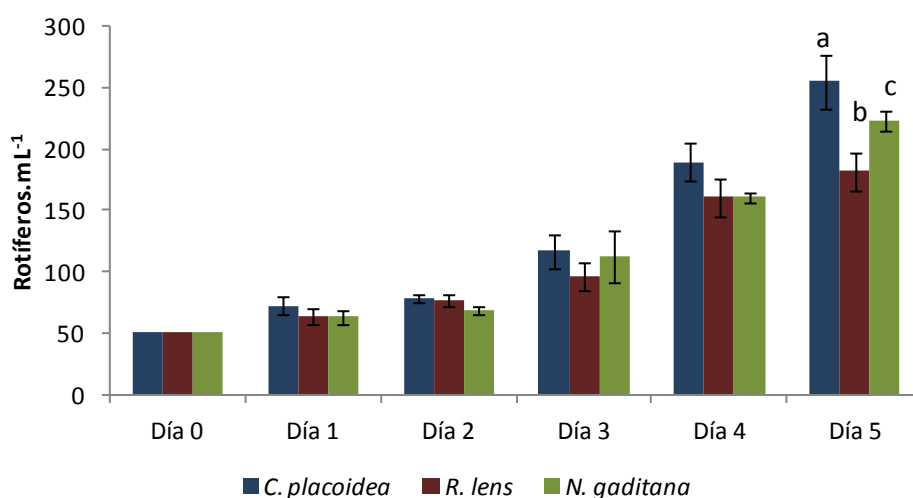


Figura 24 - Crecimiento de *B. plicatilis* con diferentes dietas (*C. placoidea*, *R. lens* y *N. gaditana*) al largo de 5 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro del mismo día (Bonferroni multiple comparison test,  $p < 0,05$ ).

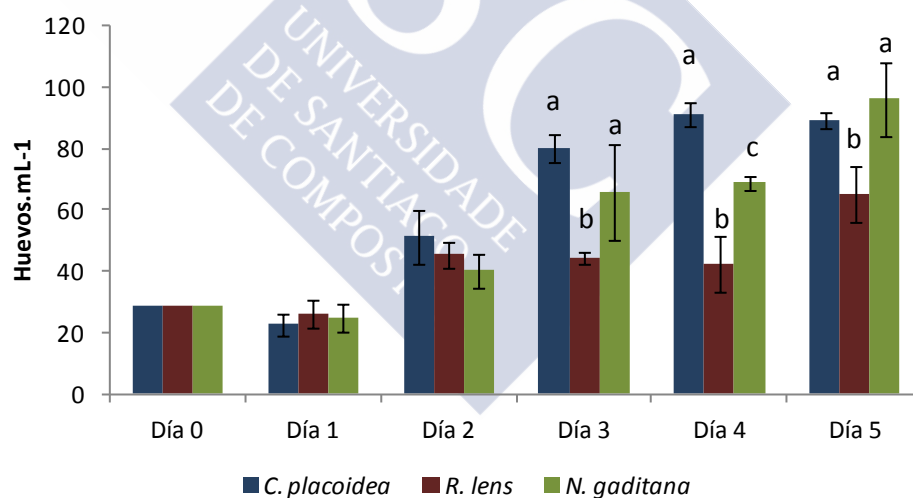


Figura 25 - Numero de huevo.mL<sup>-1</sup> de *B. plicatilis* con diferentes dietas (R-Chroo – *C. placoidea*, R-Rhodo – *R. lens* y R-Nanno – *N. gaditana*) al largo de 5 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro del mismo día (Bonferroni multiple comparison test,  $p < 0,05$ ).

El pequeño crecimiento de la población en los primeros días se refleja en tasas de crecimiento más bajas que las obtenidas en trabajos de otros autores (Caric *et al.*, 1993; Scott y Baynes, 1978; Yúfera y Pascual, 1983).

En este trabajo se observó que las diferentes microalgas determinan diferentes crecimientos y producción de huevos en los rotíferos debido a diferentes valores nutritivos de las dietas. Las diferencias en la valoración nutricional de las especies se pueden deber a las técnicas de cultivo, generalmente cultivadas en sistemas *batch*, generando biomasa de composición bioquímica no controlada dificultando la comparación de resultados. Otros autores demostraron que alterando las condiciones de cultivo en cultivos semicontinuos se consigue manipular y el valor nutritivo de las microalgas mejorando la supervivencia o crecimiento de *Artemia* sp. (Fábregas *et al.*, 1996b y 1998; Seixas *et al.*, 2008) o rotíferos (Ferreira *et al.*, 2011) cuando se aplican mayores tasas de renovación y mayor concentración de nutrientes. En la mayoría de los casos los mejores resultados están relacionados con el alto contenido proteico de las microalgas obtenidas en esas condiciones de cultivo (Fábregas *et al.*, 1995a y 1995b), pero además de la proteína se supone que otros parámetros determinan el valor nutritivo de la microalga tales como el valor calórico, las relaciones proteína/lípidos y proteína/carbohidratos o el contenido en ácidos grasos omega-3.

Así, en este trabajo se utilizaron microalgas derivadas de cultivos semicontinuos con iguales tasas de renovación, siendo la composición bioquímica de la dieta constante a lo largo del experimento, además de presentar un perfil bioquímico mejorado debido a la saturación de nitrógeno (Fábregas *et al.*, 1995a; Ferreira *et al.*, 2008; Otero y Fábregas 1997; Otero *et al.* 1997).

El mayor peso fue obtenido por los rotíferos alimentados con *R. lens* ( $230,6 \pm 74,5$  ng.rotífero<sup>-1</sup>), siguiéndose los rotíferos alimentados con *C. placoides* ( $191,1 \pm 48,0$  ng.rotífero<sup>-1</sup>) y *N. gaditana* ( $120,7 \pm 11,7$  ng.rotífero<sup>-1</sup>). El mayor peso de los rotíferos coincide con el menor valor de la relación C:N de las microalgas, tal y como observado en otros trabajos. Coutinho (2008) y Ferreira *et al.* (2008; 2009; 2011) obtuvieron mayor peso en los rotíferos sometidos a dietas con menor relación C:N provenientes de cultivos semicontinuos con mayor tasa de renovación del grupo de la USC. Coutinho (2008) también obtuvo mayor peso de rotíferos cuando se alimentaron con *R. lens*, frente a los rotíferos

alimentados con T-ISO, cuyos valores de la relación C:N son marcadamente superiores a los de la criptófita.

El peso seco de los rotíferos alimentados con las criptófitas se asemeja a los obtenidos por Coutinho (2008) y Ferreira *et al.* (2008; 2009; 2011) cuando son alimentados con dietas mejoradas provenientes de cultivos con tasa de renovación más elevada con las especies *R. lens*, *N. gaditana* y T-ISO. Sin embargo, en este trabajo, los rotíferos alimentados con *N. gaditana* que presentaron un peso seco más bajo, se asemejan a los obtenidos por Ferreira *et al.* (2009) cultivados con *N. gaditana* con menores tasas de renovación.

La fracción orgánica total de la dieta fue similar en los diferentes cultivos como se puede observar en la Figura 26, siendo la cantidad de alimento utilizada de aproximadamente 400 ng de microalga .rotífero<sup>-1</sup>, en base a los datos de Patiño (1995). La FCR más bajas se obtuvieron en los rotíferos alimentados con las criptófitas, con el menor valor En los rotíferos alimentados con *R. lens*, 1,8, seguido de los rotíferos alimentados con *C. placoidea*, 2,2, mientras que la FCR más elevada se observó en los rotíferos alimentados con *N. gaditana* que alcanzó un 3,4. Estos resultados demuestran la mayor eficiencia de las criptófitas como alimento, que resultó en un mayor peso de los rotíferos alimentados con *R. lens* y *C. placoidea*.

La tasa de crecimiento de los rotíferos está relacionada con la cantidad de alimento, y dependiendo del tipo de dieta la cantidad requerida para alcanzar el crecimiento máximo puede ser mayor o menor (Lubzens *et al.*, 1995; Yúfera y Pascual, 1983). Las tasas de ingestión de los rotíferos son muy variables dependiendo de factores como la concentración o tipo de alimento. Cuando se alimenta con *Nannochloropsis oculata*, se estima que *B. plicatilis* ingiere entre 60 y 90% de su peso seco (Navarro, 1999), mientras que se obtuvieron tasas de ingestión equivalentes al 240% del peso seco del rotífero cuando se alimenta con *Chlorella saccharophila* (Nagata, 1985).

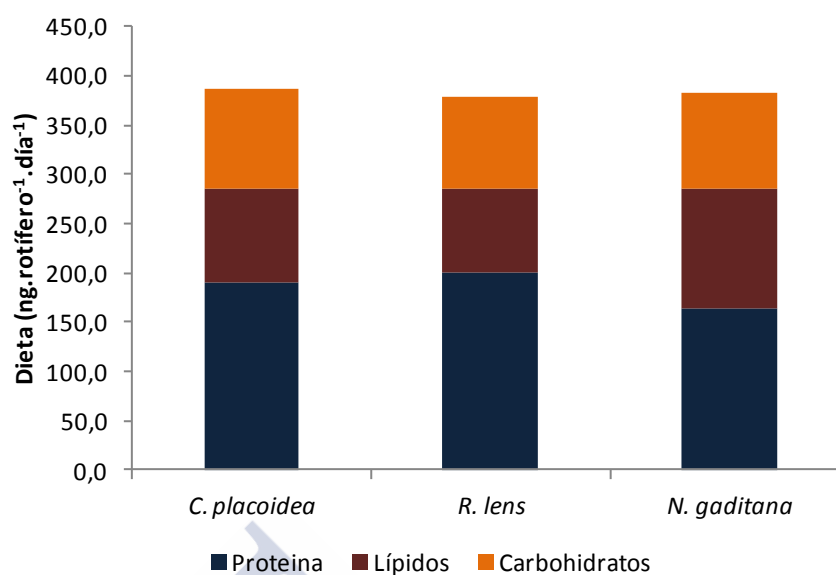


Figura 26 - Peso de los contenidos celulares (proteína, lípidos y carbohidratos) aportados diariamente (ng.rotífero<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>) a cada cultivo de *Brachionus plicatilis* alimentados con diferentes microalgas (*C. placoides*, *R. lens* y *N. gaditana*) al largo de 5 días de cultivo.

### 3.2.4. Efecto de la composición bioquímica de la microalga sobre la composición bioquímica del rotífero

Las microalgas utilizadas en la alimentación de los rotíferos afectan no solo al crecimiento, productividad y peso seco de los mismos sino también a su composición bioquímica. El perfil bioquímico de los rotíferos generado por las dietas ingeridas es un importante criterio en la selección del alimento ya que los rotíferos son muy eficientes en la transferencia de los componentes bioquímicos desde las microalgas hasta las larvas en maricultura (Ferreira *et al.* 2008; 2009).

Las microalgas utilizadas en el crecimiento de los rotíferos presentaron diferente contenido proteico, alrededor de un 50% del peso seco en las criptófitas, mientras que en *N. gaditana* representó alrededor de un 40%. A pesar del diferente contenido proteico de las microalgas, el contenido proteico fue muy similar entre los rotíferos con un  $59,02 \pm 1,03$ ,  $58,39 \pm 1,57$  y  $57,98 \pm 3,97$  % de peso seco, para los rotíferos alimentados con *C. placoides*, *N. gaditana* y *R. lens*, respectivamente (Figura 27). Mientras que en periodos de enriquecimiento cortos (24 horas) el perfil bioquímico de la microalga afecta fuertemente el

perfil bioquímico del rotífero (Ferreira *et al.*, 2008; 2009) afectando también en algunos casos a la tasa de crecimiento, periodos de alimentación largos con microalgas de distintas relación C:N generadas mediante la manipulación de la tasa de renovación de cultivos semicontinuos generan importantes diferencias en el crecimiento, pero los rotíferos muestran una relación proteína/lípidos/carbohidratos constante independientemente de la composición bioquímica, relación C:N y estado nutricional de las microalgas, sugiriendo que los rotíferos son capaces de compensar desequilibrios nutricionales en la dieta, asimilando más proteína cuando son alimentados con microalgas con elevada relación C:N (Ferreira *et al.*, 2011). *Artemia* sp. también asimila proteína más eficientemente en dietas ricas en carbohidratos y pobres en proteína, a pesar de la menor tasa de crecimiento y elevada mortalidad (Fábregas *et al.*, 2001). Al igual que en este trabajo, en otros trabajos la variabilidad bioquímica existente en las especies de microalgas no se reflejó proporcionalmente en la composición de los distintos grupos de rotíferos en experimentos de alimentación prolongada (Coutinho, 2008; Scott y Baynes, 1978) y de *Artemia* (Seixas *et al.*, 2007).

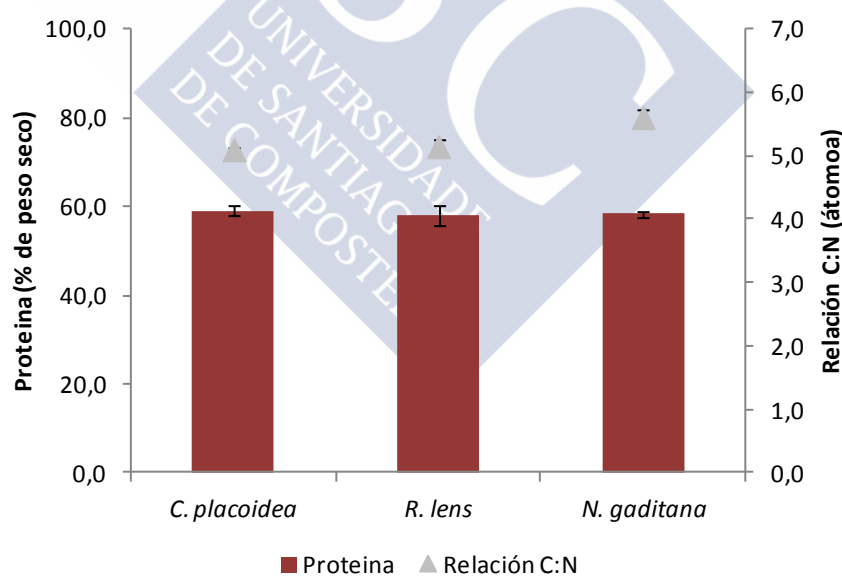


Figura 27- Contenido proteico (% peso seco) y relación C:N (átomos) de *Brachionus plicatilis* cultivado con diferentes dietas (*C. placoidea*, *R. lens* y *N. gaditana*) después de 5 días de cultivo.

A diferencia de lo que ocurre con el contenido de proteína, la diferencia del perfil de ácidos grasos de las especies de microalgas utilizadas como alimento se reflejó en la composición de ácidos grasos de los rotíferos ya que algunos de los ácidos grasos exclusivos presentes en las especies de microalgas se encontraron en el perfil de ácidos grasos de los rotíferos en mayor o menor cantidad (Tabla 6).

El perfil de ácidos grasos de la dieta influyó en el perfil de los rotíferos al final de 5 días de crecimiento, observándose diferentes perfiles de ácidos grasos en los rotíferos. Fábregas *et al.* (2001) y Ferreira *et al.* (2009) obtuvieron correlaciones elevadas entre el perfil bioquímico de la dieta y de la *Artemia* sp. y rotífero, respectivamente. El perfil de los rotíferos obtenido con la dieta *N. gaditana* en este trabajo se asemeja al obtenido en el enriquecimiento realizado por Ferreira *et al.* (2009).

El contenido de ácidos grasos saturados en los rotíferos no presentó diferencias significativas cuando sometidos a las diferentes dietas (*C. placoides*, *R. lens*, *N. gaditana*), no obstante la menor fracción se observó en los rotíferos alimentados con *R. lens* con un  $31,75 \pm 7,14\%$ , mientras que cuando alimentados con *C. placoides* y *N. gaditana* su contenido alcanzó un  $39,85 \pm 6,34\%$  y  $40,34 \pm 3,42\%$ , respectivamente. El menor contenido de ácidos grasos saturados observado en los rotíferos alimentados con *R. lens* se debe al menor contenido del ácido graso 16:0, que representó un  $16,14 \pm 1,80\%$ , significativamente inferior a los detectados con *N. gaditana* (Bonferroni's Multiple Comparison Test,  $p < 0,05$ ), alrededor de 24% del total de ácidos grasos. Los ácidos grasos 18:0 y 14:0, presentes en menor cantidad, representaron valores similares en los rotíferos sometidos a diferentes dietas, entre 11-14% y 2-4%, respectivamente.

El total de ácidos grasos monoinsaturados fue significativamente diferente (Bonferroni's Multiple Comparison Test,  $p < 0,05$ ) en los rotíferos cuando se alimentan con diferentes microalgas. El mayor contenido se observó con *N. gaditana* ( $19,21 \pm 0,90\%$ ), siguiéndose con *R. lens* ( $11,71 \pm 0,39\%$ ) y *C. placoides* ( $4,52 \pm 2,27\%$ ), reflejando el diferente contenido de ácidos grasos monoinsaturados de cada microalgas. Con *N. gaditana* se detectó un  $10,97 \pm 7,80\%$  del ácido graso 16:1, expresando el elevado contenido de este ácido graso en esta microalga, mientras que no fue detectado en los rotíferos alimentados con las



criptófitas, reflejando el bajo contenido de este ácido graso en ambas especies. El contenido del ácido graso 18:1 representó entre un 4,5 y un 8,0% en los diferentes rotíferos, mientras que el ácido graso 20:1n9 no se detectó con *C. placodea*, siendo significativamente superior en los rotíferos alimentados con *R. lens* ( $3,70 \pm 0,28$  %) que en los rotíferos alimentados con *N. gaditana* ( $1,13 \pm 0,28$  %) (Bonferroni's Multiple Comparison Test,  $p < 0,05$ ).

El mayor contenido de PUFAs presente en las criptófitas se reflejó en el mayor contenido de PUFAs observado en los rotíferos alimentados con *C. placodea* y *R. lens*, siendo estos significativamente superiores con *C. placodea* ( $55,63 \pm 4,13$ %) y *R. lens* ( $60,24 \pm 7,21$  %) que en los rotíferos alimentados con *N. gaditana* (R-Nanno:  $41,59 \pm 4,87$ %) (Bonferroni's Multiple Comparison Test,  $p < 0,05$ ).

El contenido de los ácidos grasos 18:3n3, 18:4n3 y 20:4n3 fue similar en los rotíferos sometidos a ambas criptófitas representando 16 – 17 %, 8 – 9 % y 9 – 10 % del total de ácidos grasos, respectivamente. Estos ácidos grasos no fueron detectados o se detectaron en cantidades muy reducidas ( $< 0,5$ %) en los rotíferos alimentados con *N. gaditana*. La presencia de los ácidos grasos 18:3n3 y 18:4n3 en elevadas cantidades en los rotíferos se debe al elevado contenido de estos en el perfil de ácidos grasos de las microalgas *R. lens* y *C. placodea*.

El mayor contenido del ARA y EPA en la eustigmatófito *N. gaditana* se reflejó en el mayor contenido de estos ácidos grasos en los rotíferos alimentados con esta microalga,  $6,51 \pm 0,12$  y  $20,93 \pm 0,95$  % del total de ácidos grasos, respectivamente, siendo significativamente superiores a los obtenidos en los rotíferos alimentados con las criptófitas, que representaron alrededor de un 2 y 8%, respectivamente (Bonferroni's Multiple Comparison Test,  $p < 0,05$ ). Por lo tanto, estos PUFAs no son esenciales en la dieta para obtener un buen crecimiento del rotífero, aunque si necesarios para las larvas de peces.

El 22:5n3 se detectó en los rotíferos alimentados con *R. lens* y *N. gaditana*, siendo este significativamente (Bonferroni's Multiple Comparison Test,  $p < 0,05$ ;) superior en los rotíferos alimentados con *N. gaditana* ( $7,66 \pm 0,13$  %) que con *R. lens* ( $2,65 \pm 0,13$  %). El mayor contenido de 22:5n3 en los rotíferos alimentados con *N. gaditana* y presentes también en menor cantidad en los rotíferos alimentados con *R. lens*, sugiere que el rotífero es capaz de alongar el EPA. El DPA (22:5n6) presente en la microalga *C. placodea* se detectó solamente

en los rotíferos alimentados con esta especie ( $4,02 \pm 0,09\%$ ). Por otro lado, el DHA (22:6n3) presente en la *R. lens* solamente se detectó en los rotíferos alimentados con *R. lens* representando un  $6,21 \pm 0,44\%$ .

El ácido graso 20:4n3, detectado en los rotíferos alimentados con las criptófitas no había sido detectado en el perfil de ácidos grasos de *B. plicatilis* en otros trabajos de crecimiento y enriquecimiento realizados en el laboratorio de la USC cuando se alimentaron con *R. lens*, *N. gaditana* y T-ISO (Coutinho, 2008; Ferreira *et al.*, 2008; 2009 y 2011). Cuando se alimentó con *R. lens* (Coutinho, 2008), no se detectó el ácido 20:4n3 en los rotíferos, sin embargo las fracciones del ácido araquidónico (20:4n6) obtenidas son similares a las del 20:4n3 detectadas en nuestro trabajo. La presencia del ácido 20:4n3 fue documentada en otros trabajos, siendo la mayor fracción detectada en los huevos de *B. plicatilis*, un 4,8% (Dhert *et al.*, 1997), siendo que en rotíferos la fracción de 20:4n3 presentó valores similares a lo del 20:4n6, por debajo del 2% dependiendo de la dieta proporcionada (Castell *et al.*, 2003; Dhert *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 2005; Lopes, 2010;) pudiendo alcanzar hasta un 5% (Seychelles *et al.*, 2009; Freire, 2015). Se ha descrito que el 20:4n3, al igual que el 20:4n6, consigue modular la producción de eicosanoides en células de mamíferos (Careaga y Sprecher, 1987; Corset *et al.*, 1999; Oliw *et al.*, 1986 a y 1986b) no siendo los peces diferentes de ellos en respecto a la producción de eicosanoides, produciendo prácticamente todos los tejidos la misma amplia gama de eicosanoides en una gran variedad de peces de agua dulce y marinos (Tocher 1995; 2003). Ambos, ARA y EPA sirven como precursores eicosanoides en los tejidos de peces, siendo el ARA preferido. Ghioni *et al.* (2002) demostraron la utilización del 20:4n3 en el metabolismo de eicosanoides en salmónidos disminuyendo la producción de estos a partir del ARA, convirtiéndose en sus mismos derivados de eicosanoides, así como la utilización del 18:4n3 como precursor del 20:4n3. El perfil de ácidos grasos de *B. plicatilis* sugiere que la presencia del ácido graso 18:4n3 detectado en las criptófitas podrá haber funcionado como precursor del 20:4n3 presente en proporciones relevantes en los rotíferos alimentados con estas microalgas.

Las criptófitas ya habían sido documentadas como un grupo de elevado valor nutritivo para organismos filtradores debido a su elevado contenido proteico y aminoácidos así como el elevado contenido de PUFAs (Dunstan *et al.*, 2005). El género *Rhodomonas* demostró ser un excelente alimento al generar una elevada producción de huevos y tasa de crecimiento de

nauplius de copépodos (McKinnon *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2001; Veloza *et al.*, 2006), así como en el crecimiento y supervivencia de *Artemia* (Seias *et al.*, 2008; 2009). Además, las criptófitas han producido buenos resultados en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (Guevara *et al.*, 2011) además en el género *Synchaeta* frente a otras microalgas (Stemberger, 1981; Oltra *et al.*, 2000).

Tal y como se ha demostrado anteriormente, las criptófitas obtuvieron productividades elevadas similares a las obtenidas con *N. gaditana* en este trabajo. Así, se demostró que es posible la producción masiva de estas microalgas en condiciones idénticas a las demás comúnmente utilizadas en acuicultura. Las criptófitas presentaron un mejor perfil bioquímico, rico en proteína y PUFAs importantes en el cultivo larvario.

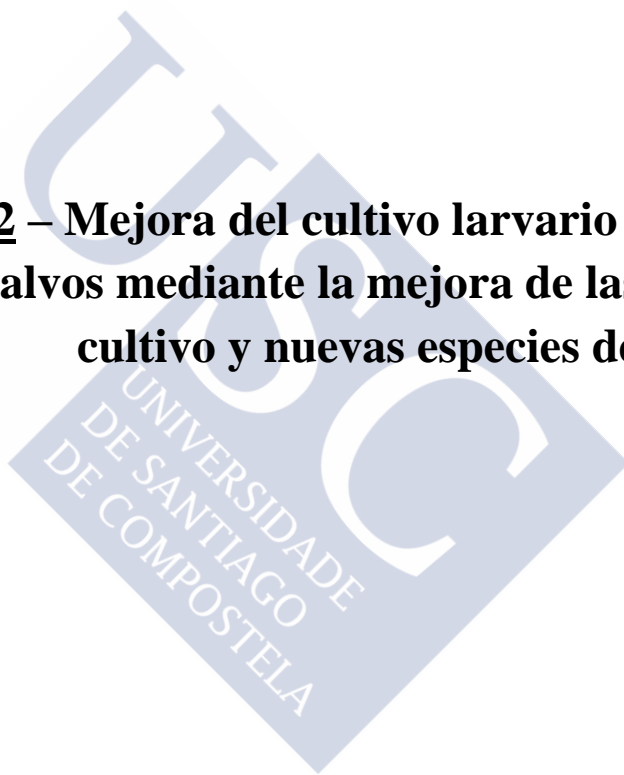
*C. placoidea* mostró ser un óptimo alimento para rotíferos, originando mayor producción de huevos y consecuentemente mayor crecimiento. Sin embargo, el mejor perfil de ácidos grasos se obtuvo en los rotíferos alimentados con *R. lens* que presentaron un perfil de ácidos grasos esenciales más variedad. Las criptófitas demostraron ser un óptimo alimento para rotíferos, originando tasas de crecimiento idénticas y/o mejores que cuando utilizada *N. gaditana*, además de un excelente perfil de ácidos grasos. Estos resultados demuestran la mayor eficiencia de las criptófitas como alimento, que resultó en un mayor peso de los rotíferos alimentados con *R. lens* y *C. placoidea*, derivado de una menor FCR que con *N. gaditana*. La superioridad de los rotíferos cultivados con las criptófitas debe ser demostrada además con experimentos de cultivo larvario.

Tabla 6 - Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las microalgas (*C. placoidea*, *R. lens*, *N. gaditana*) utilizadas en la dieta y de los rotíferos *Brachionus plicatilis*, en el final de los 5 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro del mismo día (Bonferroni multiple comparison test,  $p < 0,05$ ).

Ácidos grasos	<i>Chroomonas placoidea</i>		<i>Rhodomonas lens</i>		<i>Nannochloropsis gaditana</i>	
	Microalga	Rotífero	Microalga	Rotífero	Microalga	Rotífero
<b>14:0</b>	2,72 ± 0,06	2,19 ± 0,22	14,12 ± 0,42	4,25 ± 2,46	5,53 ± 0,03	3,68 ± 2,46
<b>16:0</b>	22,78 ± 0,17	23,47 ± 4,07 <sup>a,b</sup>	13,94 ± 0,30	16,14 ± 1,80 <sup>a,b</sup>	26,94 ± 1,06	23,95 ± 1,80 <sup>b</sup>
<b>16:1</b>	1,79 ± 0,43	n.d.	2,57 ± 0,89	n.d.	20,29 ± 0,28	10,97 ± 7,80
<b>18:0</b>	2,52 ± 0,86	14,20 ± 2,13	1,79 ± 1,05	11,36 ± 7,80	0,85 ± 0,06	12,71 ± 0,25
<b>18:1n9</b>	6,09 ± 0,15	4,52 ± 2,27	9,61 ± 0,75	8,01 ± 0,25	3,95 ± 0,35	7,11 ± 0,05
<b>18:2n6</b>	9,18 ± 0,23	7,31 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,04	2,70 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,51 ± 0,05	4,82 ± 3,11 <sup>c</sup>
<b>18:3n6</b>	0,28 ± 0,24	n.d.	n.d.	n.d.	1,56 ± 0,03	0,13 ± 1,36
<b>18:3n3</b>	23,83 ± 0,47	16,56 ± 0,77	22,05 ± 0,23	16,05 ± 3,11	n.d.	n.d.
<b>18:4n3</b>	16,27 ± 0,12	9,02 ± 0,39	17,97 ± 0,10	7,93 ± 1,36	n.d.	n.d.
<b>20:1n9</b>	n.d.	n.d.	n.d.	3,70 ± 0,28 <sup>a</sup>	n.d.	1,13 ± 0,28 <sup>b</sup>
<b>20:4n6</b>	0,08 ± 0,14	1,83 ± 1,78 <sup>a</sup>	n.d.	2,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	6,61 ± 0,16	6,51 ± 0,12 <sup>b</sup>
<b>20:4n3</b>	0,50 ± 0,48	9,25 ± 0,73 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,02	10,44 ± 1,14 <sup>a</sup>	n.d.	0,42 ± 1,14 <sup>b</sup>
<b>20:5n3</b>	8,79 ± 0,26	7,63 ± 0,38 <sup>a</sup>	8,21 ± 0,10	8,57 ± 0,95 <sup>a</sup>	30,77 ± 1,19	20,93 ± 0,95 <sup>b</sup>
<b>22:5n6</b>	5,19 ± 0,27	4,02 ± 0,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>22:5n3</b>	n.d.	n.d.	n.d.	2,65 ± 0,13 <sup>a</sup>	n.d.	7,66 ± 0,13 <sup>b</sup>
<b>22:6n3</b>	n.d.	n.d.	6,81 ± 0,13	6,21 ± 0,44	n.d.	n.d.
<b>∑ Saturados</b>	28,02 ± 0,93	39,85 ± 6,34	29,85 ± 1,21	31,75 ± 7,14	33,31 ± 0,97	40,34 ± 3,42
<b>∑ Monoinsaturados</b>	7,87 ± 0,38	4,52 ± 2,27 <sup>a</sup>	12,19 ± 1,64	11,71 ± 0,39 <sup>b</sup>	24,24 ± 0,08	19,21 ± 0,90 <sup>c</sup>
<b>∑ PUFA</b>	64,11 ± 1,08	55,63 ± 4,13 <sup>a,b</sup>	57,97 ± 0,45	60,24 ± 7,21 <sup>a</sup>	42,45 ± 1,04	41,59 ± 4,87 <sup>c</sup>

n.d. – no detectado

**Capítulo 2 – Mejora del cultivo larvario de moluscos  
bivalvos mediante la mejora de las técnicas de  
cultivo y nuevas especies de microalgas**





## 1. Efecto de la tasa de renovación de cultivos semicontinuos de microalgas en la supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos

### 1.1. Justificación y diseño experimental

La utilización de las microalgas en acuicultura de moluscos bivalvos está limitada a un grupo restringido de microalgas, en parte debido al desconocimiento de la viabilidad del uso de otras especies, derivado en muchos casos de la dificultad de cultivo por la aplicación de métodos de cultivo primitivos, que pueden llevar a conclusiones erróneas de su perfil bioquímico (Fábregas *et al.*, 1998). A través de cultivos semicontinuos es posible manipular la composición bioquímica de la microalga cambiando la tasa de renovación y concentración de nutrientes, con resultados muy positivos en algunos animales filtradores como el rotífero *Brachionus plicatilis* o el microcrustáceo *Artemia* sp. (Fábregas, *et al.*, 1998; 2001; Ferreira *et al.*, 2011). A pesar de los excelentes resultados obtenidos en otras especies mediante esta técnica de manipulación de la composición bioquímica de las microalgas, hasta el momento no ha sido probado el efecto de las mejoras nutricionales derivadas de la utilización de cultivos continuos/semicontinuos sobre el crecimiento y la supervivencia de los cultivos larvarios de moluscos bivalvos, a pesar de que la nutrición es considerada el factor dominante que influencia el crecimiento y desarrollo larvario en estos organismos (His *et al.*, 1989). Por todo ello, como aproximación inicial a la mejora de la viabilidad de los cultivos larvarios de moluscos bivalvos mediante la mejora de la calidad de la dieta microalgal, se realizaron cultivos de las 3 especies microalgales más comúnmente utilizadas en la dieta de éstos: *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros* sp. en sistemas semicontinuos con dos tasas de renovación distintas con fin de evaluar el efecto de las distintas composiciones bioquímicas generadas sobre el crecimiento y supervivencia de cultivos de algunas de las especies de moluscos bivalvos producidas en criadero de mayor valor comercial: almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), ostra europea (*Ostra edulis*) y ostra japonesa (*Crassostrea gigas*).

Para el cultivo larvario de moluscos bivalvos se utilizó como dieta *standard* la dieta formulada en el manual de la FAO (Helm *et al.*, 2004) que consiste en una mezcla de éstas

tres especies de microalgas: *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y la diatomea *Chaetoceros* sp. en una razón 1:1:1 de peso seco. Para el cálculo de la dieta mixta de las 3 especies se consideró como referencia una dieta mono-específica de  $100\ 000\ \text{células}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  de *I. galbana*, convirtiéndose a dieta mixta a través de la comparación del peso seco celular teórico de las diferentes especies (Brown, 1991). Las microalgas se cultivaron en régimen semicontinuo con dos tasas de renovación diaria. Las microalgas cultivadas con una renovación diaria de un 10% formaron la dieta FAO 10% y las microalgas cultivadas con una renovación del 40% diario formaron la dieta FAO 40%.

Debido a que la aplicación de distintas tasas de renovación en los cultivos semicontinuos de microalgas afecta tanto a la composición bioquímica como a la carga bacteriana de los cultivos, las dietas se evaluaron con y sin adición del antibiótico cloranfenicol, con el objetivo de discernir la importancia relativa de ambos factores, probándose de este modo dietas con diferentes condiciones: FAO 10%; FAO 40%; Chl-FAO10% (adición de Cloranfenicol, 2,5mg/L) y Chl-FAO 40% (adición de Cloranfenicol, 2,5mg/L).

## 1.2. Resultados y Discusión

### 1.2.1. Cultivos semicontinuos de microalgas y composición bioquímica de las dietas

#### 1.2.1.1. Densidad celular y productividad

Debido a que los experimentos de alimentación larvaria se llevaron a cabo a lo largo de un periodo prolongado en el tiempo (Febrero 2012 – Enero 2014), fue necesario realizar distintos cultivos semicontinuos. Las densidades de estabilización alcanzadas por las especies de microalgas presentaron valores medios similares en los distintos experimentos (ANOVA,  $p>0,05$ ), demostrando que, una vez establecidos los parámetros de cultivo iguales, las densidades celulares de las microalgas tienden a estabilizarse en valores muy similares cuando se aplican las mismas tasas de renovación diarias para valores similares (Figura 28). Esta estabilidad conlleva también la estabilidad del perfil bioquímico de los cultivos utilizados para la alimentación de las larvas, lo que constituye una de las mayores ventajas de esta técnica de cultivo (Otero, 1995).



Como sucede típicamente en los sistemas semicontinuos, la densidad celular de estabilización de los cultivos utilizados para alimentar las larvas disminuyó con el incremento de la tasa de renovación, observándose una mayor densidad celular en cultivos mantenidos con menor tasa de renovación (10%) y menor en los cultivos sometidos a renovación diaria del 40% (Figura 28). La densidad celular de *Isochrysis galbana* se estabilizó entre un  $65,2 \pm 2,5$  y  $79,9 \pm 5,5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, sin diferencias significativas en los diferentes ensayos (ANOVA,  $p > 0,05$ ), para tasas de renovación de 10 y 40% respectivamente. Sin embargo, para la mayor tasa de renovación (40%), se registró una menor densidad celular en el experimento 2013-1, en la que la densidad de estabilización con la tasa elevada descendió hasta aproximadamente  $25 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, no lográndose alcanzar un verdadero estado de equilibrio, por lo que el dato no se muestra en la Figura 28. Esta disminución se debió a una limitación en la disponibilidad de vitaminas derivada de un error en la preparación del stock de vitaminas del medio de cultivo ALGAL. Este efecto no se observó en las otras dos especies, indicando un menor requerimiento de vitaminas. El requerimiento de vitaminas es más patente en los cultivos mantenidos con tasa de renovación elevada (Cortina-Burgueño *et al.*, 2011) y es probablemente la causa del lavado del cultivo. La alimentación durante el final de Mayo y el inicio de Junio de las larvas de *R. philippinarum* y *C. gigas* con dietas en las que se incluyó este cultivo de *I. galbana* llevó a resultados contradictorios, no siendo considerados como se explicará adelante.

Utilizando el mismo sistema de cultivo de 80 mL, Otero *et al.* (1997b) obtuvieron densidades celulares de estabilización inferiores para las mismas tasas de renovación, alcanzando  $63$  y  $25 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, para las tasas de renovación de 10 y 40%, respectivamente. Esta diferencia se debe a la menor intensidad luminosa utilizada y la menor concentración de nitratos en el medio de cultivo (4mM). Seixas *et al.* (2009) cultivó *I. galbana* en sistema semicontinuo con renovación diaria de un 30% en botellones de 6L y NO<sub>3</sub> ajustado a 2mM, alcanzando también una menor densidad celular de estabilización ( $15 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup>) debido a la limitación de nutrientes y luz causada por el diámetro del sistema de cultivo utilizado.

*T. suecica* presentó densidades celulares muy similares en los diferentes experimentos (ANOVA,  $p > 0,05$ ), con los cultivos estabilizados alrededor de  $14,4 \pm 1,1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para TR 10% y  $10,4 \pm 1,0 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para TR 40% (Figura 28). Para la misma especie

cultivada en los mismos fotobiorreactores, Otero y Fábregas (1997) obtuvieron menores densidades para las mismas tasas de renovación, alcanzando un máximo de estabilización de 9 y  $5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para TR 10 y 40% respectivamente, mientras que Ulloa *et al.* (2012) obtuvo un máximo de  $7 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para TR 40% justificado en ambos casos por la menor concentración de nutrientes, ajustados a 4mM de nitrato frente a los 8 mM utilizados en nuestros cultivos, y a la menor intensidad luminosa en los cultivos.

Los cultivos de *Chaetoceros* sp. obtuvieron densidades de estabilización similares en los distintos experimentos (ANOVA,  $p > 0,05$ ), con valores medios de  $27,2 \pm 5,4 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> y  $17,6 \pm 1,4 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, para TR 10 y 40% respectivamente (Figura 28). Estos valores son equiparables a los obtenidos en ensayos previos realizados con *Chaetoceros* sp. en el laboratorio (resultados no publicados) donde las densidades de estabilización de los cultivos semicontinuos con TR 25% oscilaron entre 15 y  $20 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para diferentes formulaciones en el medio de cultivo ALGAL. Nascimento (2010) obtuvo densidades celulares de estabilización inferiores, alcanzando  $12,6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para la misma especie cultivada con medio ALGAL ajustado a 4mM de NO<sub>3</sub>, en régimen semicontinuo con TR 30% cada 2-3 días y luz continua en botellón de 5L. La importancia de las microalgas del género *Chaetoceros*, debido a su valor nutricional en particular para larvas de bivalvos, llevó a algunos autores a evaluar el escalado para producción masiva en fotobiorreactores de grandes volúmenes, sin embargo las densidades obtenidas fueron inferiores a las obtenidas en nuestros cultivos, estando en general limitados por luz debido al diámetro del fotobiorreactor, que afecta a la irradiancia efectiva disponible en el fotobiorreactor o limitados por los nutrientes del medio f2. Parrish y Wangersky (1990), utilizando el medio f2, solamente describen densidades celulares entre un 0,3 y  $1,0 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> en cultivo en turbidostato y luz continua para *C. gracilis*. Pernet *et al.* (2003) alcanzaron una densidad de  $12 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> cultivando *C. muelleri* en sistema semicontinuo, con renovaciones de un 50% del volumen del cultivo cada dos días, en un volumen de cultivo de 170 L. Kaspar *et al.* (2014) alcanzaron una densidad de estabilización de *C. calcitrans* de aproximadamente  $12 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> en sistema continuo, con una productividad celular diaria similar a la obtenida por Krichnavaruk *et al.* (2005).

La diatomea céntrica *Chaetoceros* sp., a diferencia de lo que ocurre en los sistemas industriales referidos, no presentó dificultades especiales con respecto a las otras especies

probadas (*I. galbana* y *T. suecica*). Los cultivos se mantuvieron con densidades celulares elevadas estables y alcanzaron valores de estabilización similares en las diferentes fases de cultivo, sin colapsos de los cultivos, lo que confirma que la técnica de cultivo y el control de variables como disponibilidad de nutrientes y pH son cruciales para obtener buenos resultados en esta especie.

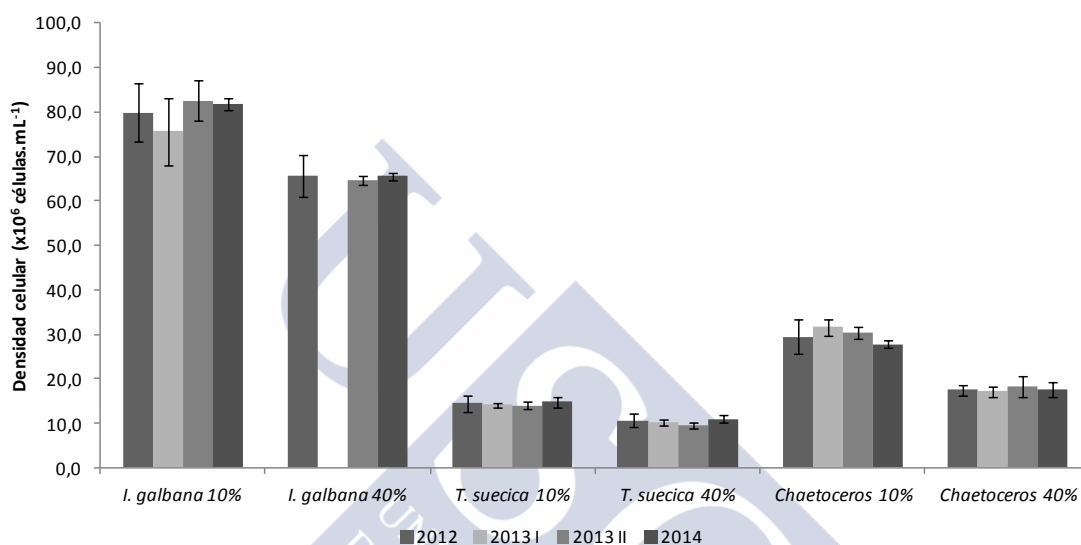


Figura 28 - Densidades celulares de estabilización de los cultivos microalgales producidos en sistema semicontinuo sometidas a dos tasas de renovación, 10 y 40%, en diferentes experimentos. Los datos corresponden a la media de las densidades celulares de los cultivos (n=3 para cada experimento y condición) durante los días en los que fueron utilizados para alimentar a las larvas de moluscos.

A pesar de que los valores de densidad celular son máximos con la tasa de renovación del 10%, la productividad volumétrica en peso presentó sus valores máximos en los cultivos con tasa de renovación de 40% (Figura 29). La aplicación de mayores tasas de renovación (40%) en *I. galbana* resultó en mayores productividades alcanzando aproximadamente 480 mg.mL<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, casi el doble de la productividad obtenida con tasa de renovación de 10%, 252 mg.mL<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. No obstante, el mayor peso celular se observó en las células de la menor tasa de renovación, con 30,8 pg.célula<sup>-1</sup>, frente a los 21,0 pg.célula<sup>-1</sup> para la mayor tasa de renovación (Figura 29).

*T. suecica* presentó las mayores productividades entre las diferentes especies en ambas tasas de renovación. Las productividades alcanzadas por *T. suecica* con una TR10% fue 318 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, mientras que para TR del 40% las productividades casi doblaron, alcanzando valores medios de 518 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. El peso seco celular alcanzó 226,7 y 180,8 pg.cél<sup>-1</sup> para las tasas de renovación de 10 y 40%, respectivamente (Figura 29). Fábregas *et al.* (1995b) alcanzó un máximo de 216 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> en sistemas similares de 1L con NO<sub>3</sub> ajustado a 4mM y con una TR50%. Productividades máximas de 460 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> han sido descritas por Zittelli *et al.* (2006) y Michels *et al.* (2014) en fotobiorreactores anulares y tubulares, respectivamente, sometidos a luz solar natural.

Las mayores productividades para *Chaetoceros* sp. fueron igualmente obtenidas en los cultivos con tasa de renovación diaria de 40%. Para la TR 10% se obtuvieron productividades medias de 279 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> mientras que para TR de 40% las productividades alcanzaron aproximadamente 464 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. Al igual que lo observado en las demás microalgas se obtuvo el mayor peso seco para la menor tasa de renovación, con 96,6 pg.cél<sup>-1</sup>, mientras que para la TR40% las células presentaron menor peso celular, con 60,0 pg.cél<sup>-1</sup> (Figura 29).

Estas productividades se encuentran entre las más altas reportadas en la literatura, lo que demuestra la efectividad de nuestro sistema y la viabilidad de su utilización como modelo para la optimización de sistemas a gran escala.

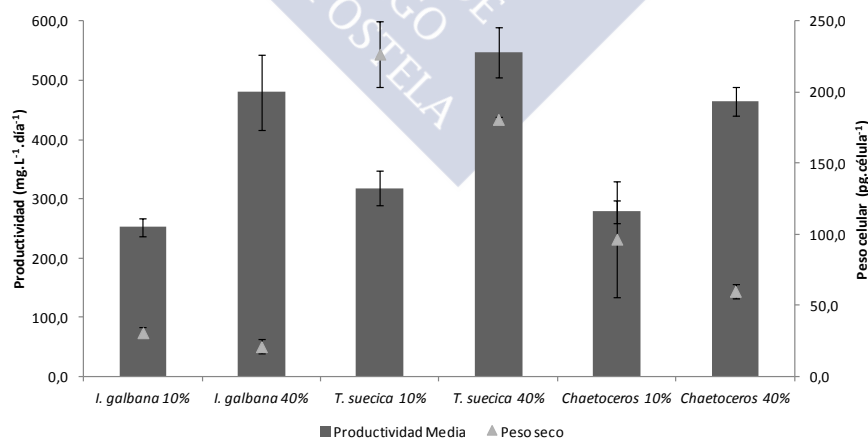


Figura 29 - Productividades medias (mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>) y pesos secos celulares (pg.célula<sup>-1</sup>) de los cultivos microalgales producidos en cultivo semicontinuo sometidos a dos tasas de renovación, 10 y 40%. Los datos corresponden a la media de las productividades de los cultivos realizados en las 4 fases de ensayos (n=4). En cada ensayo se calculó el peso seco por triplicado (n=3).

### 1.2.1.2. Composición bioquímica das microalgas

Cuando se aplican las mismas condiciones de cultivo y la misma tasa de renovación, los cultivos microalgales tienden a estabilizarse en los mismos valores de densidad celular y, consecuentemente su perfil bioquímico es idéntico (Otero, 1995). Por ello, solo se presentarán los perfiles bioquímicos de las microalgas en el segundo muestreo tomado en 2013 utilizados en los experimentos de alimentación de larvas de *Ruditapes philippinarum*.

Tal y como se ha descrito para otras especies en sistemas semicontinuos (Otero *et al.*, 1997b; Otero *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2008; 2009; 2011) la relación C:N disminuye con el incremento de la tasa de renovación en condiciones de limitación de N. Este es el caso de *T. suecica*, para la que el incremento de la tasa de renovación resultó en una marcada disminución de la relación C:N, que se redujo a más de la mitad, pasando de aproximadamente 16 a 6,2, para TR de 10 y 40% respectivamente. Sin embargo, para *I. galbana* y *Chaetoceros* sp., la relación C:N presentó valores muy similares para las dos tasas de renovación, alrededor de 9 y 10, respectivamente, lo que sugiere que ambos cultivos estaban saturados en nitrógeno. Los valores obtenidos por estas dos microalgas son elevados ya que en un cultivo microalgal sin limitación de nutrientes la relación C:N tiende a aproximarse a la relación de Redfield, que tiene un valor de 6,6 (Goldman *et al.*, 1979). No obstante, otros autores obtienen también una mayor relación C:N en otras especies de *Isochrysis*. Ferreira *et al.* (2008; 2011), en iguales sistemas de cultivo, registraron una marcada disminución de la relación C:N con el incremento de la tasa de renovación en *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO), observándose una disminución de la relación C:N de 18 a 9 (TR 10 y 40%, respectivamente) estando éste cultivo saturado en nitrógeno. Seixas *et al.* (2008) obtuvo igualmente una relación C:N más baja para *T. suecica* (5,2) y elevada para *I. galbana* (8,8) en cultivos semicontinuos y con tasa de renovación de 30%, en cultivos de 6 L saturados en nitrógeno. Para *Chaetoceros* sp., el valor de la relación C:N obtenido en los tubos de 30 mm de diámetro en este trabajo es superior al valor obtenido para la misma especie (8,8) cuando se cultivó en botellones de 6L en sistema semicontinuo con renovaciones a cada dos días (Nascimento, 2010). Los valores obtenidos por otros autores sugieren una mayor relación C:N en las especies *I. galbana* y *Chaetoceros* sp., comparativamente a los

valores de *T. suecica*, tal y como se observó en este trabajo. No obstante, la aplicación de las diferentes tasas de renovación resultaron en valores similares en la relación C:N indicando saturación de nutrientes en los cultivos en ambas las tasas de renovación (10 y 40%). Esta hipótesis se ve corroborada por los valores de porcentaje en proteína de la biomasa. En cultivos saturados de nitrógeno la relación C:N tiende a estabilizarse con la tasa de renovación (Otero *et al.*, 1998). En los otros muestreos realizados al largo de los ensayos, también se verificó estabilización del valor de la relación C:N en los cultivos sometidos a diferentes tasas de renovación, tanto en *I. galbana* como *Chaetoceros* sp., alcanzando valores alrededor de 8,4 y 9,0, respectivamente, corroborando que los cultivos estaban saturados en nitrógeno. En condiciones limitantes de nitrógeno, sería de esperar un incremento de la relación C:N en la tasa de renovación 10%, para valores superiores a los obtenidos, como en Ferreira *et al.* (2008; 2011), que obtuvo una relación C:N de 18 como valor máximo en una especie del género *Isochrysis*.

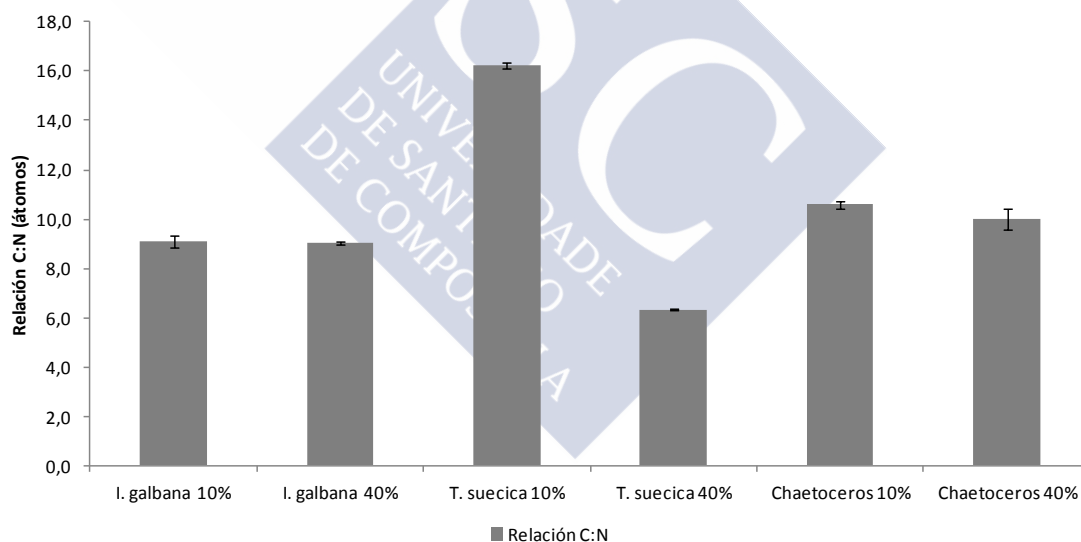


Figura 30 - Relación C:N de las diferentes especies microalgales sometidas a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%), tomados en 2013.

La mayor disminución en el valor de la relación C:N observada en *T. suecica* con el incremento de la tasa de renovación, se reflejó en el mayor incremento del contenido proteico observado en las microalgas utilizadas, registrándose un marcado aumento desde un 15 hasta



un 40% del peso seco, para las tasas de renovación de 10 y 40% respectivamente (Figura 31A; Figura 32).

La aplicación de mayores tasas de renovación al cultivo microalgal permite, en general, incrementar el contenido proteico en la microalga cuando el nitrógeno es limitante. Lo mismo fue demostrado no solo para las mismas especies utilizadas en este trabajo sino también para otras microalgas cuando son cultivadas en régimen semicontinuo en condiciones de cultivo idénticas, al incrementarse el contenido proteico aplicando tasas de renovación mayores: *Dunaliella tertiolecta* (Fábregas *et al.*, 1995), *Phaeodactylum tricornutum* (Fábregas *et al.*, 1996a), *Chlorella autotrophica* (Fábregas *et al.*, 1996b), *Tetraselmis suecica* (Otero y Fábregas, 1997), T-ISO (Ferreira *et al.*, 2008; 2011), *Nannochloropsis gaditana* (Ferreira *et al.*, 2009). No obstante, en condiciones de nitrógeno saturante el contenido proteico, al igual que la relación C:N tiende a estabilizar (Fábregas *et al.*, 1996; Otero *et al.*, 1998). En los cultivos de *I. galbana* y *Chaetoceros* sp., al igual que la relación C:N, el contenido proteico presentó valores similares para las dos tasas de renovación, corroborando la hipótesis de que el nitrógeno estaba saturado en estas microalgas. En ambas se observó un ligero incremento del contenido proteico con el incremento de la tasa de renovación, de un 30,7 hasta 32,3% en *I. galbana* y 22,3 hasta 25,3% en *Chaetoceros* sp., respectivamente (Figura 31A; Figura 32). Lo mismo se observó en los muestreos realizados en 2014, con el contenido proteico incrementándose solo ligeramente con el aumento de la tasa de renovación en *I. galbana* (de 36,9% hasta 38,8%) y *Chaetoceros* sp. (de 19,5% hasta 23,4%).

*T. suecica* acumula carbohidratos pero no lípidos como reserva energética en condiciones de estrés por nitrógeno en sistema semicontinuo (Thomas *et al.*, 1984; Otero y Fábregas, 1997). Como era de esperar, el contenido en carbohidratos del peso seco en *T. suecica* disminuyó desde un 50,5% con una TR del 10% hasta un 12,8%, para TR 40% (Figura 31B; Figura 32). Esta drástica disminución se observó también en los cultivos semicontinuos de *T. suecica* de Otero y Fábregas (1997) que apuntan igualmente una disminución de la relación C:N, también que deriva por lo tanto no solo del incremento del contenido de nitrógeno, sino también de la disminución del contenido de carbono con el incremento de las tasas de renovación. Esta disminución se puede haber visto incrementada por el aumento de la respiración en la oscuridad con las tasas de crecimiento, observado por Laws y Bannister (1980) afectando a la relación C:N por la mañana, momento en que se cosechan los cultivos.

Asimismo, durante la oscuridad hay un consumo de carbohidratos y/o síntesis de lípidos, tornando la biomasa de mejor calidad nutritiva al incrementar el porcentaje de proteína.

Como se ha descrito anteriormente (Otero y Fábregas, 1997), *T. suecica* acumula carbohidratos, que tienden a disminuir con el incremento de las tasas de renovación, aumentando su contenido proteico y lipídico. En nuestro caso el contenido de lípidos sufrió un menor incremento que el contenido proteico, pasando de un 14,1 a un 21,1% del peso seco. Otero y Fábregas (1997) también observaron una menor variación del contenido lipídico en relación a los contenidos proteicos y de carbohidratos en esta especie.

Tal y como se observó para el contenido proteico, en condiciones de saturación de nitrógeno el perfil bioquímico relativo de la microalga tiende a estabilizarse (Fábregas *et al.*, 1996; Otero *et al.*, 1998), observándose solo ligeros cambios en el contenido de carbohidratos en *I. galbana* y *Chaetoceros* sp., con la aplicación de diferentes tasas de renovación (Figura 31B; Figura 32).

Cuando se cultiva en sistemas semicontinuos *I. galbana* utiliza los carbohidratos como la mayor fuente de reserva en respuesta al estrés provocado por la limitación de nutrientes (Otero *et al.*, 1997b). Con el incremento de la tasa de renovación, la disponibilidad de nutrientes es mayor resultando en una disminución del contenido de carbohidratos. No obstante, debido a la saturación de nitrógeno en ambas condiciones de cultivo, el contenido de carbohidratos solamente disminuyó de un 22,2% hasta un 17,1% en *I. galbana* y de un 15,4% hasta 11,9% del peso seco en *Chaetoceros* sp. (Figura 31B; Figura 32). En condiciones de limitación de nitrógeno, Otero *et al.* (1997b) obtuvieron una reducción del contenido de carbohidratos en *I. galbana* con el incremento de las tasas de renovación, desde 9,73 hasta 3,08 pg.célula<sup>-1</sup>. Lo mismo registraron Ferreira *et al.* (2008; 2011) observando una fuerte disminución en el contenido de carbohidratos, reduciéndose hasta la mitad, con el incremento de la tasa de renovación en T-ISO. En T-ISO cultivada en cultivos continuos con luz continua, la mayor fuente de energía de reserva son los polisacáridos, mientras que los lípidos parecen tener función estructural (Sukenik y Wahnou, 1991).

Muchas microalgas acumulan lípidos principalmente con bajas tasas de renovación (Fábregas *et al.*, 1995; 1996a; Ferreira *et al.*, 2009). El contenido lipídico de *I. galbana* fue



superior cuando se aplicaron bajas tasas de renovación, alcanzando un 32%, disminuyendo con la tasa de renovación del 40%, acumulando un 22% de peso seco (Figura 31C; Figura 32). En condiciones de luz continua en cultivos saturados de nutrientes en sistema de quimiostato, el contenido lipídico disminuyó casi tres veces con el aumento de la tasa de renovación para esta especie (Molina Grima *et al.*, 1994). Dadas las condiciones de saturación de nitrógeno, el incremento de lípidos observado en *I. galbana* con la disminución de la tasa de renovación se puede atribuir principalmente a lípidos estructurales asociados a menor disponibilidad de luz y no a la acumulación de lípidos de reserva, debido a la mayor densidad celular de estos cultivos, al igual que lo observado en Molina Grima *et al.* (1994). De hecho se verifica un perfil de ácidos grasos similar para las dos tasas de renovación. Las células sometidas a ciclos de luz/oscuridad en sistemas semicontinuos presentaron una disminución del contenido lipídico con el incremento de la tasa de renovación, de 6 a 4 pg.célula<sup>-1</sup> (Otero *et al.*, 1997b). La menor disminución del contenido lipídico con el incremento de la tasa de renovación está también asociada a la síntesis de lípidos estructurales durante la fase de oscuridad utilizando los carbohidratos acumulados durante el periodo de luz (Flynn *et al.*, 1992).

Al igual que lo observado en *I. galbana*, *Chaetoceros* sp. mostró pequeñas variaciones en su composición bioquímica ante la aplicación de diferentes tasas de renovación, corroborando la hipótesis de la saturación de nitrógeno en ambos cultivos. El contenido lipídico fue similar en los cultivos sometidos a las tasas de renovación de 10 y 40%, representando aproximadamente 25% del peso seco (Figura 31C; Figura 32). El contenido lipídico descrito en Helm *et al.* (2004) para las especies *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros gracilis* es alrededor de un 20% del peso seco, similar a los valores obtenidos para la especie utilizada en este trabajo. Algunos autores ya habían demostrado estabilidad en el contenido lipídico en la especie *Chaetoceros calcitrans* al largo del cultivo *batch* (Ragg *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2012), así como entre cultivos *batch* y continuos (Kaspar *et al.*, 2014). En algunas especies, incluyendo *Chaetoceros gracilis* (Lombardi y Wangersky, 1991), la producción de lípidos de reserva (TAG) es estimulada cuando la disponibilidad de Si es limitante para la división celular (Araujo *et al.*, 2011; Hildebrand *et al.*, 2012;). Otros nutrientes, como N y P, también han sido propuestos como promotores de la acumulación de lípidos en las diatomeas, sin embargo varios estudios sugieren que la deficiencia en Si estimula la formación de lípidos

más rápidamente y puede resultar en un mayor contenido lipídico (Shifrin y Chisholm, 1981; Enright *et al.*, 1986; Taguchi *et al.*, 1987; Mortensen *et al.*, 1988; Parrish y Wangersky, 1990, Lombardi y Wangersky, 1991; McGinnis *et al.*, 1997). La concentración de Si utilizado en el cultivo de *Chaetoceros* sp. fue el doble de la sugerida en el medio f2 (Guillard, 1975), una vez que trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron la limitación del crecimiento de esta especie con concentraciones menores (no publicados). Asimismo, ya que el silicio y el nitrógeno no eran limitantes en el medio, se puede justificar el contenido lipídico idéntico observado en los cultivos de *Chaetoceros* sp. sometidos a diferentes tasas de renovación (Figura 31 y Figura 32).

Las diferentes especies de microalgas responden de diferentes formas al estrés nutricional en sistemas semicontinuos. *Dunaliella tertiolecta* acumula principalmente carbohidratos con bajas tasas de renovación (Fábregas *et al.*, 1995a), tal y como se observa en *T. suecica* en este trabajo (Figura 31 y Figura 32) y descrito por otros autores (Otero y Fábregas, 1997). Otras microalgas como *Chlorella autotrophica* (Fábregas *et al.*, 1996b) o *Nannochloropsis gaditana* (Ferreira *et al.*, 2009) acumulan principalmente lípidos, mientras que *Phaeodactylum tricorutum* (Fábregas *et al.*, 1996a) acumula ambos, lípidos y carbohidratos, dependiendo del nivel de limitación. Las diferencias en el patrón de energía acumulada en sistemas semicontinuos también pueden reflejar diferencias en el metabolismo celular durante el periodo de oscuridad (Otero y Fábregas, 1997). Por su lado, los cultivos de *I. galbana* y *Chaetoceros* sp. presentaron perfiles bioquímicos similares cuando se sometieron a dos tasas de renovación distintas, comportándose ambas saturadas en nitrógeno (Figura 31 y Figura 32).

Además de lo observado en el perfil bioquímico de los cultivos microalgales sometidos a diferentes tasas de renovación, también se observaron diferencias importantes en la composición relativa de ácidos grasos de los cultivos de *T. suecica*, mientras que para los cultivos de *Chaetoceros* sp. y *I. galbana* el efecto no fue tan marcado o inexistente debido a la saturación de nitrógeno en el medio.

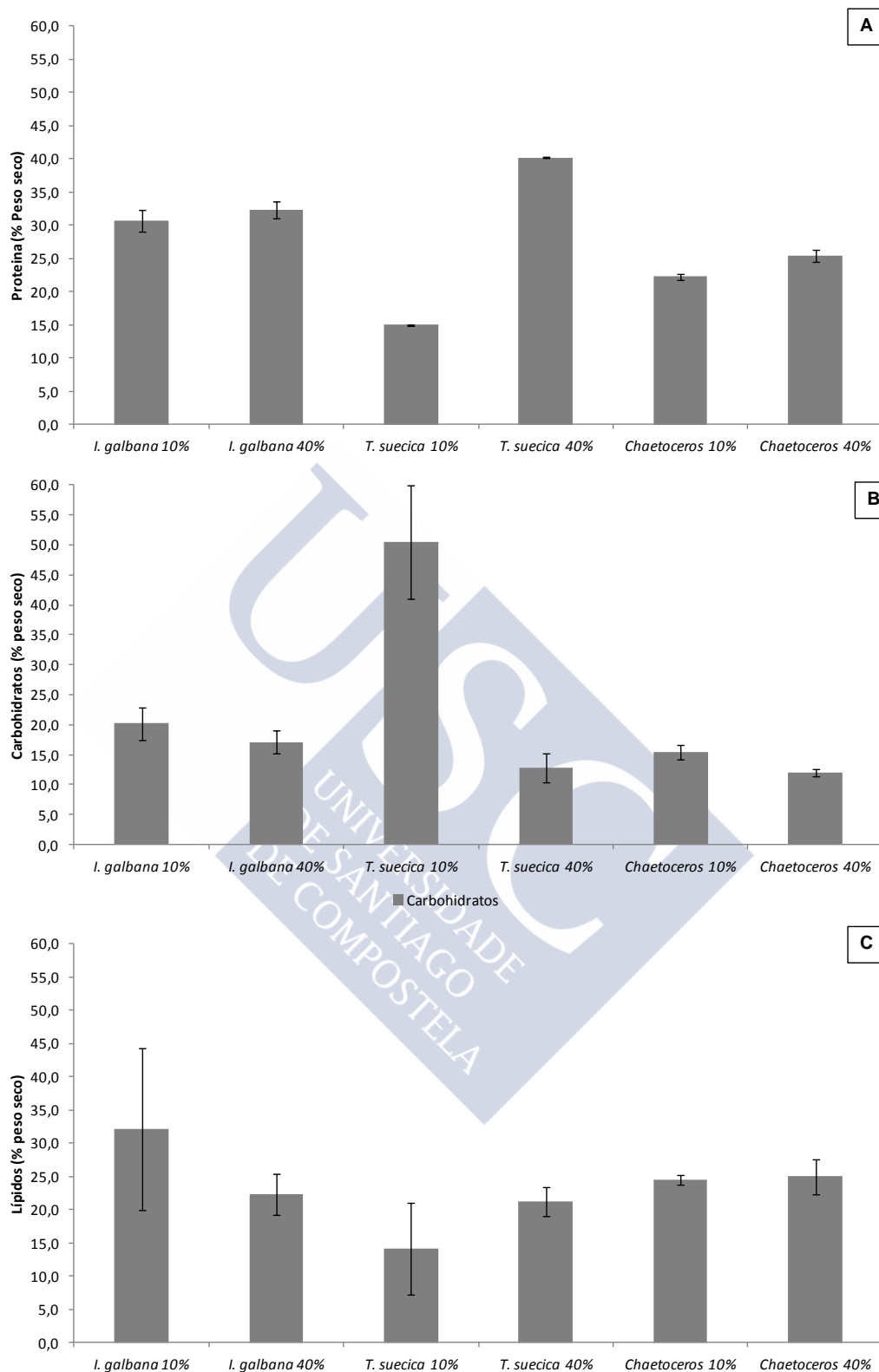


Figura 31 – Composición bioquímica de los cultivos microalgales (% peso seco) sometidos a dos tasas de renovación diarias (10 y 40% del volumen de los cultivos). valores tomados en 2013 (n=3): proteína(A), Carbohidratos (B), Lípidos (C).

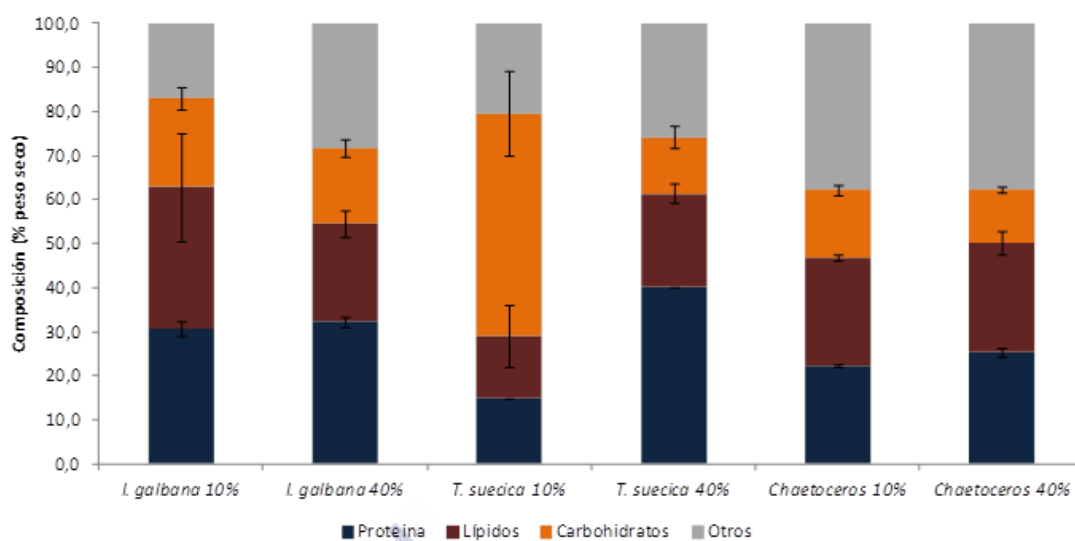


Figura 32 - Composición bioquímica relativa de las diferentes especies microalgales sometidas a dos tasas de renovación diarias diferentes (10 y 40% del volumen de los cultivos). Valores tomados en 2013.

El ácido graso palmítico (16:0) representó la mayor fracción en el contenido de ácidos grasos de *T. suecica* en ambas tasas de renovación, observándose una disminución del mismo con el incremento de la tasa de renovación, de 26,9% hasta 22,3% del total de ácidos grasos, respectivamente, siendo el principal ácido graso saturado detectado en esta especie (Tabla 7). El contenido de ácidos grasos monoinsaturados se caracterizó por el elevado contenido del ácido graso 18:1n9 que disminuyó hasta la mitad (10,0% del total de ácidos grasos) con el incremento de la tasa de renovación, resultando en una disminución desde el 26,5% hasta 14,9% en el contenido total de ácidos grasos monoinsaturados (Tabla 7). El descenso de estas 2 fracciones es indicativo de una sustitución en esta especie de los lípidos de reserva en los cultivos limitados por nitrógeno por lípidos estructurales en los cultivos saturados. El contenido de PUFAs en *T. suecica* se distribuyó entre varios ácidos grasos: 16:4n3, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3, 20:5n3, siendo también detectado, aunque en menor cantidad, el ácido graso araquidónico (ARA, 20:4n6). Es también de resaltar el incremento de un 12,5% hasta el 17,2% del ácido graso 16:4n3 y el marcado incremento del ácido graso 18:4n3 de un 4% hasta un 13% del total de ácidos grasos. Sin embargo, el EPA mantuvo su contenido alrededor de un 7% en ambas las tasas de renovación. El incremento de la tasa de renovación generó un

incremento del contenido de los PUFAs, resultando en un incremento desde un 20% hasta un 64% en el total de ácidos grasos (Tabla 7).

A pesar de las pequeñas diferencias observadas en la composición bioquímica de los cultivos de *Chaetoceros* sp. sometidos a dos tasas de renovación, en el perfil de ácidos grasos se pudieron observar ligeras diferencias entre ambos cultivos. *Chaetoceros* sp. obtuvo el mayor contenido de ácidos grasos saturados, representando más de 50% del total de ácidos grasos con la tasa de renovación de 10%. Con la aplicación de mayores tasas de renovación (TR 40%) fue posible reducir el contenido de ácidos grasos saturados hasta un 44,2% del total ácidos grasos y reducir ligeramente el contenido de ácidos grasos monoinsaturados hasta un 22%, resultando en un relativo incremento del total de ácidos grasos poliinsaturados de 21% hasta 30% del total de ácidos grasos. *Chaetoceros* sp. posee los ácidos grasos esenciales EPA y DHA. El EPA representa la mayor fracción de ácidos grasos poliinsaturados en esta microalga, que con el aumento de la tasa de renovación dobló su contenido en los cultivos hasta un 15% del total de ácidos grasos. El ácido graso DHA solamente representó un 1% y un 0,31% para las tasas de renovación de 40 y 10%, respectivamente. Es de destacar la presencia del ácido graso araquidónico (ARA, 20:4n6), que representa alrededor de un 7% en el total de ácidos grasos, en las dos tasas de renovación (Tabla 7).

La saturación de nitrógeno en el medio resultó en perfiles bioquímicos similares de *I. galbana* sometida a las dos tasas de renovación, reflejándose en perfiles de ácidos grasos muy similares en ambas (10 y 40%). El ácido palmítico (16:0) representó una importante fracción en el contenido de ácidos grasos de *I. galbana* con un 20% del total de ácidos grasos, representando el total de ácidos grasos saturados un 30% del total de ácidos grasos. Los ácidos grasos monoinsaturados representan alrededor de un 18% del total, detectándose los ácidos grasos 16:1 y 18:1n9 en un 15 y 3%, respectivamente. *I. galbana* es rica en ácidos grasos poliinsaturados que representaron un 50% del total de ácidos grasos, en ambos cultivos. De éstos, los ácidos grasos esenciales EPA y DHA, así como el ácido graso estearidónico (18:4n3) tuvieron una elevada representación con un 25, 10 y 10% del total de ácidos grasos, respectivamente.

Al igual que lo observado en otras especies, en *T. suecica* y *Chaetoceros* sp., la aplicación de mayores tasas de renovación produjo alteraciones en el contenido de ácidos grasos, provocando una disminución del contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, mientras que el contenido de PUFAs incrementó tal y como descrito en otros trabajos utilizando los mismos sistemas de cultivo semicontinuo para otras especies (Otero *et al.*, 1995, 1997; Otero y Fábregas, 1997; Ferreira *et al.*, 2008, 2009; 2011) y registrado por otros autores al incrementar la disponibilidad de nutrientes en cultivos quimiostatos (Sukenik and Wahnnon, 1991; Sukenik *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1994b) aunque de forma más acusada en el caso de *T. suecica*. En condiciones de nitrógeno limitante, los lípidos neutros contienen en general ácidos grasos saturados y monoinsaturados que son almacenados como reserva de energía y que con el incremento de las tasas de renovación son sustituidos por lípidos polares que contienen ácidos grasos poliinsaturados que son necesarios para sustentar el aparato fotosintético de células en crecimiento activo (Otero y Fábregas, 1997b). Este efecto se observa claramente en *T. suecica*, al igual que en Otero y Fábregas (1997), donde los ácidos grasos 18:1 y 16:0 son sustituidos por 16:4n3, 18:3n3 y 18:4n6 cuando se aplican tasas de renovación mayores (Tabla 7). Sin embargo el EPA en *T. suecica* mantuvo su contenido, mientras que en Otero y Fábregas (1997) disminuyó con el incremento de la tasa de renovación, lo que sugiere que la síntesis del EPA no es controlada por la célula, mediante los mismos mecanismos que el resto de los PUFAs, o por tener el EPA una función fisiológica diferente, no estando correlacionado directamente con otros ácidos grasos poliinsaturados n-3.

Contrariamente, el contenido de EPA en *Chaetoceros* sp. ha presentado un marcado incremento en su contenido con el incremento de la tasa de renovación (Tabla 7), tal y como se observa en otras especies (Otero y Fábregas, 1997b; Ferreira *et al.*, 2008; 2009; 2011). También Miller *et al.*, (2012) obtuvieron la mayor fracción de EPA en la fase de mayor crecimiento logarítmico de *Chaetoceros calcitrans*. El perfil de ácidos grasos encontrados en *Chaetoceros* sp. se asemeja al perfil descrito para la misma especie cultivada en régimen semicontinuo con renovaciones de 30% cada dos o tres días y luz continua (Nascimento, 2010), destacándose el mayor contenido de EPA en los cultivos con TR40%.

En los cultivos de *I. galbana* de Otero *et al.* (1997) y Otero y Fábregas (1997b) el contenido de ácidos grasos ha variado con las tasas de renovación, al igual que el observado

por Ferreira *et al.* (2008, 2011) para la especie del género *Isochrysis*. Al contrario de lo que sería de esperar, en este trabajo el contenido de ácidos grasos de *I. galbana* presentó solo ligeras alteraciones cuando se aplicaron las dos tasas de renovación (Tabla 7), confirmando la saturación de nitrógeno en ambos cultivos de *I. galbana*. No obstante, aunque la composición relativa es estable, el contenido total de estos ácidos grasos puede ser variable, por el porcentaje en peso de los lípidos y del peso celular. En Otero *et al.* (1997b) se observa una menor diferencia en el contenido de ácidos grasos entre las diferentes tasas de renovación con el incremento de la concentración de nitrógeno en el medio, aunque en este trabajo la concentración de nutrientes utilizada fue dos y cuatro veces superior. Otero *et al.* (1997a) sugieren que condiciones de saturación de nutrientes son óptimas para alcanzar la máxima productividad de EPA en *I. galbana* y *P. tricornutum*. Asimismo, el contenido de EPA alcanzado con ambas las tasas de renovación fue similar al máximo obtenido por Otero *et al.* (1997a, b), alrededor de un 25%.

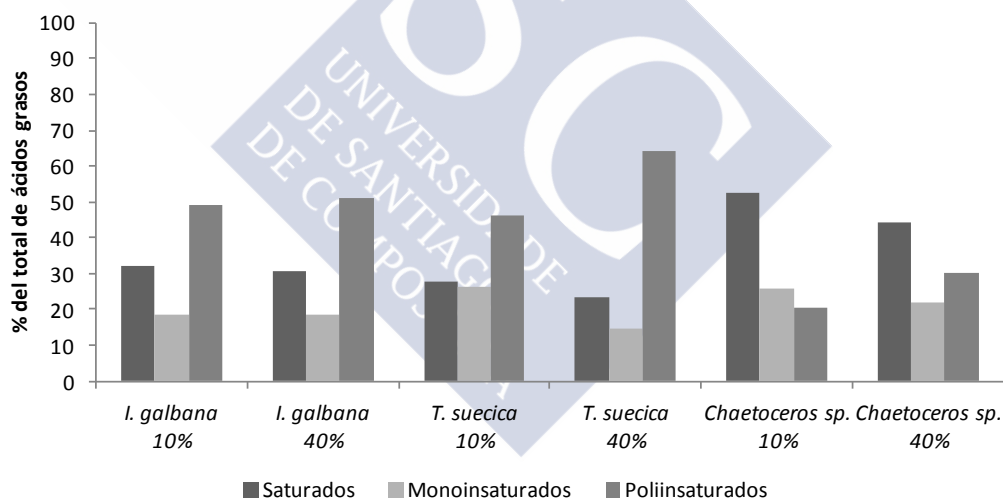


Figura 33 - Contenido total de los ácidos grasos Saturados, Monoinsaturados y Poliinsaturados en los cultivos microalgales (%total de ácidos grasos) cultivados en sistema semicontinuo con dos tasas de renovación (10 y 40%).

En los experimentos se ha decidido la utilización de una dieta mixta para la alimentación de larvas que consistió en una mezcla de *T. suecica*, *I. galbana* y *Chaetoceros sp.* siguiendo las indicaciones de la FAO (Helm *et al.*, 2004). La utilización de dietas mixtas,



particularmente la combinación de las especies *I. galbana* y *Chaetoceros calcitrans*, ha producido mejores resultados en el crecimiento larvario (Marshall *et al.*, 2010). La microalga *T. suecica* es una microalga de mayores dimensiones comúnmente utilizada en cultivos larvarios (Helm *et al.*, 2004), sin embargo hay datos contradictorios sobre su efecto en el crecimiento larvario de diferentes especies de bivalvos, mostrándose en general un buen alimento para *O. edulis* (Helm *et al.*, 1973; Holland & Spencer, 1973; Ferreiro *et al.*, 1990), pero resultó en crecimientos pobres de *R. philippinarum* (Laing *et al.*, 1990). En vista de las diferencias en el perfil bioquímico obtenido dependiendo de las condiciones de cultivo (Figura 34), es muy posible que las diferencias en el valor nutricional reportadas por distintos autores deriven de las diferencias en las metodologías de cultivo. Utilizando como base una dieta mixta con las tres especies *I. galbana*, *T. suecica*, *Chaetoceros* sp. (1:1:1) es posible el aporte de mayor variedad de nutrientes a las larvas. Con la aplicación de diferentes tasas de renovación a las microalgas fue posible la obtención de dos dietas distintas FAO 10% y FAO 40% con diferentes composiciones bioquímicas (Figura 34).

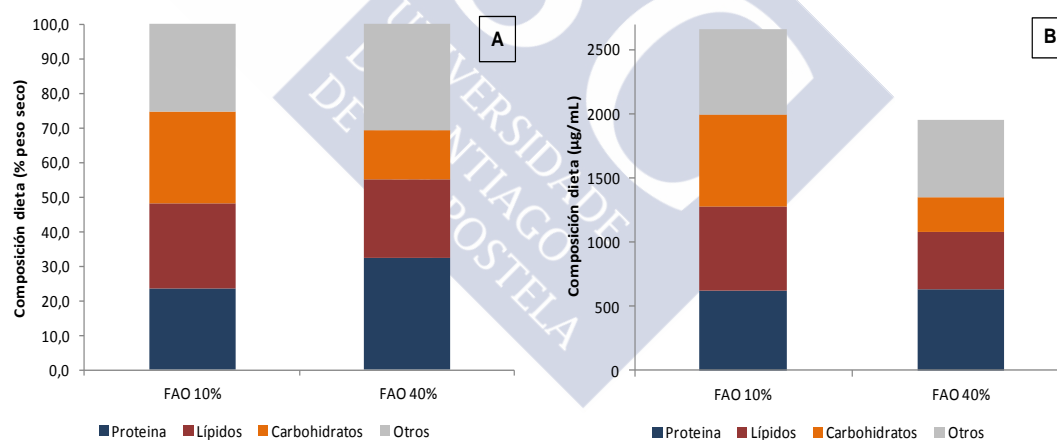


Figura 34 - Composición bioquímica total de las dietas suministrada a las larvas, con origen en los cultivos microalgales con diferentes tasas de renovación de 10 y 40%. A - composición bioquímica total en % peso seco total; B - Composición bioquímica total ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Las dietas difieren en su contenido proteico que incrementó de un 23,4% en FAO 10%, hasta un 32% de peso seco en la dieta FAO 40%, y disminuyó su contenido en carbohidratos de un 27% de la dieta FAO 10% hasta un 14% con la dieta FAO 40%. El contenido lipídico



fue similar en ambas dietas alrededor de un 25% del peso total de la dieta. Aunque estas diferencias son importantes, serían de esperar diferencias mayores en el caso de que todos los cultivos de la TR 10% estuviesen limitados por nitrógeno. La cantidad óptima de cada componente bioquímico que debe ser aportada a las larvas no está descrita, sin embargo están referidos los valores de cada uno que han resultado en un mejor crecimiento larvario en algunos casos. Se ha propuesto que para el crecimiento larvario, la composición en peso total de la dieta deberá ser 30-60% de proteína, 22-34% de lípidos y 5-30% de carbohidratos (Brown *et al.*, 1989; 1997; Fernández-Reiriz *et al.*, 2006). Ambas dietas, FAO10% y FAO40% cumplen estos requerimientos nutricionales de las larvas de bivalvos.

Debido a que los cálculos de las dietas se realizaron sobre número de células y no sobre peso, con la aplicación de mayores tasas de renovación a los cultivos microalgales se observó una disminución del peso celular, así como de la fracción orgánica. Como resultado, en la Figura 34B se observa una disminución de la cantidad de alimento total aportado a las larvas con la TR 40%, sin embargo el contenido proteico es similar en ambas dietas, siendo aproximadamente 630 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Contrariamente se observa una marcada disminución del contenido de carbohidratos aportados de 713 hasta 273  $\mu\text{g/mL}$  en las dietas FAO 10% y FAO 40%, respectivamente.

La cantidad de lípidos disminuyó de 655  $\mu\text{g/mL}$  en la dieta FAO 10% hasta 446  $\mu\text{g/mL}$  en la dieta FAO 40%, no obstante la cantidad de EPA en la dieta sufrió un ligero incremento, de un 14 hasta 16% del total de ácidos grasos. El contenido del ácido graso ARA también se mantuvo alrededor de un 3,8% del total de ácidos grasos en ambas dietas, mientras que el DHA disminuyó de un 3,7% hasta el 3,0% de FAO10% a FAO40%. La modificación del contenido de ácidos grasos en las microalgas resultó en una mejora de la calidad de los lípidos de la dieta con el incremento de la tasa de renovación, incrementando el contenido de PUFAs de un 33% en la dieta FAO 10% hasta un 45% en la dieta FAO 40%. Sin embargo, los principales ácidos grasos responsables de este incremento son el 16:4n3, que se incrementó de un 0,7% hasta un 4,5%, el 18:4n3 que incrementó de un 4 a un 7%, y el 18:3n3 que se incrementó de 1,9 hasta 6,3%, en particular debido a su incremento en *T. suecica*. Contrariamente, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados se redujeron de un 39 y un 34% en la dieta FAO 10%, respectivamente, hasta un 22 y 19% en la dieta FAO 40%, respectivamente. El requerimiento de determinados ácidos grasos es dependiente de la especie

de bivalvo, así como las cantidades en las cuales deben estar presentes en las dietas también son variables (Albentosa *et al.*, 1996). Los ácidos grasos EPA y DHA son considerados limitantes para crecimiento y desarrollo larvario (Delaunay *et al.*, 1993; Nevejan *et al.* 2003). Thompson y Harrison (1992) y Rico-Villa *et al.* (2006) reportaron que valores de EPA en la dieta entre un 6 y 18% del total de ácidos grasos llevan a un crecimiento óptimo de *C. gigas*. Además, Thompson y Harrison (1992) describen que un aumento del contenido de DHA de 1,1 hasta 3,1% del total de ácidos grasos en *T. pseudonana* incrementa el crecimiento larval de *C. gigas*. En las dietas utilizadas, ambos ácidos grasos están presentes en las dietas dentro de los valores mínimos referidos por otros autores.

Además de estos dos ácidos grasos esenciales, los mayores componentes de las membranas (Dunstan *et al.*, 1994; Hendriks *et al.*, 2003) y modeladores de la función de las mismas (Palacios *et al.*, 2005), los ácidos grasos omega-6 22:5n6 (DPA) y el araquidónico (ARA), fueron identificados como potencialmente importantes para el crecimiento y supervivencia larvaria y post-larvaria de bivalvos (Pernet *et al.*, 2005; Milke *et al.*, 2008). El ARA, al igual que el EPA, son precursores de eicosanoides, más específicamente de las prostaglandinas, leucotrienos y derivados hidroxilados, que son potentes señalizadores celulares que desempeñan diversas funciones fisiológicas. Genard *et al.* (2013) observó que el ARA asume una función central en la respuesta inmune en la fase larvaria de *C. gigas*. A pesar de que los mecanismos implicados en todo este proceso todavía están muy poco conocidos (Pernet y Tremblay, 2004), se debe tener en cuenta la proporción relativa de ARA y EPA en la hora de formular una dieta. El ácido graso ARA está presente en pequeñas cantidades en *T. suecica* y también en *Chaetoceros* sp., representando alrededor de un 3% del total de ácidos grasos en ambas dietas.

Además de generar una calidad nutritiva mayor, la aplicación de mayores tasas de renovación a los cultivos microalgales, provoca que la carga bacteriana asociada a los cultivos sea mucho menor en esas condiciones. Al aplicarse una tasa de renovación de 40% en los cultivos semicontinuos se pudo observar una reducción en las unidades formadoras de colonias UFC's en un orden de magnitud en comparación con los cultivos con tasa de renovación de 10% (Figura 35).

Uno de los principales problemas en la acuicultura de moluscos son los episodios repetitivos de mortalidad, que reducen seriamente la producción. Estas enfermedades afectan

a etapas larvarias y post-larvarias en los criaderos, así como juveniles y adultos cultivados en el medio ambiente natural. En el caso de los criaderos, las mortandades masivas implican la pérdida completa del stock de producción, con graves consecuencias económicas. En la mayoría de los casos, los estudios han demostrado que los problemas son causados por patologías bacterianas, siendo los principales agentes etiológicos miembros del género *Vibrio* (Paillard *et al.*, 2004; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010).

Las condiciones óptimas para el cultivo de bivalvos también favorecen el crecimiento de bacterias y la acumulación de sus metabolitos (Murchelano *et al.*, 1975; Prieur y Carval, 1979; Brown y Tettelbach, 1988). El proceso de la enfermedad es favorecido en muchas ocasiones por el aumento de la susceptibilidad de las larvas debido a factores de estrés externos, incluyendo la mala calidad de los alimentos o del agua, contaminación orgánica, etc. Además, estos factores también facilitan el crecimiento de posibles bacterias patógenas (Di Salvo *et al.*, 1978; Tubiash y Otto, 1986). Por lo tanto, muchas veces las mortalidades se pueden asociar con el sobrecrecimiento de patógenos oportunistas.

Aunque no se han detectado vibrios en los cultivos microalgales utilizados en estos experimentos, pueden ellos mismo ser una potencial fuente de otras bacterias patógenas de bivalvos debido a la carga bacteriana asociada a los cultivos, o aportar a los cultivos larvarios nutrientes que estimulen el crecimiento de los mismos en los tanques. Con la aplicación de tasas de renovación mayores en los cultivos microalgales se pudo observar una marcada reducción de la carga bacteriana, que es de esperar redunde en una mejor evolución de los cultivos larvarios.

Los cultivos semicontinuos son una excelente alternativa a los convencionales cultivos *batch* utilizados a menudo en los criaderos de bivalvos. Además de proporcionar cultivos más estables y consecuentemente un alimento de mejor calidad para las larvas de bivalvos, permiten también una reducción importante de la carga bacteriana en los cultivos microalgales que es aportada posteriormente a los cultivos larvales, permitiendo reducir la utilización de antibióticos en el cultivo de moluscos.

Dubert *et al.* (2015) llevaron a cabo un seguimiento de las bacterias asociadas a los cultivos microalgales en un criadero de moluscos bivalvos durante un año. En ese trabajo han registrado en los cultivos microalgales un valor medio de  $8,8 \times 10^6$  UCF.mL<sup>-1</sup> en sistema

discontinuo y de  $1,6 \times 10^6$  UCF.mL<sup>-1</sup> en un sistema continuo con una tasa de dilución de 12,5% por día, demostrando la importancia del sistema de cultivo utilizado como herramienta para reducir la carga bacteriana aportada a los cultivos de moluscos bivalvos.

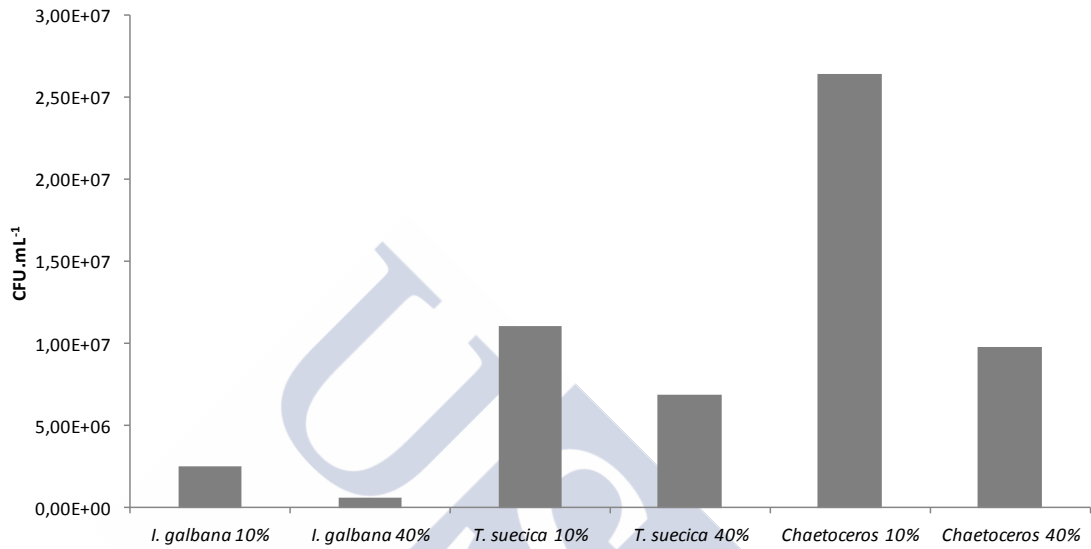


Figura 35 – UFC.mL<sup>-1</sup> de los cultivos microalgales. Datos tomados en 2013.

Tabla 7- Composición de ácidos grasos de las especies microalgales utilizadas para el cultivo larval, sometidas a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%).

Acidos grasos	<i>Isochrysis galbana</i>		<i>Tetraselmis suecica</i>		<i>Chaetoceros sp.</i>	
	10%	40%	10%	40%	10%	40%
<b>14:0</b>	8,99 ± 0,19	9,58 ± 0,96	n.d.	n.d.	42,31 ± 2,03	36,34 ± 1,46
<b>16:0</b>	20,39 ± 0,71	20,55 ± 0,78	26,89 ± 2,8	22,28 ± 1,08	9,15 ± 0,87	7,09 ± 0,14
<b>16:1</b>	15,17 ± 0,43	15,53 ± 0,73	3,54 ± 0,9	3,73 ± 0,84	23,9 ± 0,54	20,11 ± 0,39
<b>16:?</b>	n.d.			n.d.	2,11 ± 0,05	4,07 ± 0,06
<b>16:4n3</b>	n.d.		12,46 ± 1,18	17,15 ± 1,06	n.d.	n.d.
<b>18:0</b>	2,83 ± 2,58	0,38 ± 0,66	0,65 ± 0,56	0,97 ± 0,84	1,02 ± 0,06	0,75 ± 0,65
<b>18:1n9</b>	3,52 ± 0,14	2,94 ± 0,55	19,68 ± 2,24	9,95 ± 0,3	1,94 ± 0,13	1,9 ± 0,62
<b>18:2n6</b>	1,08 ± 0,05	2,19 ± 0,04	3,47 ± 3,01	5,35 ± 0,09	1,42 ± 0,08	0,73 ± 0,63
<b>18:3n6</b>	0,84 ± 0,03	0,55 ± 0,95		n.d.	3,25 ± 0,13	3,4 ± 0,03
<b>18:3n3</b>	2,26 ± 0,1	2,91 ± 0,07	18,38 ± 1,3	21,43 ± 0,6	n.d.	n.d.
<b>18:4n3</b>	8,69 ± 0,36	9,25 ± 0,31	4,08 ± 0,66	12,99 ± 0,3	1,15 ± 0,06	2,14 ± 0,03
<b>20:1n9</b>	n.d.	n.d.	3,29 ± 0,77	1,19 ± 1,03	n.d.	n.d.
<b>20:4n6</b>	n.d.	n.d.	0,91 ± 0,83	0,73 ± 0,63	6,64 ± 0,79	7,51 ± 0,03
<b>20:5n3</b>	24,91 ± 1,35	26,47 ± 0,55	7,02 ± 1,5	6,39 ± 0,13	7,72 ± 0,78	15,42 ± 0,1
<b>22:5n6</b>	1,74 ± 0,06	0,45 ± 0,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>22:6n3</b>	9,58 ± 0,8	9,19 ± 0,22	n.d.	n.d.	0,31 ± 0,54	1,07 ± 0,93
<b>SAT</b>	32,2 ± 3,25	30,51 ± 1,11	27,54 ± 2,42	23,25 ± 0,3	52,48 ± 1,92	44,18 ± 0,95
<b>MONO</b>	18,7 ± 0,62	18,48 ± 0,18	26,51 ± 2,22	14,88 ± 1,6	25,84 ± 0,47	22,01 ± 0,57
<b>PUFA</b>	49,1 ± 2,64	51,01 ± 1,09	46,32 ± 2,66	64,03 ± 1,38	20,49 ± 2,31	30,27 ± 1,53

n.d. – no detectado

1.2.2. Crecimiento larvario de moluscos bivalvos con cultivos semicontinuos de microalgas mantenidos con distintas tasas de renovación

1.2.2.1. *Ostrea edulis*

El ensayo de crecimiento de las larvas de *Ostrea edulis* se inició 6 días después de la inducción del desove realizado en el ECIMAT (Vigo, España). Las larvas D, con un tamaño medio inicial de  $190,7 \pm 9,4 \mu\text{m}$ , se distribuyeron por los diferentes tanques con una densidad inicial de 6 larvas.mL<sup>-1</sup>. El experimento se llevó a cabo en los meses de Febrero y Marzo de 2012.

Al largo de los días de ensayo se pudo observar una gran variabilidad en los valores de supervivencia de las larvas en los tanques sin cloranfenicol, dificultando la evaluación del efecto de la dieta en la supervivencia de *O. edulis*. Sin embargo, en los dos muestreos realizados se observó una supervivencia mayor en los cultivos alimentados con FAO 40% que con la dieta FAO 10% aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas debido a las elevadas desviaciones. La mejora de la calidad del alimento obtenida aplicando mayores tasas de renovación a las microalgas (FAO 40%) resulta en una dieta con mejor perfil bioquímico y con menor carga bacteriana que un cultivo microalgal con bajas tasas de renovación (FAO 10%), cuya composición bioquímica es próxima a los cultivos *batch* o discontinuos comúnmente utilizados en acuicultura, tal como ya demostrado anteriormente, permitiendo aumentar la supervivencia larvaria. No obstante, otros parámetros bioquímicos, además de los medidos, pueden haber mejorado con la TR40%, como esteroides, aminoácidos libres, etc., además de la menor carga bacteriana.

Aunque la menor tasa de renovación aplicada a las microalgas (10%) se asemeje a un cultivo *batch* fue posible mantener el cultivo larvario en nuestro laboratorio hasta la fase de metamorfosis, mientras que en el ECIMAT sus cultivos de *O. edulis* provenientes de la misma puesta murieron antes de la metamorfosis (resultados no presentados). Más allá de problemas derivados del escalado y manipulación de las larvas a la escala semi-industrial utilizada en ECIMAT, los resultados demuestran que incluso los cultivos mantenidos con TR10%, gracias a presentar perfiles bioquímicos próximos a la saturación de nitrógeno, producen resultados favorables en comparación con los cultivos *batch* estándar.

La adición del antibiótico cloranfenicol a los tanques de cultivo permitió reducir la variabilidad en los valores de supervivencia de *O. edulis*. Además, mientras que la adición de cloranfenicol mejora marcadamente la supervivencia con la dieta FAO10%, el efecto sobre la dieta FAO 40% es nulo, lo que parecería indicar la importancia de la flora bacteriana acompañante en los cultivos, que se ve modificada por la tasa de renovación aplicada (Figura 36).

Ante los resultados, en el caso de *O. edulis*, la supervivencia se ve claramente afectada no solo por la calidad nutritiva de la dieta *per se*, sino también por la carga bacteriana asociada que aportan los cultivos. Los cultivos microalgales con tasa de renovación de 10% aportan más carga bacteriana así como restos celulares y materia orgánica que podrían haber afectado la calidad del agua y consecuentemente la supervivencia larvaria que mejoró con la adición del cloranfenicol.

El crecimiento larvario de *O. edulis*, aunque similar en todos los cultivos, fue superior en los cultivos alimentados con las dieta sometidas a mayor tasa de renovación (FAO 40% y Chl 40%), alcanzando mayor tamaño al final del ensayo (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 37). La adición del cloranfenicol a los tanques no tuvo efecto positivo en el crecimiento de las larvas, demostrando la importancia del perfil bioquímico de la dieta en el crecimiento larvario de *O. edulis*, más que la calidad del agua y la carga bacteriana aportada.

Por lo tanto, la carga bacteriana aportada con la dieta resultó ser un factor limitante para la supervivencia de *O. edulis*, mientras que el perfil bioquímico de la dieta es el que controla el crecimiento larvario. Aunque los resultados indican que el efecto de la composición nutricional del cultivo es de menor relevancia que el efecto de la carga bacteriana en el caso de las larvas de *O. edulis*, es necesario destacar que la variabilidad bioquímica generada en la dieta microalgal al aplicar las dos tasas de renovación es mucho menor que la obtenida en otros experimentos en los que los cultivos se encontraban limitados por nitrógeno en los cultivos de baja tasa de renovación (Fábregas *et al.*, 1996c; 1998; 2001; Otero *et al.*, 1997b, 1998; Ferreira *et al.*, 2008; 2009; 2011). El perfil de *I. galbana* y *Chaetoceros* sp. indica que estos dos cultivos se encontraban en condiciones de saturación por nutrientes, con elevados porcentajes de proteína y ácidos grasos poliinsaturados, lo que ha seguramente facilitado que ambas dietas cubran los requerimientos nutricionales mínimos de las larvas de *O. edulis*. En el caso de *Artemia* sp. cuando se alimenta con microalgas cultivadas con distintas TR en

condiciones de saturación, el efecto de este parámetro sobre la supervivencia y crecimiento es mucho menor, aunque se aprecia una ligera mejora con la TR tal y como encontramos para *O. edulis* en el presente trabajo (Fábregas *et al.*, 1996c; 1998; 2001).

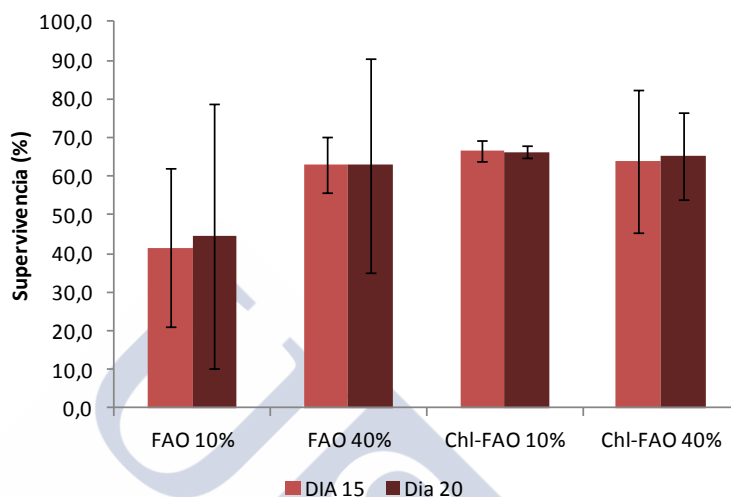


Figura 36 - Supervivencia de larvas de *Ostrea edulis* a los días 15 y 20 de cultivo sometidos a dietas provenientes de cultivos microalgales con tasas de renovación diaria diferentes (10 y 40%).

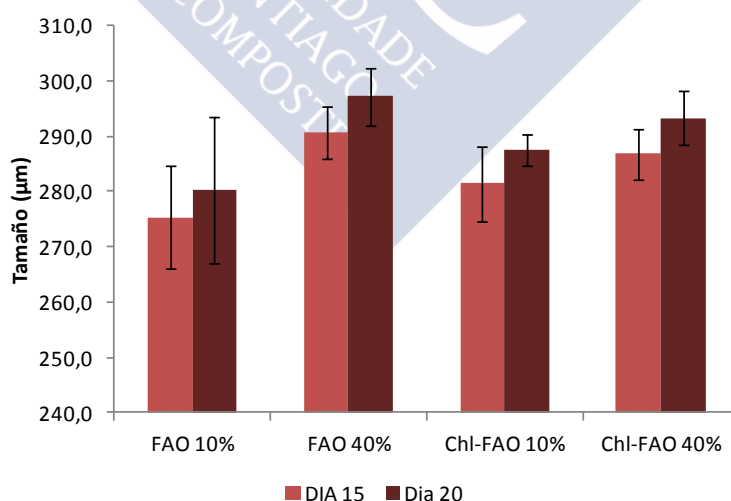


Figura 37 – Tamaño de las larvas de *Ostra edulis* a los días 15 y 20 de ensayo, larvas alimentadas con dietas provenientes de cultivos sometidos a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%).



Se han realizado estudios que demuestran la importancia de la nutrición en el crecimiento y supervivencias larvarias de moluscos bivalvos (Loosanoff y Davis, 1963; Webb y Chu, 1981; Delaunay *et al.*, 1993; Martínez-Fernández *et al.*, 2006), que se centran en la evaluación de dietas mixtas que incluyen más que una especie de microalga en comparación con las dietas mono-algales (Robert y Gérard, 1999; Rico-Villa *et al.*, 2006; Marshall *et al.*, 2010). Una buena dieta deberá incluir por lo menos dos o tres especies de elevado valor nutricional, combinando siempre diatomeas y flageladas (Robert y Gérard, 1999). En *O. edulis*, las dietas mixtas resultaron en general en un mejor crecimiento larvario (Helm *et al.*, 2004). Los tiempos de cultivo larvario son variables para diferentes autores, presentando naturalmente diferencias en los valores de supervivencia y crecimiento. En general, las supervivencias obtenidas superaron los 75% (Helm, 1969; 1977; Ferreiro *et al.*, 1990; Coatanea *et al.*, 1994; Berntsson *et al.*, 1997), sin embargo también están descritas supervivencias inferiores al 30% (Walne, 1966; Ferreiro *et al.*, 1990; Glize, 1994;) y alrededor de un 60% (Holland y Spencer, 1973; Wilson, 1978) como en nuestro ensayo, aunque es necesario tener en cuenta la calidad de la puesta utilizada, que podría ser deficiente en vista de los pésimos resultados obtenidos en los cultivos de la misma puesta llevados a cabo en el ECIMAT.

Se realizó un ensayo similar con larvas de ostra rizada (*Crassostrea gigas*) cuyos resultados fueron opuestos a los obtenidos en el caso de *O. edulis*, obteniéndose una mayor supervivencia y crecimiento en las larvas alimentadas con tasas de renovación del 10% (no se muestran los datos). Los resultados contradictorios obtenidos en los cultivos larvarios, junto con los obtenidos para larvas de la almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* en el mismo periodo y con resultados similares, se consideran no fiables, ya que se realizaron en los meses de Mayo y Junio de 2013, coincidiendo con la limitación nutricional de la *I. galbana* e indican que el crecimiento deficiente de la microalga, más acusado en la TR 40%, y la consecuente acumulación de restos celulares y materia orgánica, resultó en una dieta con bajo perfil bioquímico y elevada carga bacteriana.

1.2.2.2. *Venerupis pullastra*

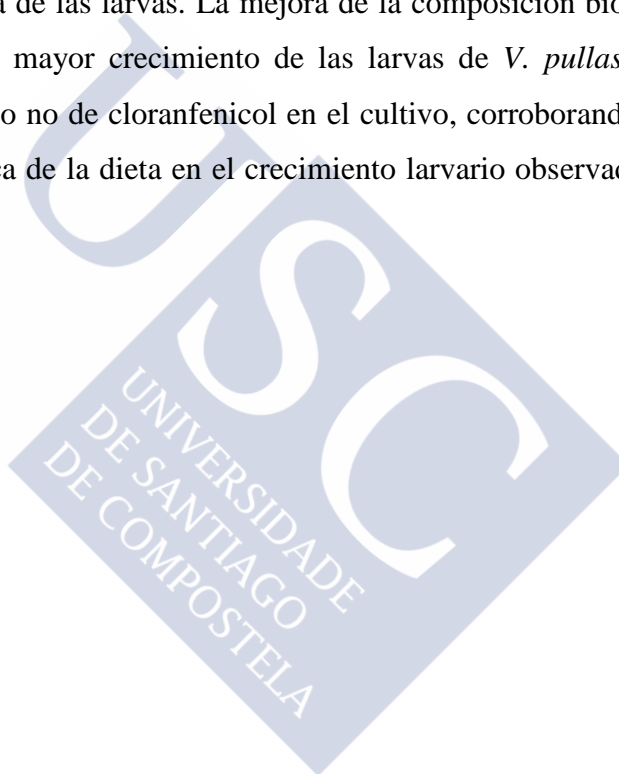
Se realizaron tres ensayos en diferentes temporadas (Febrero a Abril de 2012 y Enero de 2014) con almeja babosa proveniente de diferentes criaderos en Galicia, iniciando los cultivos larvarios con una densidad inicial entre 15 y 30 larvas.mL<sup>-1</sup>.

La alimentación de las larvas de *V. pullastra* con microalgas de mejor calidad, (FAO 40%) resultó en un incremento significativo (ANOVA,  $p < 0,05$ ) en la supervivencia larvaria frente a los cultivos alimentados con FAO 10%, con o sin cloranfenicol, en todos los ensayos realizados (Figura 38). Esta diferencia fue en algunos casos mucho mayor que la observada en *O. edulis*, ya que en uno de los experimentos (Figura 12C), la supervivencia con FAO10% fue de tan solo el 3,7%, incrementándose hasta el 76,8% con FAO40%.

En el primer y segundo experimento (Figura 12A y B), y a diferencia de lo observado para *O. edulis*, la adición de cloranfenicol tuvo un efecto positivo significativo en los cultivos mantenidos tanto con FAO10% como con FAO40% (ANOVA,  $p < 0,05$ ). En el ensayo C, en las que probablemente las larvas presentaban una menor calidad o condición microbiológica, la elevada carga bacteriana aportada con la dieta a los tanques FAO 10% sin cloranfenicol, además del peor perfil bioquímico, resultaron en una muy baja supervivencia al 16° día de cultivo, que fue significativamente mejorada con la adición del cloranfenicol a los cultivos. En este ensayo, al igual que en el ensayo con *O. edulis*, la adición de cloranfenicol a los cultivos con dieta FAO 40% no mejoró la supervivencia, que fue incluso menor que la de la misma dieta sin antibiótico. Es posible que la adición de cloranfenicol en cultivos con un equilibrio bacteriológico precario resulte incluso contraproducente. Es importante reseñar, que en este experimento, la mejora de la supervivencia obtenida mediante la utilización de una dieta de perfil mejorado es netamente mayor que la obtenida mediante la adición de antibiótico (Figura 12C), indicando la importancia de la aplicación de las técnicas de cultivo microalgal adecuadas para la mejora del rendimiento de los cultivos larvarios.

La mejora de la calidad del alimento con la aplicación de tasas de renovación mayores (FAO 40%) resultó en mayor tamaño larvario (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 39), al igual que en el caso de *O. edulis*. En el ensayo C, la elevada mortalidad observada en los tanques FAO 10% sin cloranfenicol no permitió la medición de larvas suficientes para tratamiento estadístico, no siendo presentado valores de tamaño larvario.

En *V. pullastra* la calidad de la dieta mostró tener una mayor influencia en la supervivencia larvaria que la población bacteriana acompañante, como demuestran los mejores resultados obtenidos en la dieta FAO40%-cloranfenicol que en FAO10%-cloranfenicol (ANOVA,  $p < 0,05$ ). La carga bacteriana aportada con la dieta microalgal a los cultivos larvarios afecta negativamente la supervivencia, como demuestra la mejora obtenida por la adición de cloranfenicol en ambas dietas, a excepción del tercer experimento, en la que la adición de cloranfenicol no mejoró los resultados de la dieta FAO40% (Figura 38C). La aplicación de tasas de renovación elevadas a los cultivos microalgales permite no solo la mejora del perfil nutricional, si no también reducir la carga bacteriana y consecuentemente aumentar la supervivencia de las larvas. La mejora de la composición bioquímica de la dieta resultó igualmente en un mayor crecimiento de las larvas de *V. pullastra*, no siendo éste afectado por la presencia o no de cloranfenicol en el cultivo, corroborando la importancia de la composición bioquímica de la dieta en el crecimiento larvario observado anteriormente en *O. edulis*.



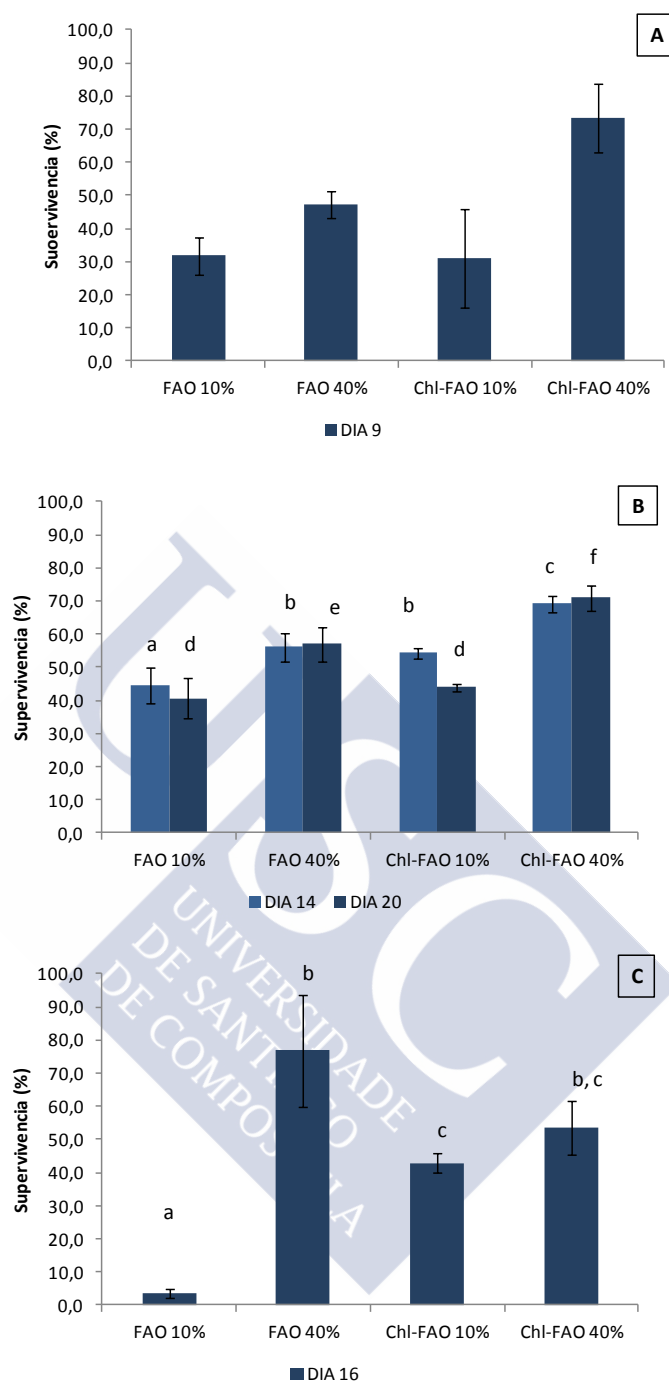


Figura 38 - Supervivencia de las larvas de *Venerupis pullastra* al largo de los días en los tres ensayos (A – Febrero 2012, 30 larvas.mL<sup>-1</sup>; B – Enero 2014, 15 larvas.mL<sup>-1</sup>; C – Marzo 2012, 30 larvas.mL<sup>-1</sup>), alimentados con diferentes dietas provenientes de cultivos sometidos a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%) y con y sin la adición de cloranfenicol (2,5 mg.L<sup>-1</sup>). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).

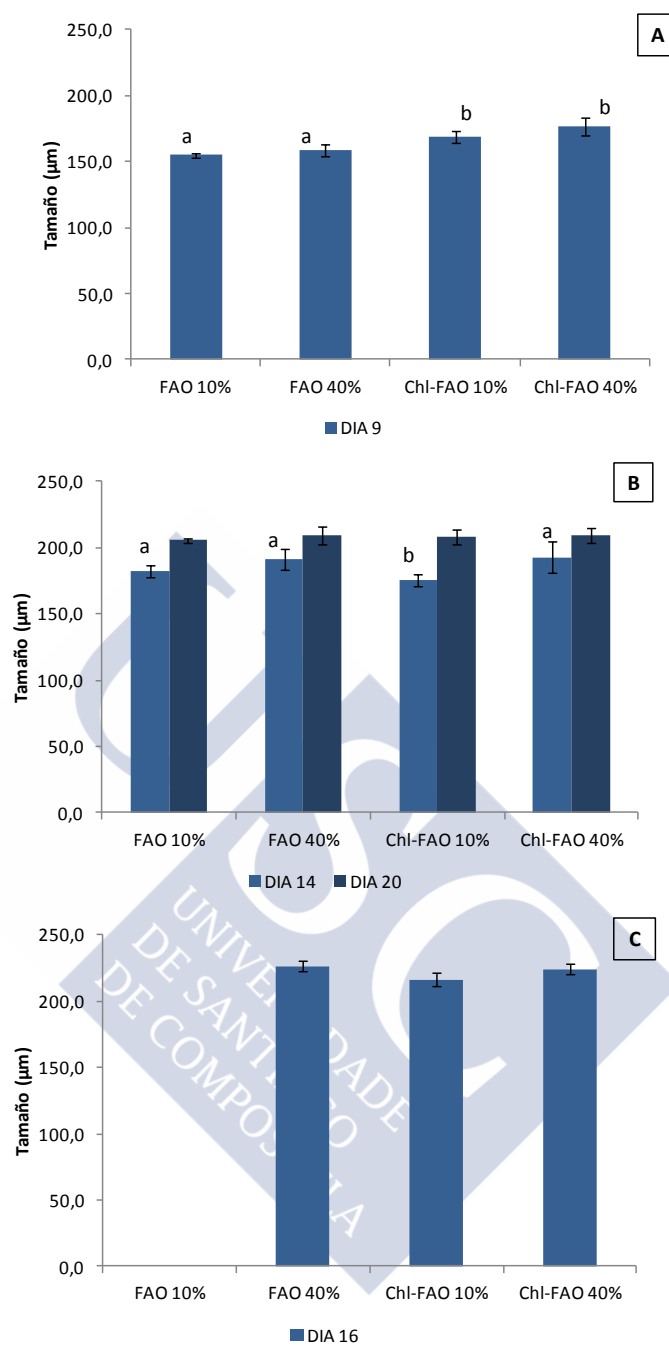


Figura 39 - Tamaño de las larvas de *Venerupis pullastra* en los tres ensayos (A – Febrero 2012, 30 larvas.mL<sup>-1</sup>; B – Enero 2014, 15 larvas.mL<sup>-1</sup>; C – Marzo 2012, 30 larvas.mL<sup>-1</sup>), alimentados con diferentes dietas provenientes de cultivos sometidos a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%) y con y sin la adición de cloranfenicol (2,5 mg.L<sup>-1</sup>). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones ( $P < 0,05$ ).

1.2.2.3. *Ruditapes decussatus*

Los cultivos para evaluar el efecto de las dietas en el cultivo larvario de almeja fina se iniciaron con una densidad de 18 larvas.mL<sup>-1</sup>. Los datos que se presentan corresponden a 2 experimentos diferentes realizados en Junio y Julio de 2013.

Tal y como se observó en los ensayos anteriores con las especies *O. edulis* y *V. pullastra*, la dieta proveniente de la tasa de renovación del 40% resultó en una mayor supervivencia de las larvas de *R. decussatus* tanto en los cultivos con cloranfenicol como sin cloranfenicol en ambos los días de muestreo y en ambos ensayos (ANOVA, p<0,05) (Figura 40).

La utilización del cloranfenicol, al igual que la dieta, también proporcionó un incremento significativo en la supervivencia larvaria de *R. decussatus* (ANOVA, p<0,05) para las dos dietas utilizadas, principalmente cuando se alimentaron con FAO 10%, corroborando lo observado en *O. edulis* y *V. pullastra*, donde la carga bacteriana en el cultivo afecta negativamente la supervivencia larvaria, que es reducida con la adición del cloranfenicol, llevando a un incremento de la supervivencia en ambos ensayos. Así, para *R. decussatus*, tanto la dieta como el cloranfenicol proporcionaron una mejora en la supervivencia larvaria.

El crecimiento de las larvas de *R. decussatus* fue marcado por la calidad de la dieta, siendo superior en las larvas alimentadas con FAO 40%, en ambos tratamientos, con y sin cloranfenicol (ANOVA, p<0,05) (Figura 41). No obstante, al contrario de lo que se observó en las demás especies, el cloranfenicol afectó el crecimiento de las larvas (ANOVA, p<0,05), de diferentes formas. Mientras que en el experimento A, el cloranfenicol produjo un efecto negativo en el crecimiento de las larvas (ANOVA, p<0,05), en el ensayo B, la adición del antibiótico provocó un incremento del tamaño final de las larvas (ANOVA, p<0,05). Se ha referido con anterioridad que el crecimiento rápido está asociado a valores de supervivencia mayores (Marshal *et al.*, 2010). En el ensayo B, debido al peor estado de las larvas, detectado por la menor supervivencia y crecimiento de las larvas en comparación con el ensayo A, el cloranfenicol tuvo mayor efecto que en el ensayo B, indicando la mayor susceptibilidad de las larvas de esta puesta a la carga bacteriana, resultando en un significativo incremento en la supervivencia y crecimiento de las larvas frente las cultivadas sin cloranfenicol.

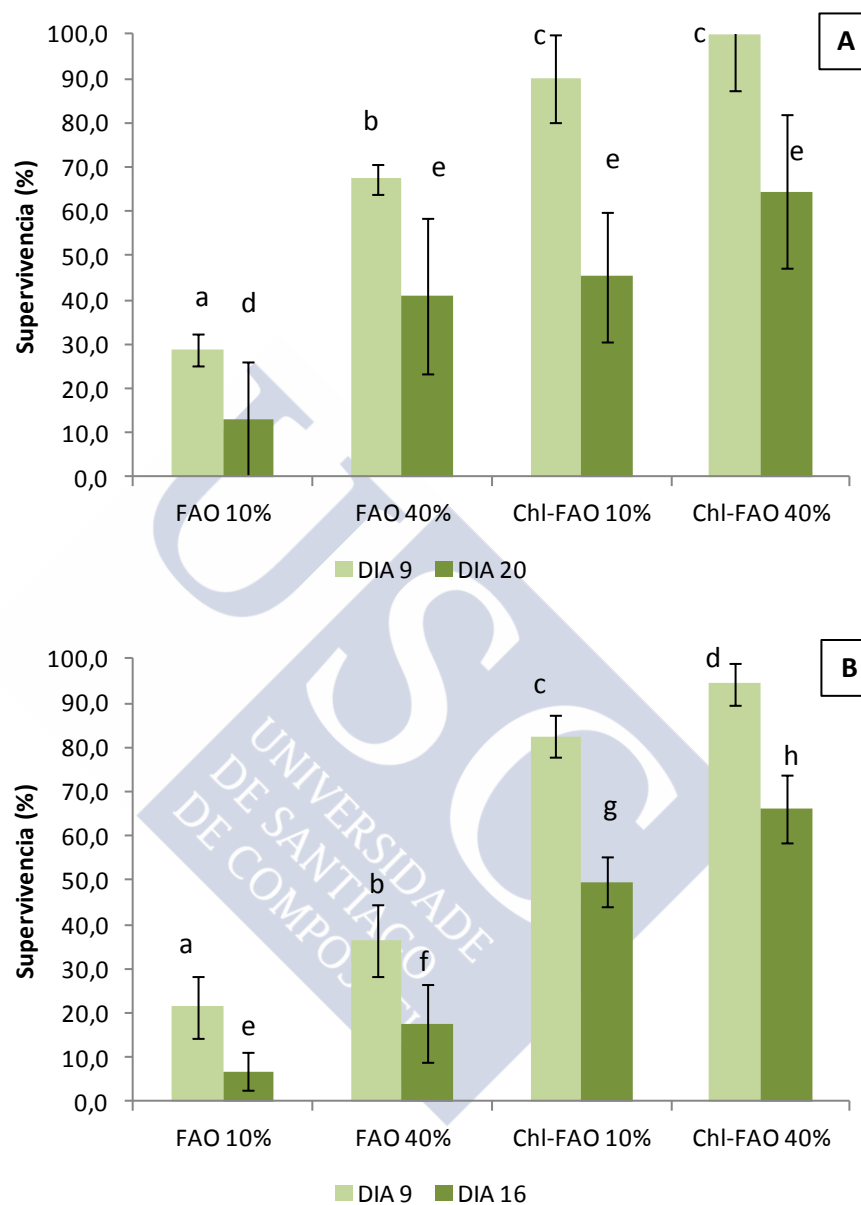


Figura 40 – Supervivencia de las larvas de *Ruditapes decussatus* en los dos ensayos (A – Junio 2012, 18 larvas.mL<sup>-1</sup>; B – Julio 2012, 18 larvas.mL<sup>-1</sup>), alimentados con diferentes dietas provenientes de cultivos sometidos a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%) y con y sin la adición de cloranfenicol (2,5 mg.L<sup>-1</sup>). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).

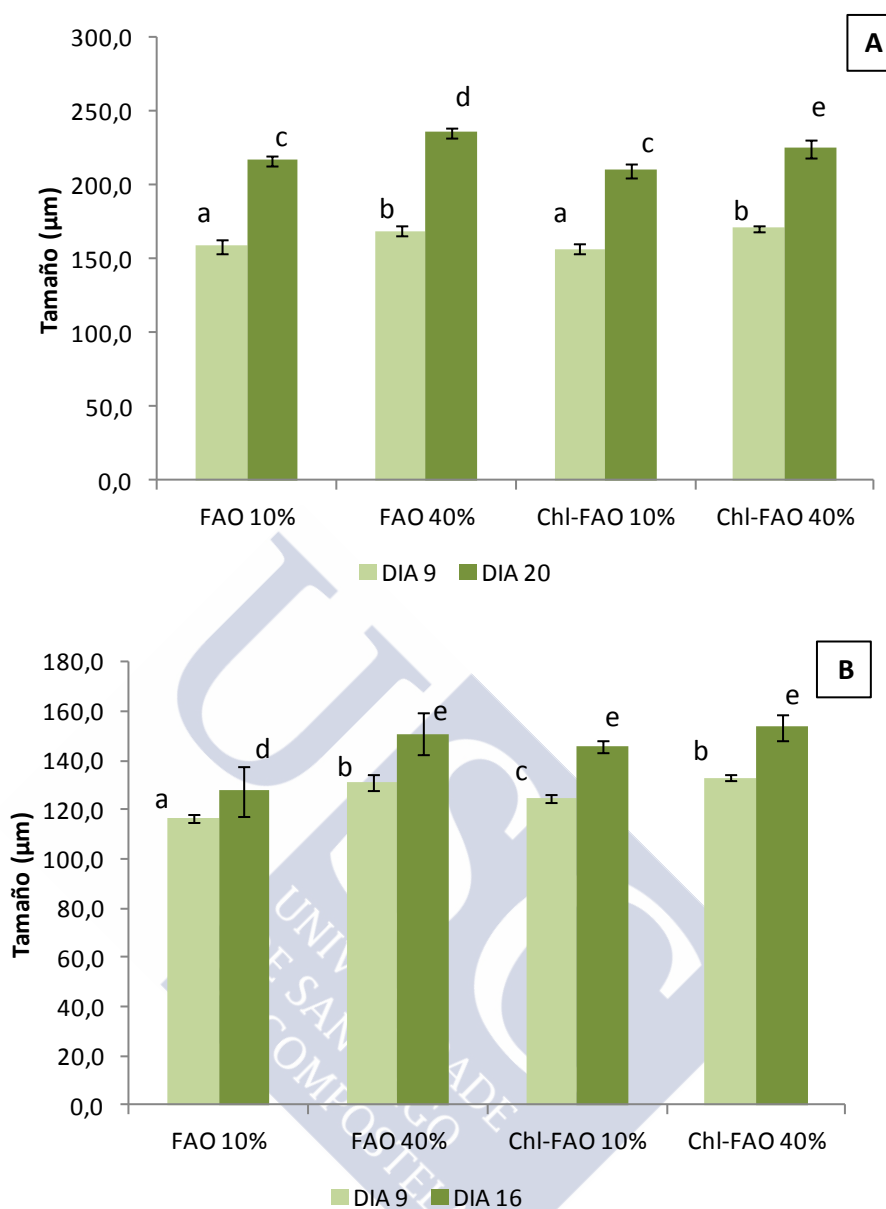


Figura 41 – Tamaño de las larvas de *Ruditapes decussatus* en los dos ensayos (A – Junio 2012, 18 larvas.mL<sup>-1</sup>; B – Julio 2012, 18 larvas.mL<sup>-1</sup>), alimentados con diferentes dietas provenientes de cultivos sometidos a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%) y con y sin la adición de cloranfenicol (2,5 mg.L<sup>-1</sup>). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).



#### 1.2.2.4. *Ruditapes philippinarum*

Para la evaluación del efecto de la dieta en la supervivencia en el cultivo de la almeja japonesa, se distribuyeron las larvas en los tanques con una densidad inicial de 18 y 20 larvas.mL<sup>-1</sup>, en los ensayos A y B, respectivamente. Se llevaron a cabo dos ensayos en los meses de Junio de 2012 y Marzo de 2013. Debido a la baja supervivencia obtenida en el segundo experimento, no se realizaron medidas del tamaño larvario.

La supervivencia larvaria de *R. philippinarum*, en general, fue superior cuando se alimentaron con microalgas provenientes del 40% de tasa de renovación (FAO 40%), (ANOVA,  $p < 0,05$ ), corroborando los resultados obtenidos con las otras especies de moluscos.

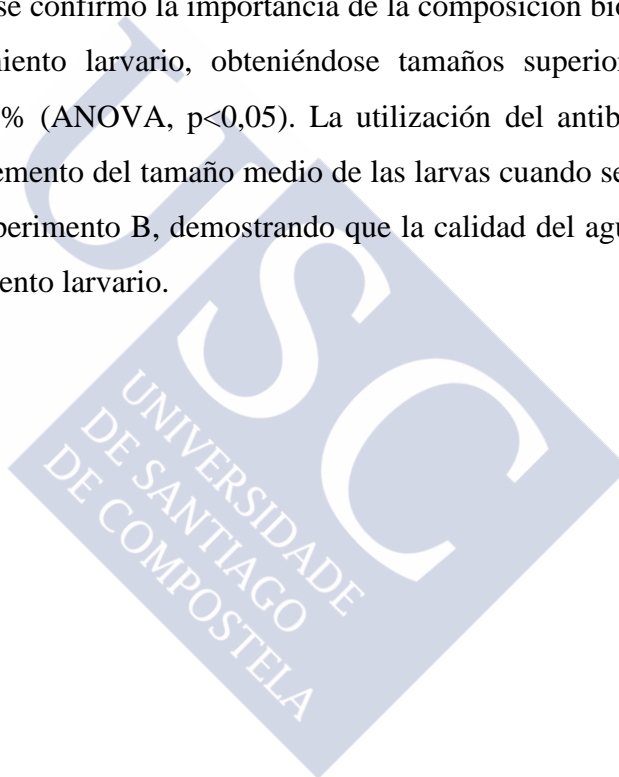
No obstante, en el ensayo B, la dieta solamente produjo efecto en la supervivencia larvaria en los tratamientos con cloranfenicol (ANOVA,  $p < 0,05$ ), no presentando diferencias en la supervivencia larvaria sin el antibiótico.

Cuando se alimentaron con FAO 40%, la utilización del cloranfenicol resultó en un incremento significativo de la supervivencia de las larvas, demostrando el efecto negativo de la carga bacteriana en la supervivencia de las larvas que no puede ser mejorado mediante la mejora del perfil bioquímico. Sin embargo, para las larvas alimentadas con FAO 10% la adición del cloranfenicol no produjo mejoras en la supervivencia de *R. philippinarum* en ninguno de los dos experimentos. Estos resultados indican que para la supervivencia larvaria de la almeja japonesa no basta la reducción de la carga bacteriana del cultivo, siendo también de vital importancia la composición bioquímica de la dieta en la supervivencia para esta especie, que tendrá de cumplir los requisitos para el desarrollo de las larvas.

En *R. philippinarum* se confirmó la importancia de la composición bioquímica de la dieta FAO 40% en el crecimiento larvario, obteniéndose tamaños superiores que cuando se alimentaron con FAO 10% (ANOVA,  $p < 0,05$ ). La utilización del antibiótico cloranfenicol solamente llevó a un incremento del tamaño medio de las larvas cuando se alimentaron con la dieta FAO 10%, en el experimento B, demostrando que la calidad del agua del tanque puede también afectar el crecimiento larvario. No obstante, en el ensayo B, la dieta solamente produjo efecto en la supervivencia larvaria en los tratamientos con cloranfenicol (ANOVA,  $p < 0,05$ ), no presentando diferencias en la supervivencia larvaria sin el antibiótico.

Cuando se alimentaron con FAO 40%, la utilización del cloranfenicol resultó en un incremento significativo de la supervivencia de las larvas, demostrando el efecto negativo de la carga bacteriana en la supervivencia de las larvas que no puede ser mejorado mediante la mejora del perfil bioquímico. Sin embargo, para las larvas alimentadas con FAO 10% la adición del cloranfenicol no produjo mejoras en la supervivencia de *R. philippinarum* en ninguno de los dos experimentos. Estos resultados indican que para la supervivencia larvaria de la almeja japonesa no basta la reducción de la carga bacteriana del cultivo, siendo también de vital importancia la composición bioquímica de la dieta en la supervivencia para esta especie, que tendrá de cumplir los requisitos para el desarrollo de las larvas.

En *R. philippinarum* se confirmó la importancia de la composición bioquímica de la dieta FAO 40% en el crecimiento larvario, obteniéndose tamaños superiores que cuando se alimentaron con FAO 10% (ANOVA,  $p < 0,05$ ). La utilización del antibiótico cloranfenicol solamente llevó a un incremento del tamaño medio de las larvas cuando se alimentaron con la dieta FAO 10%, en el experimento B, demostrando que la calidad del agua del tanque puede también afectar el crecimiento larvario.



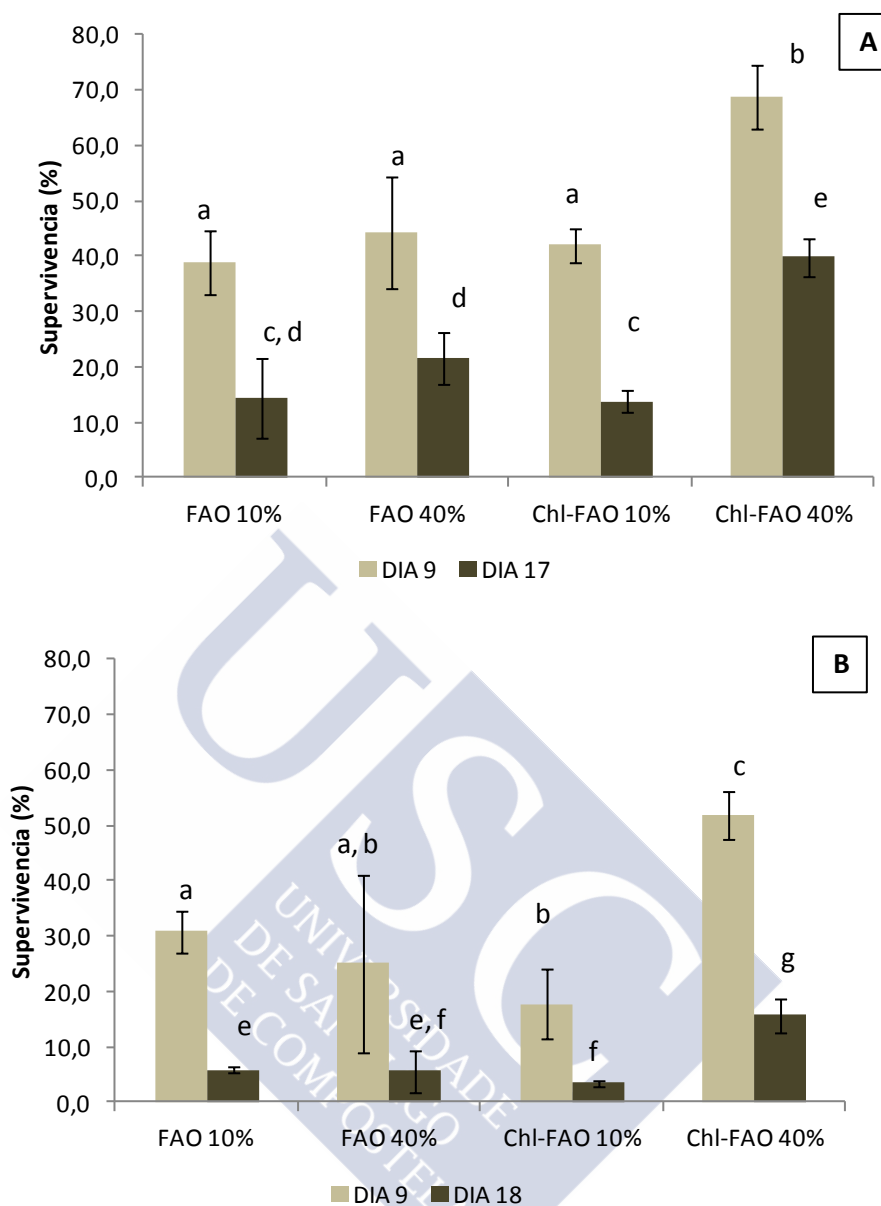


Figura 42- Supervivencia de las larvas de *Ruditapes philipinarum* en los dos ensayos (A – Abril 2013, 18 larvas.mL<sup>-1</sup>; B – Junio 2012, 20 larvas.mL<sup>-1</sup>), alimentados con diferentes dietas provenientes de cultivos sometidos a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%) y con y sin la adición de cloranfenicol (2,5 mg.L<sup>-1</sup>). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).

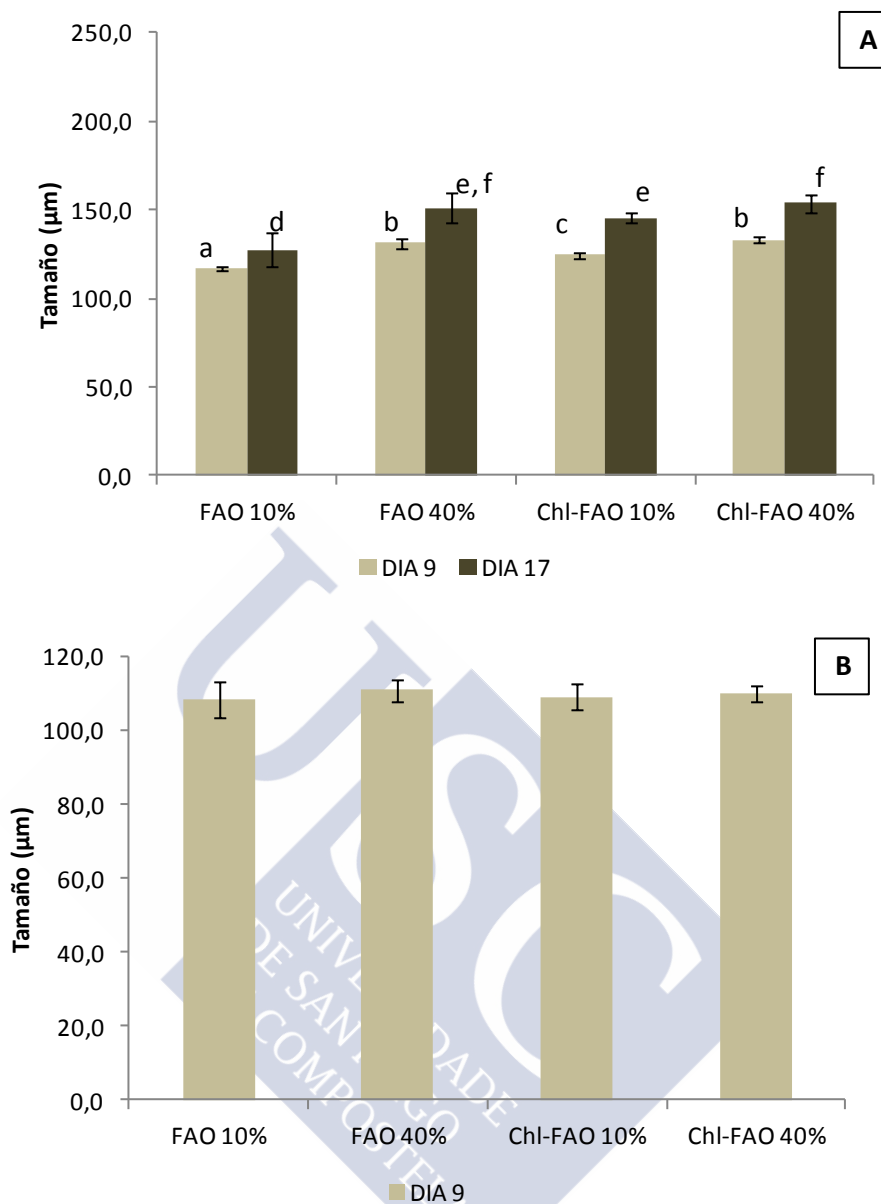


Figura 43 - Tamaño de las larvas de *Ruditapes philipinarum* en los dos ensayos (A – Abril 2013, 18 larvas.mL<sup>-1</sup>; B – Junio 2012, 20 larvas.mL<sup>-1</sup>), alimentados con diferentes dietas provenientes de cultivos sometidos a dos tasas de renovación diferentes (10 y 40%) y con y sin la adición de cloranfenicol (2,5 mg.L<sup>-1</sup>). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).

#### 1.2.2.5. Discusión general

La aplicación de diferentes tasas de renovación en los cultivos microalgales permitió modificar la composición bioquímica de las microalgas y consecuentemente de las dietas (Otero, 1995; Otero *et al.*, 2002). A pesar de utilizar las mismas microalgas en ambas dietas (FAO 10% y FAO 40%), se mejoró la calidad del alimento al incrementar la tasa de renovación, con alteraciones en el contenido proteico, lipídico y carbohidratos (Figura 32 e Figura 34). Además de mejorar la calidad del alimento, la aplicación de mayores tasas de renovación a los cultivos microalgales permitió también una reducción importante de la carga bacteriana en los cultivos, así como reducir el aporte de materia orgánica y otros componentes que promueven al crecimiento bacteriano, mejorando la calidad del agua en los tanques. Los ensayos realizados con las larvas de diferentes especies moluscos bivalvos demostraron la importancia que la técnica de cultivo de las microalgas tiene en la calidad del alimento, afectando a la supervivencia y crecimiento larvario. La mejora de la composición bioquímica del alimento generó, en general, un mayor crecimiento y mayor supervivencia larvaria en todas las especies probadas, asociada también a la menor carga bacteriana aportada con la dieta.

La utilización de dietas monoalgales en la alimentación de moluscos bivalvos puede producir buenos crecimientos y supervivencias larvarias (Delaunay *et al.*, 1993; Ferreiro *et al.*, 1990; Utting y Doyou, 1992; Yan *et al.*, 2006), sin embargo la deficiente técnica de cultivo puede llevar a conclusiones erróneas sobre el valor nutritivo de las especies microalgales (Fábregas *et al.*, 1998), llevando a incoherencias en los resultados presentados por diferentes autores, como la utilización de *Pavlova lutheri* en *C. gigas* (revisado Marshall *et al.*, 2010). A pesar de que esta especie es recomendada para la alimentación de *C. gigas* en sustitución de T-ISO, por proporcionar mayor variedad de PUFAs (Helm *et al.*, 2004), resultó en crecimientos pobres de larvas de *C. gigas* en los trabajos de Ponis *et al.* (2003; 2008) y Rico-Villa *et al.* (2006). Al utilizarse una dieta monoalgal se está limitando el aporte de componentes que pueden ser esenciales al desarrollo larvario. Las dietas mixtas en general proporcionan mejores resultados en el crecimiento y supervivencias larvales de moluscos bivalvos (Laing *et al.*, 1990; Laing y Utting, 1994; Delauney *et al.*, 1993; Robert *et al.*, 1996; Ponis *et al.*, 2006b), siendo la mezcla de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* la que

proporciona hasta el momento mejores resultados para el desarrollo larvario (revisado Marshall *et al.*, 2010), aportando más componentes a las larvas.

En la mayor parte de los casos estudiados, la dieta proveniente de los cultivos con TR40% resultó en mejores resultados en el crecimiento y supervivencia larvarias, como un efecto combinado de la composición bioquímica y bacterias y/o materia orgánica asociadas. El cloranfenicol puede actuar también sobre las bacterias que ya están en el cultivo de las larvas, y no dependen de las añadidas con las microalgas, no obstante las bacterias de los cultivos pueden crecer más o menos dependiendo de la cantidad de materia orgánica disuelta que vaya con las microalgas.

Sin embargo, a pesar de este claro efecto positivo de los cultivos de alta tasa de crecimiento, es necesario recordar que estos cultivos, aunque con el mínimo número de células disponibles, tienen una ración de peso seco claramente menor que los de TR 10% ( $2664 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), lo que pone aún más en evidencia la mayor calidad de la dieta de TR 40% ( $1951 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Figura 34B).

El valor nutricional de las microalgas está asociado a su composición bioquímica: lípidos, proteína y carbohidratos. La alteración de las condiciones de cultivo de las microalgas lleva a modificaciones en su composición bioquímica (Utting, 1985; Thompson *et al.*, 1990, 1992; Ponis *et al.*, 2006a). La alteración de la intensidad luminosa y temperatura lleva a alteraciones en el perfil de ácidos grasos (Thompson *et al.*, 1990, 1992), la concentración de nitrógeno en el medio lleva a alteraciones en el contenido proteico (Gallger y Mann, 1981; Enright *et al.*, 1986; Utting, 1986) y el silicio puede afectar los niveles de triacilgliceroles (Enright *et al.*, 1986). Sin embargo, estas modificaciones de las condiciones de cultivo discontinuo son difíciles de mantener de forma prolongada en el tiempo. La aplicación de tasas de renovación en sistemas semicontinuos permite generar variaciones mucho mayores en los contenidos proteicos, mejorar el perfil de lípidos y reducir los carbohidratos en la dieta final, como ya se ha demostrado en trabajos previos (Fábregas *et al.*, 1996; 1998; 2001; Ferreira *et al.*, 2008, 2009; 2011; Seixas *et al.*, 2008, 2009) y descrito con anterioridad en este capítulo.

El contenido de lípidos en la dieta se encuentra relacionado con la supervivencia y crecimiento larvario de bivalvos. Se ha descrito la importancia de los lípidos para el desarrollo larvario de los moluscos bivalvos *Ostrea edulis* y *Crassadoma gigantea* J.E. Gray

representando prácticamente mitad de la energía utilizada (Holland y Spencer, 1973; Whyte *et al.*, 1992). También en *R. philippinarum* un elevado contenido de lípidos en la fracción orgánica de la dieta (22-34%) resultó más eficaz en el crecimiento y supervivencia larvaria (Fernandez-Reiriz *et al.*, 2006). En las dietas FAO10% y FAO40%, los lípidos representaron fracciones idénticas, manteniéndose alrededor de un 33% en la fracción orgánica de la dieta, situándose estos valores en el rango de los referidos por Fernandez-Reiriz *et al.* (2006). El menor peso proporcionado con la dieta del 40% resultó en una menor cantidad total de lípidos, no obstante proporcionó un contenido lipídico de mejor calidad debido al perfil de ácidos grasos. El contenido de ácidos grasos de las microalgas se ha modificado con la aplicación de tasas de renovación, incrementando el contenido de PUFAs y en particular de los ácidos grasos esenciales EPA y DHA con la tasa de renovación del 40%, resultando en supervivencias netamente superiores y crecimientos larvarios bastante mayores en las especies de moluscos estudiadas.

No obstante, los ácidos grasos esenciales aparentan ser un factor limitante de mayor peso que el contenido total de lípidos en el desarrollo larvario. La capacidad de los bivalvos de sintetizar *de novo* ácidos grasos poliinsaturados es variable y depende de la especie y su estadio de vida, incluso cuando presentes en la dieta, las larvas pueden no generar PUFAs suficientes para un crecimiento óptimo (Langdon and Waldock, 1981). En juveniles de *C. gigas* (Waldock y Holland, 1984) y *Mesodesma mactroides* (De Moreno *et al.* 1976, 1977), se observaron capacidades limitadas de elongación y desaturación de percursoros de la dieta. Adultos de *C. virginica* presentan capacidad limitada de elongación de ácidos grasos, sin embargo no presentan capacidad de desaturación (Chu y Greaves, 1991). En contraste, *R. philippinarum* parece sintetizar ácidos grasos altamente insaturados (PUFAs C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>) a partir de ácidos grasos C<sub>18</sub> presentes en la dieta, en cantidades suficientes para la realización de la metamorfosis (Laing *et al.*, 1990).

Los PUFAs EPA y DHA desempeñan un papel importante en la regulación de la fluidez de la membrana y han sido generalmente descritos como esenciales para el crecimiento de bivalvos (Chu y Webb, 1984). La importancia de estos ácidos grasos se pone en evidencia en los resultados obtenidos en trabajos de diferentes autores aunque su importancia en la dieta de bivalvos ha generado algunas contradicciones. Dietas con elevado contenido lipídico sin los ácidos grasos EPA y DHA resultaron en crecimientos bajos en larvas de *A. purpuratus* y *P. maximus* (Delaunay *et al.*, 1993; Nevejan *et al.*, 2003b), mientras que Thompson y Harrison



(1992) mostraron que el incremento de DHA en *T. pseudonana* incrementó el crecimiento de *C. gigas*. También Langon y Waldo (1981) demostraron la importancia del EPA y DHA en *C. gigas* al suplementar la dieta con EPA y/o DHA microencapsulado. La inclusión de ambos ácidos grasos en la dieta de *Dunaliella tertiolecta* y la inclusión de DHA en la dieta de *T. suecica*, que contiene EPA, resultó en un incremento en el crecimiento de las semillas de *C. gigas*, sugiriendo que la inclusión de ambos EFAs es más beneficioso que la inclusión de solo uno de ellos. Aún así, estos mismos autores sugieren igualmente que la inclusión de uno solo de los EFAs (EPA o DHA) puede satisfacer los requerimientos de la semilla de *C. gigas*. Para *R. philippinarum* (Laing *et al.*, 1990) y *R. decussatus* (Albentosa *et al.*, 1996) no se encontraron requerimientos nutricionales de los *n-3* PUFAs, en contraste con requerimientos específicos de EPA por *C. gigas*, *C. rhizophorae* (Helm y Laing, 1987) y semilla de *C. virginica* (Wikfors *et al.*, 1996) y de DHA en juveniles de *O. edulis* (Enright *et al.*, 1986), larvas de *M. mercenaria* y *Tapes semidecussata* (Helm y Laing, 1987), semilla de *V. pullastra* (Albentosa *et al.*, 1994), larvas de *P. maximus* (Delaunay *et al.*, 1993) y juveniles de *Placopecten magellanicus* (Coutteau *et al.*, 1996). De estos estudios se concluye que la inclusión de EFAs (EPA y DHA) en la dieta es, en general, benéfica para el desarrollo larvario de bivalvos.

Los esteroides desempeñan un papel importante en la determinación del valor nutricional de las microalgas para la alimentación de moluscos bivalvos (Wikfors *et al.*, 1996). A pesar de no haber evaluado los esteroides en las microalgas sometidas a diferentes tasas de renovación, se ha descrito que la aplicación de tasas de renovación en sistemas semicontinuos permite modificar la concentración de esteroides en las microalgas marinas (Fábregas *et al.*, 1997). De este modo, la aplicación de mayores tasas de renovación a las microalgas pudo haber proporcionado diferentes concentraciones de esteroides, mejorando la calidad de la dieta.

A pesar de haberse dado relativamente poca importancia a las proteínas en la alimentación de moluscos bivalvos, se ha demostrado la importancia de las mismas principalmente en fase final del crecimiento larvario, resultando en un mayor crecimiento, supervivencia y metamorfosis de las larvas de bivalvos (Gallagher y Mann, 1981; Utting, 1986; Haws *et al.*, 1993; Uriarte *et al.*, 2004). Las proteínas representan un 30-40% del origen



de la energía necesaria para el desarrollo larvario (Holland y Spencer, 1973; Whyte *et al.*, 1992), con valores ideales de proteína en dieta entre un 30 y un 60% para satisfacer la demanda de las larvas (Brown *et al.*, 1997). Se ha incrementado el contenido proteico de solo un 23,4% del peso seco de la dieta FAO 10% hasta 32,3% en la dieta FAO 40%. El menor contenido proteico obtenido en la dieta FAO10% puede justificar el peor crecimiento de las larvas, mientras que en la dieta FAO40%, el contenido proteico se encuentra en el rango descrito por Brown *et al.* (1997), proporcionando el mejor crecimiento y supervivencia larvarias de las especies de bivalvos probadas.

Es importante hacer notar que a pesar de no haberse analizado el contenido de aminoácidos libres en las microalgas, se sabe que el contenido de aminoácidos intracelulares en la biomasa microalgal aumenta notablemente con el incremento de la tasa de crecimiento de los cultivos no limitados por nitrógeno (Flynn, 1990), lo que podría conllevar a una mayor digestibilidad y eficiencia de absorción de la proteína presente en la dieta FAO 40%.

La importancia de los carbohidratos en el crecimiento larvario de bivalvos está poco estudiada, no estando definidos los requerimientos de los mismos de las larvas, sin embargo, además de la proteína los carbohidratos también desempeñan un papel significativo en la metamorfosis, tal y como ha sido demostrado en *C. gigas* y *C. virginica* (Haws *et al.*, 1995). Igualmente parecen asumir un papel importante en el equilibrio energético, proporcionando un mayor equilibrio en el uso de los lípidos y de la proteína (Whyte *et al.*, 1981). Los carbohidratos representan menos de un 10% de la energía utilizada por las larvas en su desarrollo (Holland y Spencer, 1973; Whyte *et al.*, 1992). La aplicación de las tasas de renovación en el cultivo ha reducido el contenido de carbohidratos desde un 27% hasta un 14% con el incremento de la tasa de renovación de las microalgas de un 10 al 40%, respectivamente, estando ambos valores dentro del rango que conduce a buenos índices de crecimiento en las larvas de bivalvos (5-30% del peso de la dieta, Brown *et al.*, 1989).

La aplicación de técnicas de cultivo continuo y semicontinuo ya había sido propuesta como alternativa a los cultivos tradicionales *batch* (Fábregas *et al.*, 1995a, b; Otero *et al.* 1997b, Borowitzka, 1997) para la mejora del valor nutritivo de los cultivos de microalgas. Además de proporcionar elevadas y constantes cantidades de biomasa microalgal, permiten manipular el perfil bioquímico de las células debido a las condiciones de cultivo controladas (Sukenik y Wahnnon, 1991; Otero y Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1997b) mejorando su valor

nutricional. La modificación del valor nutritivo de las microalgas como alimento para animales filtradores a través de la aplicación de diferentes tasas de renovación ya fue probada por otros autores. Fábregas *et al.* (1998, 2001) lograron incrementar fuertemente el crecimiento, supervivencia y capacidad reproductiva de *Artemia* al incrementar las tasas de renovación de las microalgas utilizadas en la dieta: *Tetraselmis suecica* y *Phaeodactylum tricorutum*. Ferreira *et al.* (2008; 2009 y 2011) demostraron igualmente que el incremento de las tasas de renovación aplicadas a las microalgas *Isochrysis aff. galbana* Clon T-ISO y *Nannochloropsis gaditana* se refleja en la tasa de crecimiento, peso individual, contenido orgánico y productividad de biomasa del rotífero *B. plicatilis*. Resultados similares se obtuvieron en el cultivo de *B. plicatilis* alimentado con *Brachiomonas submarina* con diferente composición bioquímica originada por cambios en la tasa de crecimiento de la microalga debido a diferentes condiciones aplicadas en un sistema de cultivo continuo (Scott, 1980).

Uno de los principales problemas en los criaderos de moluscos es la elevada mortalidad, muchas veces masiva, conllevando la pérdida total de la producción, y que ha sido asociada a patologías bacterianas, causadas principalmente por bacterias del género *Vibrio* (Paillard *et al.*, 2004; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010), muchas veces provenientes de cultivos microalgales en mal estado o promovidos por la presencia de elevadas cantidades de restos orgánicos en ellos. La utilización de sistemas semicontinuos permite reducir la carga bacteriana, generalmente elevada en los convencionales sistemas *batch*. A pesar de no se haber detectado vibrios en los cultivos larvarios, el incremento de la tasa de renovación en las microalgas de un 10% hasta un 40% permitió reducir marcadamente la carga bacteriana en los cultivos microalgales y, consecuentemente reducir la carga bacteriana y/o materia orgánica aportada a los cultivos larvarios. Las elevadas densidades bacterianas en los cultivos larvarios de bivalvos son consideradas como perjudiciales para las larvas (Walne, 1956a, 1956b, 1958), e incluso las bacterias inocuas en grandes cantidades pueden afectar negativamente la tasa de ingestión de algas (Ukeles y Sweeney, 1969). Algunas cepas bacterianas son capaces de invadir las larvas para producir toxinas (Guillard, 1959; Tubiash *et al.*, 1965; Tubiash *et al.*, 1970; Brown, 1973; Di Salvo, 1978; Nottage y Birkbeck, 1986).

Aunque habría sido de gran interés el estudio de la población bacteriana asociada a los cultivos en las distintas condiciones, en los ensayos realizados se pudo observar, en general, un efecto negativo de la carga bacteriana aportada con la dieta en la supervivencia larvaria de

bivalvos. Asimismo, una vez más se realza la importancia de la utilización de sistemas semicontinuos no solo como herramienta para manipulación de la composición bioquímica de las microalgas, como también la importancia de la utilización de estos sistemas para reducir la carga bacteriana aportada a los cultivos larvarias.

Los excelentes resultados obtenidos con todas las especies de moluscos probadas demuestran que la capacidad de modular las condiciones de cultivo de las microalgas en sistemas semicontinuos puede contribuir a mejorar importantes problemas en los criaderos de estos organismos, aumentando la productividad y fiabilidad de los cultivos microalgales para alimentación y mejorando su composición bioquímica con el fin de satisfacer los requerimientos nutricionales de las larvas. Además, es necesario recordar que los cultivos provenientes de mayor tasa de renovación (40%) tuvieron un peso seco claramente inferior que los de TR 10%, lo que resultó en un menor peso de la dieta aportada a las larvas, poniendo en aún más en evidencia la mayor calidad de la dieta.

Tanto la composición nutricional de los cultivos de microalgas como la carga bacteriana aportada con la dieta resultaron ser factores limitantes para la supervivencia larvaria de bivalvos, aunque se detectaron distintas sensibilidades dependiendo de la especie, mientras que el perfil bioquímico de la dieta es el que controla el crecimiento larvario. Aunque los resultados indican que el efecto de la composición nutricional del cultivo sobre la supervivencia larvaria hasta metamorfosis es, en algunos casos, de menor relevancia que el efecto de la carga bacteriana, es necesario destacar que la variabilidad bioquímica generada en la dieta microalgal al aplicar las dos tasas de renovación es mucho menor que la obtenida en otros experimentos en los que los cultivos se encontraban limitados por nitrógeno en los cultivos de baja tasa de renovación.

## 2. Efecto del uso de las especies de Cryptophyceaea *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea* en la supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos

### 2.1. Justificación y diseño experimental

Una vez establecida la importancia de la metodología de cultivo sobre el valor nutritivo de las especies microalgales para el cultivo larvario de moluscos, se procedió a la valoración del efecto de la introducción en la dieta de las dos especies de criptófitas seleccionadas en el capítulo 1 por su mayor productividad y robustez en cultivo continuo, para cultivos larvarios de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) y ostra rizada (*Crassostrea gigas*). Los resultados obtenidos en el capítulo 1 confirmaron la posibilidad de mantener cultivos masivos de microalgas de la clase Cryptophyceae en sistemas semicontinuos ya descritos para la especie *Rhodomonas lens* en nuestro laboratorio (Coutinho, 2008; Seixas *et al.*, 2008; 2009), y contrastando con los resultados de otros autores que indicaban valores bajos de productividad para las especies de este grupo (Renaud *et al.*, 1999; Knuckey *et al.* 2005). Así mismo, los resultados aquí obtenidos sobre el valor nutritivo de las distintas especies de criptófitas probadas para el crecimiento de *B. plicatilis* en comparación de otras especies microalgales tradicionales, como *Nannochloropsis gaditana*, vino a confirmar el elevado valor nutricional de las especies de este grupo, ya descrito para otros animales filtradores como larvas de erizo (Rogers-Bennet *et al.*, 1994), copépodos (Jónasdóttir, 1994; Tang *et al.*, 2001; Knuckey *et al.* 2005), gasterópodos (Aldana-Aranda y Patiño-Suarez, 1998), larvas y juveniles de diferentes especies de bivalvos (Ferreiro *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; McCausland *et al.*, 1999; Leonardos y Lucas, 2000; Milione and Zeng, 2007; Tremblay *et al.*, 2007; Gagné *et al.*, 2010; Nascimento, 2010).

La introducción de la microalga *R. lens* en una dieta *standard* mixta con las microalgas *Chaetoceros* sp., *I. galbana* y *Pavlova lutheri*, en proporción 1:1:1:1 de peso seco de la dieta, para la alimentación de larvas de bivalvos, resultó en un incremento significativo en el crecimiento y supervivencia de *R. philippinarum* hasta la metamorfosis en escala semi-industrial. Además, el perfil de ácidos grasos de las larvas presentó un mayor contenido de PUFAs, en particular el ácido graso EPA, cuando se alimentaron con la dieta con *R. lens* frente las larvas alimentadas con la dieta *standard* (Nascimento, 2010).

Por ello, en este capítulo se describirá un experimento en el que las criptófitas *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea*, que presentaron el mejor crecimiento y demostraron su potencial en el cultivo de *B. plicatilis* en experimentos previos, se incluyeron en las dietas de larvas de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) y ostra rizada (*Crassostrea gigas*). Para valorar su efecto en el crecimiento y supervivencia se incluyó cada microalga en la dieta FAO (*I. galbana*, *T. suecica*, *Chaetoceros* sp.) en dos tasas de sustitución diferentes, 10 y 25% del peso de la dieta.

Todas las microalgas se cultivaron en cultivo semicontinuo con una tasa de renovación del 40%, con una intensidad luminosa de  $228,7 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  en base a los resultados obtenidos con anterioridad. Así, se probaron un total de 5 dietas: FAO; Rhodo 10%; Rhodo 25%; Chroo 10%; Chroo 25%.

## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Densidad celular y productividad de *R. lens* y *C. placoidea*

Las densidades celulares de estabilización en los cultivos semicontinos de *R. lens* y *C. placoidea* fueron similares entre las dos especies, con la mayor densidad alcanzada por *C. placoidea*,  $18,93 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$ , frente a los  $16,45 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$  alcanzados por *R. lens* con la misma tasa de renovación (Figura 44). Debido a que se ha aplicado una mayor tasa de dilución en estos cultivos (TR 40%) que en los cultivos de las criptófitas utilizadas en la alimentación de rotíferos (capítulo 1, sección 1.3), sometidos a una TR 30% y a la misma intensidad luminosa (HHL), se esperaba que las densidades de estabilización fuesen inferiores, sin embargo, las densidades en ambas microalgas superaron las densidades obtenidas en el capítulo anterior (*C. placoidea* -  $13,63 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$  y ; *R. lens* -  $15,57 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$ ), lo que pudo derivar de un mejor ajuste de pH en los cultivos o de una mejor aclimatación previa. NO es posible descartar totalmente que el importante incremento en las densidades celulares de *C. placoidea* pudiese derivarse de la existencia de algún nutriente

limitante distinto del nitrógeno en la TR30%, de forma que el incremento de disponibilidad en la TR 40% resultase en un incremento de la densidad celular.

Debido al mayor peso celular de *R. lens*, la productividad en el la fase de estabilización fue mayor en *R. lens* que en *C. placoidea* (562 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> y 497 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, respectivamente), tal como se observó en el capítulo 1, donde *R. lens* mostró ser la criptófita con mayor productividad. A pesar de la mayor densidad celular obtenida en estos cultivos, la productividad en peso de los cultivos de *R. lens* igualó la obtenida para la tasa de renovación de 30%, sometidos a la misma intensidad luminosa. Por otro lado, la productividad en peso de los cultivos de *C. placoidea* superó la obtenida en los cultivos descritos en el capítulo anterior, con la misma intensidad luminosa y tasa de renovación de 30% (463 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>). Este incremento de la productividad se reflejó en el peso celular de ambas microalgas, que disminuyó con respecto a los pesos celulares obtenidos con la tasa de renovación del 30%. En *R. lens* el peso celular fue de 102,5 pg.célula<sup>-1</sup>, ligeramente inferior al obtenido para TR30% (120,4 pg.célula<sup>-1</sup>), mientras que se observó una marcada disminución del peso celular de *C. placoidea* de 113,2 pg.célula<sup>-1</sup> (TR30%) hasta 65,6 pg.célula<sup>-1</sup>.

Las criptófitas presentaron productividades similares en peso a las de las microalgas utilizadas en la dieta FAO, *I. galbana*, *T. suecica*, *Chaetoceros* sp, comúnmente utilizadas en acuicultura cultivadas en el mismo sistema (Figura 29), confirmando que, a pesar de que las especies de este grupo han sido descritas como difíciles de cultivar, es posible producirlas masivamente en sistemas semicontinuos, incluso en condiciones menos optimas que las utilizadas en este trabajo (Seixas *et al.*, 2008; 2009).

Las productividades obtenidas tanto por las criptófitas como para las microalgas utilizadas en la dieta FAO (descritas anteriormente) superan los valores alcanzados por otros autores en los mismos sistemas de cultivo para otras microalgas como *Phaeodactylum tricorutum* (250 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, Fábregas *et al.* 1996a), *Nannochloropsis gaditana* (152 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, Ferreira *et al.*, 2009) y *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO) (263 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, Ferreira *et al.*, 2008; 2011) debido probablemente a que la concentración de nutrientes y intensidad de luz fueron superiores, y se encuentran en el rango de valores más elevados descritos en la literatura para sistema de producción masiva (Molina *et al.*, 2001; Ancién-Fernández *et al.*, 2001; 2012; Michels *et al.*, 2014; Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015).



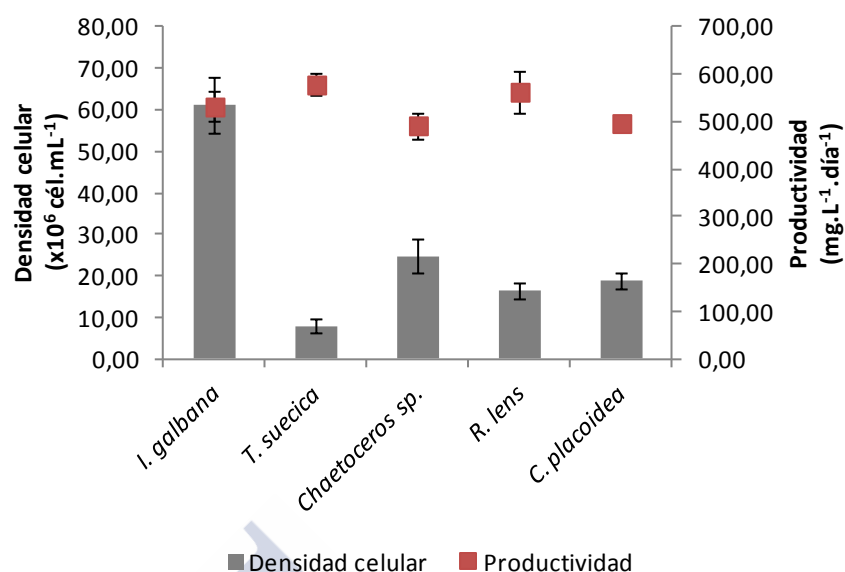


Figura 44- Densidades celulares (células.mL $^{-1}$ ) y productividades (mg.L $^{-1}$ .día $^{-1}$ ) en la fase de estabilización de cultivos semicontinuos de las diferentes microalgas utilizadas en la dieta en los que se aplicó una tasa de renovación diaria del 40% del volumen de los cultivos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test-t,  $p < 0,05$ ).

### 2.2.2. Composición bioquímica

Las criptófitas, como se ha descrito anteriormente, presentan una baja relación C:N (*R. lens* – 5,82; *C. placoidea* – 5,99) que se deriva de un elevado contenido proteico de estas especies, alcanzando un 46 y un 47% en *R. lens* y *C. placoidea*, respectivamente. Los valores obtenidos para la relación C:N de las dos especies de criptófitas fueron ligeramente superiores a los obtenidos en el capítulo anterior con la misma irradiancia (*R. lens*: 5,51; *C. placoidea*: 5,65) con una TR 30%. En el caso de *R. lens* este incremento se debe sobre todo a un aumento de carbono que es causado principalmente por un incremento de los lípidos estructurales tal y como revelan los cambios en el perfil de ácidos grasos. Este incremento fue mucho menor en *C. placoidea*.

El contenido proteico en peso seco de las criptófitas fue netamente superior al de las microalgas utilizadas en la dieta control FAO (*I. galbana* (32%), *T. suecica* (40%) y *Chaetoceros sp.* (25%), confirmando el elevado contenido proteico de este grupo de

microalgas que alcanzaron un 46 y un 47%, en *R. lens* y *C. placoidea*, respectivamente (Figura 45).

Se encontraron diferencias en el contenido en carbohidratos de las cinco microalgas utilizadas, obteniéndose el menor contenido en carbohidratos en *Chaetoceros* sp. (11,9% del peso seco, como referido anteriormente) y el mayor contenido en *C. placoidea*, que alcanzó un 22,5% del peso seco. *R. lens*, presentó un valor de contenido en carbohidratos intermedio, con un 14,7% de peso seco (Figura 45).

Mientras que el contenido en carbohidratos de *C. placoidea* sufrió poca variación con respecto a los obtenidos en los cultivos de TR 30%, (25,1%) el contenido en carbohidratos de *R. lens* descendió de forma acusada con respecto a los cultivos de TR30%: 23,3%. El incremento de la relación C:N no deriva por tanto de un incremento del contenido de carbohidratos, si no probablemente de un incremento en el contenido de lípidos. El contenido de carbohidratos en las microalgas disminuye generalmente con el incremento de las tasas de renovación, como se observa en otras especies (Fábregas *et al.*, 1995a, b; Fábregas *et al.*, 1996a, b; Otero y Fábregas, 1997; Ferreira *et al.*, 2008; 2009; 2011) mientras que se incrementa cuando se someten a mayor intensidad luminosa, como se observó en el capítulo anterior para las dos especies de criptófitas. Mientras que en otras especies la densidad celular disminuye con el incremento de la tasa de renovación en el mismo sistema de cultivo (Ferreira *et al.*, 2008; 2009) lo que resulta en un incremento de la irradiancia efectiva disponible para las células al incrementar la tasa de renovación, en este caso, las elevadas densidades celulares de estabilización obtenidas con la TR40% provocó que la irradiancia efectiva sea similar para ambas TR en el caso de *R. lens* y incluso inferior en TR40% en el caso de *C. placoidea*.

El contenido lipídico de las criptófitas alcanzó un 31,5 y un 28,3 % de peso seco para *R. lens* y *C. placoidea*, respectivamente (

Figura 45). Estos valores de contenido lipídico fueron superiores a los obtenidos anteriormente por las mismas especies cultivadas con menor tasa de renovación (30%) e igual intensidad luminosa. Este incremento del contenido lipídico se podría deber a un mejor ajuste de pH en el cultivo conllevando a una mayor disponibilidad de carbono en el medio y, consecuentemente incrementando el crecimiento celular y el contenido de lípidos



estructurales al igual que lo observado en otras especies (Sukenik *et al.*, 1989; 1993; Otero y Fábregas 1997; Otero *et al.*, 1997a, b; Ferreira *et al.*, 2008; 2009; 2011).

No obstante, Coutinho (2008) y Freire (2015) obtuvieron valores de contenido lipídico alrededor de un 22% para las diferentes tasas de renovación utilizadas (TR entre 20 y 50%), obteniendo el máximo contenido lipídico para la menor tasa de renovación (TR 10%), alrededor de un 30% de peso seco, discrepando con los resultados obtenidos en este trabajo. El menor contenido lipídico descrito por Seixas *et al.* (2008; 2009) para *R. lens* (11%) se obtuvo en cultivos semicontinuos saturados de nitrógeno, no obstante, debido a la diámetro del sistemas de cultivo las células se encontraban limitadas por luz, por lo que la menor disponibilidad de luz en los cultivos justificaría el menor contenido lipídico descrito por Seixas *et al.* (2008; 2009), frente a los valores descritos por Coutinho (2008) y en este trabajo, donde la irradiancia fue superior.

La fracción de ácidos grasos saturados fue idéntica en ambas criptófitas, representando entre un 22,7% y un 25,9% del contenido total de ácidos grasos total, de los cuales el 16:0 fue el más abundante, alcanzando un 13,6% y un 20,2% en *R. lens* y *C. placodea* respectivamente. Los ácidos grasos monoinsaturados representaron una pequeña fracción, con un 7,0 y un 12,0% para *R. lens* y *C. placodea*, respectivamente, estando mayoritariamente compuestos por el 18:1n9 que representa un 7% y un 6,23%, respectivamente. Los PUFAs representaron una importante fracción del total de ácidos grasos, siendo superior en *R. lens*, con un 73,1%, que en *C. placodea*, con un 66,8%. Los ácidos grasos 18:3n3 y 18:4n3 representan la mayor fracción de PUFAs, representando cada uno alrededor de un 22% del total de ácidos grasos en *C. placodea*, mientras que en *R. lens*, el primero representó un 20% y el segundo casi un 30% del total de ácidos grasos. Los ácidos grasos esenciales EPA y DHA, se detectaron en elevadas cantidades en *R. lens*, alcanzando un 14,1 y 8,8% en el total de ácidos grasos, respectivamente, mientras que en *C. placodea* el EPA representó un 8,9%. El DHA, como se observó anteriormente, no está presente en *C. placodea*, no obstante se detectó el DPA que representó un 5,2% del total de ácidos grasos (Tabla 8).

A diferencia de los resultados obtenidos para las mismas especies cuando se sometieron a TR 30% e igual intensidad luminosa en el capítulo anterior, un incremento de la TR hasta el 40% genera una disminución en el contenido de los ácidos grasos saturados en ambas

criptófitas, pasando de un 29,9 a 22,7% en *R. lens* y de un 28,0 a un 25,1% en *C. placoides*. Esta disminución en el contenido de ácidos grasos saturados en *R. lens* se debe a la marcada disminución del contenido del ácido graso 14:0 en *R. lens* de un 14,1% (TR 30%) hasta un 6,4% (% total ácidos grasos), mientras que en *C. placoides* bajó de alrededor de un 3% hasta casi un 2% en estos cultivos.

El contenido de ácidos grasos monoinsaturados fue similar en *C. placoides* en los cultivos sometidos a diferentes TR, mientras que con el incremento de la TR, el contenido de monoinsaturados en *R. lens* bajó de un 12,2 (TR30%) hasta un 7,0%.

La diferencia en el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados resultó en un marcado incremento en el contenido de PUFAs con el incremento de la tasa de renovación de 30% al 40%, incrementándose en *R. lens*, de un 58,0% hasta un 73,1%, mientras que en *C. placoides* el contenido de PUFAs fue similar en los cultivos sometidos a las TR 30 y 40%.

Este incremento en el contenido de PUFAs fue más acentuado el ácido graso 18:4n3, que incrementó desde el 18,0% y el 16,3% hasta un 29,8% y un 22,2% en *R. lens* y *C. placoides*, respectivamente. Lo mismo se pudo observar en el contenido de ácidos grasos esenciales EPA y DHA que se incrementaron con la TR en los cultivos de *R. lens*, desde un 8,2% hasta un 14,1% y de un 6,8% hasta 8,9%, respectivamente. En *C. placoides* el EPA y el DHA presentaron valores similares a los obtenidos para la TR 30%, obtenidos en el capítulo anterior.

Coutinho (2008) registró una disminución en los ácidos grasos saturados 14:0 y 16:0 y el monoinsaturado 18:1n9, concentrados en los lípidos neutros y glicolípidos respectivamente, debido a la sustitución por los poliinsaturados linoleico, oleico, EPA y DHA, indicando un desplazamiento de los lípidos de reserva por lípidos estructurales requeridos en células en crecimiento, metabólicamente activas con el incremento de la tasa de renovación. El mayor aumento se observó en el ácido graso 18:4n3, acompañando el incremento de la tasa de renovación, al igual que en este trabajo.

Asimismo, la aplicación de una mayor tasa de renovación y posible mejor ajuste de pH permitieron una mayor disponibilidad de nutrientes y un mayor crecimiento celular, que resultaron en una mejora del perfil de ácidos grasos de la microalga tal como observado en otras especies cultivadas en sistemas de cultivo semicontinuo iguales, donde, en general, se observa una disminución del contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados,

mientras que el contenido de PUFAs incrementa (Otero *et al.*, 1995, 1997a, 1997b; Otero y Fábregas, 1997; Ferreira *et al.*, 2008, 2009; 2011).

En la Figura 45 se puede observar la variación de la composición bioquímica total (% peso seco) en las diferentes especies utilizadas en la dieta de moluscos bivalvos. La diferente composición bioquímica de las microalgas y la inclusión de las criptófitas en la dieta en dos tasas de sustitución (10 y 25%) resultó en cinco perfiles bioquímicos diferentes de alimento para larvas de bivalvos (FAO, Rhodo 10, Rhodo 25, Chroo 10 y Chroo 25) (Figura 46). A pesar de la diferencia en la composición bioquímica de las microalgas, las dietas empleadas presentaron pequeñas variaciones en las fracciones de proteína, carbohidratos y lípidos en la composición bioquímica total de las dietas (Figura 46A). El contenido proteico fue el que sufrió mayor variación, ya que se incrementó desde un 32% en la dieta FAO, hasta un 37% en Rhodo 25. Así, las dietas con la mayor tasa de inclusión de criptófitas resultaron en dietas con mayor contenido proteico. Los contenidos lipídico y de carbohidratos presentaron pocas diferencias entre las diferentes dietas. El contenido lipídico osciló entre un 23% en las dietas FAO y Chroo 10 hasta un 25% en la dieta Rhodo 25, mientras que el contenido en carbohidratos varió entre un 14% (FAO, Rhodo 10 y Rhodo 25) hasta un 16% en Chroo 25 (Figura 46A).

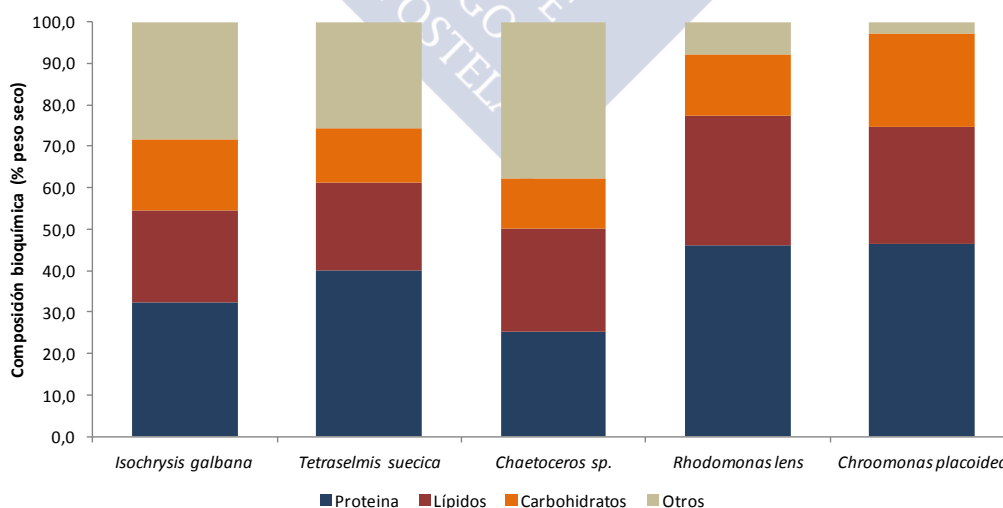


Figura 45 - Composición bioquímica (% peso seco) de las microalgas utilizadas en la alimentación de larvas de moluscos bivalvos.

Tabla 8- Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) y total de ácidos grasos (pg.célula<sup>-1</sup>) de las criptófitas *R. lens* y *C. placoidea* y de las microalgas de la dieta FAO (*I. galbana*, *T. suecica* y *Chaetoceros* sp.) cultivadas en sistema semicontinuo con una tasa de renovación de 40% diario y utilizadas en la alimentación de larvas de moluscos.

Ácidos grasos	<i>Rhodomonas lens</i>	<i>Chroomonas placoidea</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Chaetoceros</i> sp.
<b>14:0</b>	6,42 ± 0,38	1,83 ± 0,18	9,58 ± 0,96	n.d.	36,34 ± 1,46
<b>16:0</b>	13,64 ± 0,38	20,2 ± 1,24	20,55 ± 0,78	22,28 ± 1,08	7,09 ± 0,14
<b>16:1</b>	n.d.	1,89 ± 1,64	15,53 ± 0,73	3,73 ± 0,84	20,11 ± 0,39
<b>16:?</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,07 ± 0,06
<b>16:4n3</b>	n.d.	n.d.	n.d.	17,15 ± 1,06	n.d.
<b>18:00</b>	2,67 ± 0,89	3,05 ± 1,11	0,38 ± 0,66	0,97 ± 0,84	0,75 ± 0,65
<b>18:1n9</b>	7,0 ± 3,4	6,23 ± 0,23	2,94 ± 0,55	9,95 ± 0,3	1,9 ± 0,62
<b>18:2n6</b>	n.d.	8,07 ± 0,14	2,19 ± 0,04	5,35 ± 0,09	0,73 ± 0,63
<b>18:3n6</b>	n.d.	n.d.	0,55 ± 0,95	n.d.	3,4 ± 0,03
<b>18:3n3</b>	19,44 ± 0,55	22,51 ± 0,37	2,91 ± 0,07	21,43 ± 0,6	n.d.
<b>18:4n3</b>	29,74 ± 0,15	22,15 ± 1,25	9,25 ± 0,31	12,99 ± 0,3	2,14 ± 0,03
<b>20:1n9</b>	n.d.	n.d.	n.d.	1,19 ± 1,03	n.d.
<b>20:4n6</b>	1,05 ± 0,91	n.d.	n.d.	0,73 ± 0,63	7,51 ± 0,03
<b>20:5n3</b>	14,11 ± 0,64	8,92 ± 0,29	26,47 ± 0,55	6,39 ± 0,13	15,42 ± 0,1
<b>22:5n6</b>	n.d.	5,15 ± 0,21	0,45 ± 0,78	n.d.	n.d.
<b>22:6n3</b>	8,76 ± 0,54	n.d.	9,19 ± 0,22	n.d.	1,07 ± 0,93
<b>SAT</b>	22,73 ± 0,89	25,08 ± 2,5	30,51 ± 1,11	23,25 ± 0,3	44,18 ± 0,95
<b>MONO</b>	7,0 ± 3,4	8,12 ± 1,51	18,48 ± 0,18	14,88 ± 1,6	22,01 ± 0,57
<b>PUFA</b>	73,08 ± 2,77	66,80 ± 1,56	51,01 ± 1,09	64,03 ± 1,38	30,27 ± 1,53
<b>Total ácidos grasos</b>	2,84 ± 0,11	4,40 ± 0,06	1,1 ± 0,06	10,27 ± 1,49	5,80 ± 0,29

n.d. – no detectado

Las dietas resultaron ser similares en cuanto al peso seco total de la misma aportado a las larvas, oscilando entre  $1951 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en la dieta FAO hasta  $2210 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en la dieta Rhodo 25 (Figura 46B). Cuando consideramos la diferencia entre los pesos de cada una de las fracciones orgánicas añadidos en cada dieta (Figura 46B), las diferencias son mayores que las observadas en porcentaje (Figura 46A). La sustitución de parte de la dieta resultó en un incremento de la fracción orgánica en la dieta con el aumento de la tasa de sustitución, debido al elevado contenido orgánico observado en las criptófitas. Así, en las dietas Rhodo y Chroo se aportó más contenido proteico, lipídico y carbohidratos que en la dieta FAO, siendo este aporte superior en las dietas con tasa de sustitución de 25%.

La sustitución de parte de la dieta FAO con las criptófitas resultó en ligeras mejoras en el perfil de ácidos grasos de las dietas correspondientes, debido a la elevada calidad del perfil de ácidos grasos PUFAs de *R. lens* y *C. placoidea* (Tabla 8), en particular de los ácidos grasos poliinsaturados de  $C_{18}$ .

El contenido de los ácidos grasos 18:3n3 y 18:4n3 en la dieta incrementó con ambas tasas de inclusión de las criptófitas en la dieta. El mayor contenido del ácido graso 18:3n3 se observó en las dietas con mayor tasa de sustitución, alcanzando un 10,6% y un 9,1% del total de ácidos grasos en las dietas Chroo25% y Rhodo25%, respectivamente, detectándose alrededor de un 8% de este ácido graso para la menor tasa de inclusión de ambas criptófitas, siendo el menor contenido observado en la dieta FAO, con un 6,4% del total de ácidos grasos. El ácido graso 18:4n3 representó una elevada fracción en el total de ácidos grasos en ambas dietas con inclusión de 25% de las criptófitas, logrando casi un 11%, bastante superior al 7,7, 7,4 y 7,0 observado en las dietas Rhodo10%, Chroo10% y FAO, respectivamente.

La inclusión de las criptófitas en la dieta no resultó en mejoras en la fracción del ácido graso EPA, estando en igual proporción en la dieta FAO y en las dietas con las mayores tasas de inclusión de las criptófitas, alrededor de un 15%, no obstante, la menor inclusión de las criptófitas en la dieta resultó en una disminución en la fracción del EPA hasta un 12%. El contenido del ácido graso DHA en la dieta fue superior en la dieta Rhodo25%, representando casi 4% del total de ácidos grasos, disminuyendo hasta un 1,4% y 2% en las dietas con tasa de sustitución de 10% (Chroo y Rhodo, respectivamente). El DPA, detectado en *C. placoidea*, solamente estuvo presente en las dietas que contenían esta especie, representando un 0,4% y un 1,1% del total de ácidos grasos en las dietas Chroo10 y Chroo25, respectivamente.

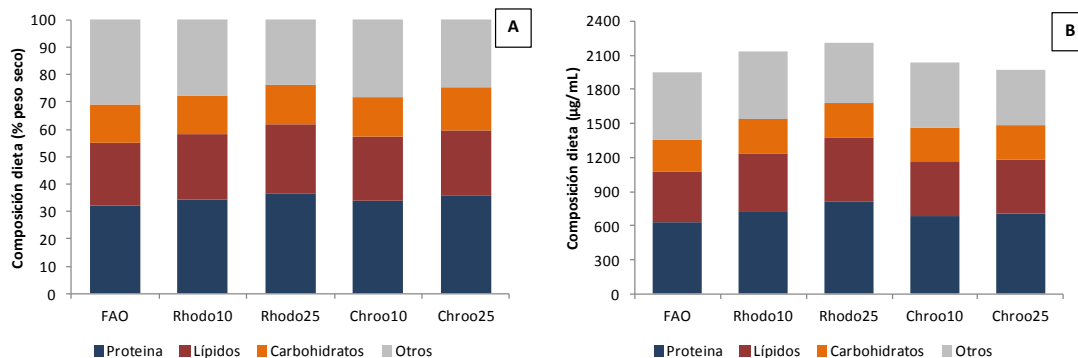


Figura 46 - Composición bioquímica de las diferentes dietas para alimentación de larvas de bivalvos en % de peso seco (A) y  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de alimento añadido (B).

### 2.2.3. Crecimiento de moluscos bivalvos con dietas mixtas

Se probaron las dietas mixtas en 2 cultivos larvarios de *Ruditapes philippinarum* (Abril y Junio de 2013) y en un cultivo de *Crassostrea gigas* (Junio de 2013). La sustitución de una parte de la dieta FAO por una criptófita resultó, en un incremento en la supervivencia y crecimiento larvario de *C. gigas* y *R. philippinarum*, con ambas especies de criptófitas en comparación con la dieta mixta FAO.

Para *R. philippinarum*, la inclusión de las dos especies de criptófitas en un 25% de peso de la dieta incrementó la supervivencia larvaria de forma significativa (Tuckey,  $p < 0,05$ ) en el último día de ensayo en los dos ensayos realizados (Figura 47). Con una sustitución menor, de un 10%, el peso de la microalga introducida en la dieta también proporcionó mejores supervivencias, que la dieta FAO, aunque estas no resultaron estadísticamente significativas. Las dos especies de criptófitas incluidas en la dieta resultaron en supervivencias similares al largo de los días de cultivo en el segundo ensayo no existiendo diferencias significativas entre ambas, no obstante en el primero con supervivencias generalmente superiores debido probablemente a una mejor calidad de la puesta, se registró alguna variación con las menores sustituciones. En el día 9, se registró una mayor supervivencia larvaria de *R. philippinarum* alimentada con Rhodo10% que con Chroo10%, mientras que en el día 18, Chroo10% generó mayor supervivencia que los cultivos alimentados con Rhodo 10%.

El crecimiento de *R. philippinarum* siguió la misma tendencia que la supervivencia con la inclusión de las criptófitas en la dieta, confirmando que un mayor crecimiento va asociado a

mayores supervivencias de las larvas (Figura 48). La inclusión de las criptófitas en la dieta resultó en un crecimiento mayor de las larvas, en general, con ambas tasas de sustitución (10 y 25%), sin embargo, en las 2 dietas que contenían un 25% de peso de criptófitas se observó un tamaño larvario final significativamente superior (Tuckey HSD,  $p < 0,05$ ) que en las larvas alimentadas con FAO, Rhodo 10% y Chroo 10% siendo que el mayor tamaño se registró con la inclusión del 25% de la criptófita *C. placoides* en ambos experimentos (Figura 48).

El experimento de *Crassostrea gigas* se llevó a cabo con cultivos de *I. galbana* limitados por vitaminas, lo que afectó la supervivencia y crecimiento de las larvas (Figura 49 y Figura 50), presentando bajas supervivencias especialmente en el grupo alimentado con FAO. La sustitución de parte de la dieta (10 y 25%) con las criptófitas conllevó a una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia de las larvas de *C. gigas* en el último día del experimento, excepto para la mayor sustitución con *R. lens* (25%), que presentó una supervivencia igual a la dieta FAO (Tuckey HSD,  $p < 0,05$ ). Mientras que la menor sustitución de la dieta con *R. lens* (10%) resultó en una supervivencia significativamente superior frente las larvas que se alimentaron con *R. lens* 25% (Tuckey HSD,  $p < 0,05$ ), ambas inclusiones de *C. placoides* resultaron en valores de supervivencia similares en larvas de *C. gigas*.

El bajo crecimiento en las larvas de *C. gigas* alimentadas con FAO debido a la mala calidad de la dieta, posiblemente por no cumplir los requerimientos de las larvas, fue compensado al sustituir parte de la dieta con cualquiera de las dos especies de criptófitas. El crecimiento de las larvas de *C. gigas* fue significativamente superior (Tuckey HSD,  $p < 0,05$ ) en las larvas alimentadas con las criptófitas, siendo marcadamente superior con la inclusión de *C. placoides*, particularmente cuando la inclusión en la dieta es de un 25% (Figura 50).



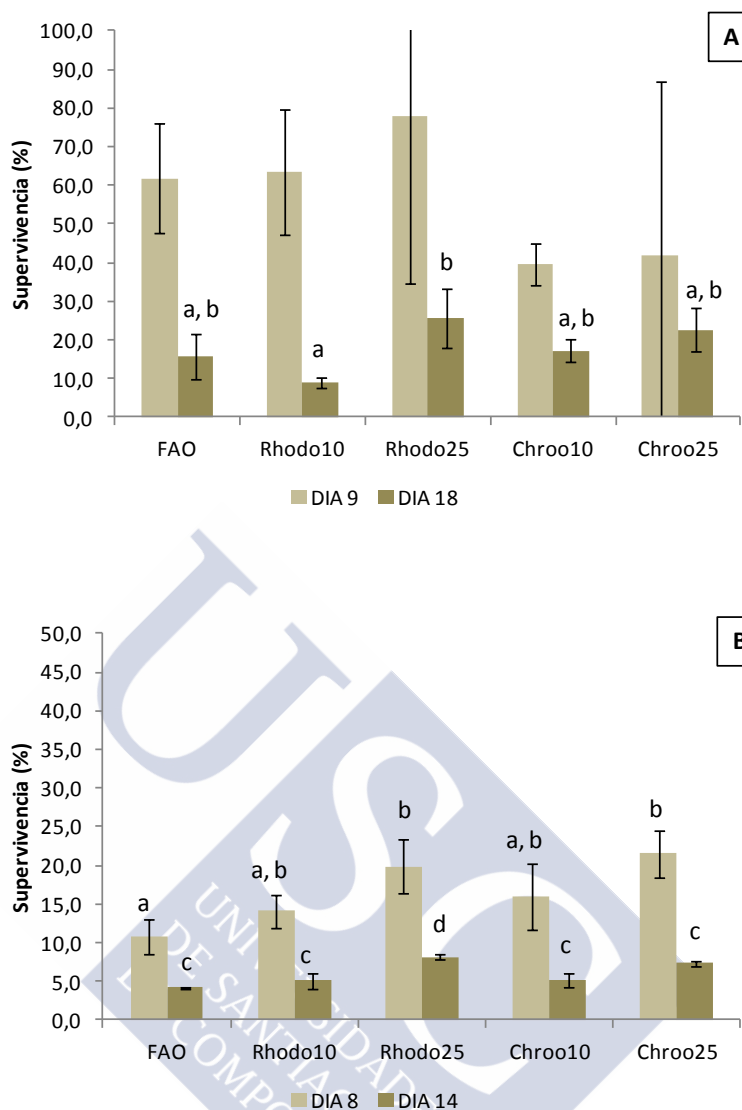


Figura 47 - Supervivencia larvaria de *R. philippinarum* en los dos ensayos realizados (A – Abril 2013, 18 larvas.mL<sup>-1</sup>; B – Mayo 2013, 10 larvas.mL<sup>-1</sup>) alimentadas con diferentes dietas (FAO – *I. galbana*; *T. suecica*; *Chaetoceros* sp.; Rhodo10 – sustitución 10% peso de FAO con *R. lens*; Rhodo 25 - sustitución 25% peso de FAO con *R. lens*; Chroo10% - sustitución 10% peso de FAO con *C. placoidea*; Chroo25% - sustitución 25% peso de FAO con *C. placoidea*) (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).



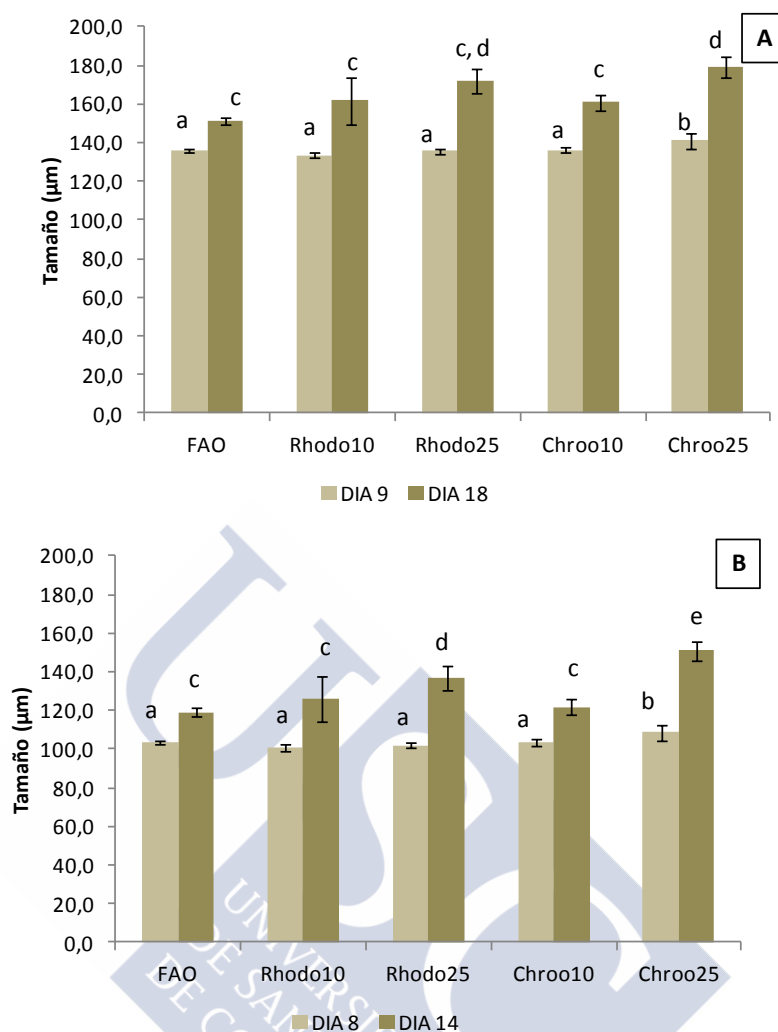


Figura 48 – Crecimiento larval de *R. philippinarum* en los dos ensayos realizados (A – Abril 2013, 18 larvas.mL<sup>-1</sup>; B – Mayo 2013, 10 larvas.mL<sup>-1</sup>) alimentadas con diferentes dietas (FAO – *I. galbana*; *T. suecica*; *Chaetoceros* sp.; Rhodo10 – sustitución 10% peso de FAO con *R. lens*; Rhodo 25 - sustitución 25% peso de FAO con *R. lens*; Chroo10% - sustitución 10% peso de FAO con *C. placoidea*; Chroo25% - sustitución 25% peso de FAO con *C. placoidea*) (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).

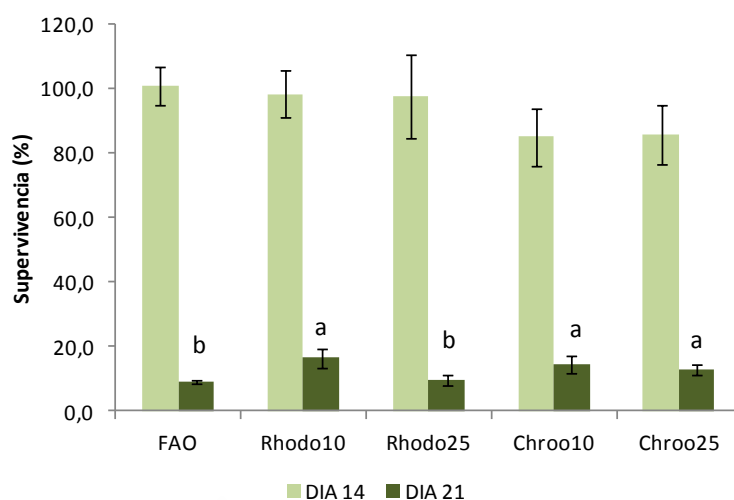


Figura 49 – Supervivencia larvario de *C. gigas* en el ensayo realizado en Junio de 2013, con densidad inicial de 14 larvas.mL<sup>-1</sup>, alimentadas con diferentes dietas (FAO – *I. galbana*; *T. suecica*; *Chaetoceros* sp.; Rhodo10 – sustitución 10% peso de FAO con *R. lens*; Rhodo 25 - sustitución 25% peso de FAO con *R. lens*; Chroo10% - sustitución 10% peso de FAO con *C. placoidea*; Chroo25% - sustitución 25% peso de FAO con *C. placoidea*) (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).

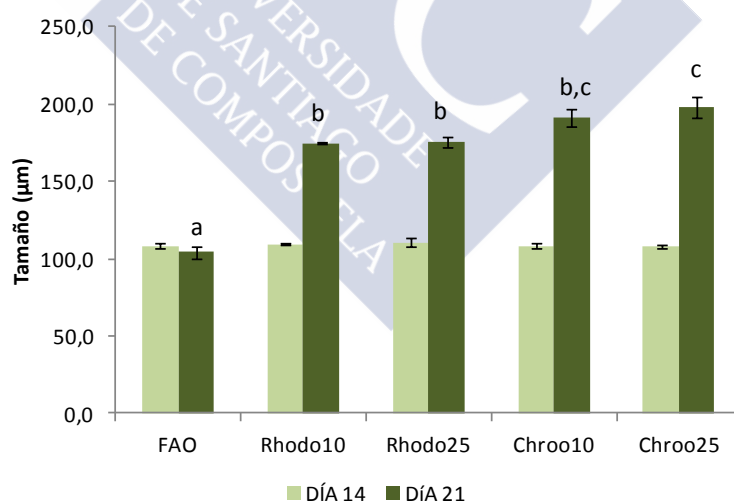


Figura 50 - Crecimiento larval de *C. gigas* al largo de los días del ensayo realizado (14 larvas.mL<sup>-1</sup>, Junio 2013) alimentadas con diferentes dietas (FAO – *I. galbana*; *T. suecica*; *Chaetoceros* sp.; Rhodo10 – sustitución 10% peso de FAO con *R. lens*; Rhodo 25 - sustitución 25% peso de FAO con *R. lens*; Chroo10% - sustitución 10% peso de FAO con *C. placoidea*; Chroo25% - sustitución 25% peso de FAO con *C. placoidea*) (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA seguido de Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones (P<0,05).

Las criptófitas están descritas como alimento de elevado valor nutricional para animales filtradores por su proteína de elevada calidad y elevada proporción de PUFAs (Dunstan *et al.*, 2005; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Zhukova y Aizdaicher, 1995). Con la inclusión de las criptófitas en la dieta base FAO, que incluye tres microalgas comúnmente utilizadas en acuicultura (*I. galbana*; *T. suecica*; *Chaetoceros* sp.) fue posible incrementar y mejorar la calidad del contenido proteico y incrementar el contenido de PUFAs. Además debe destacarse la presencia del ácido graso DPA en las dietas Chroo, descrito juntamente con el ARA, como potencialmente significativo en el crecimiento y supervivencia larvaria y post-larvaria de bivalvos (Pernet *et al.*, 2005; Milke *et al.*, 2008).

A la hora de elegir las microalgas para alimentar las larvas de bivalvos se deben tener en cuenta algunas características de las células, ya referidas anteriormente, como la movilidad celular (Martínez-Fernández *et al.*, 2004), tamaño (Baldwin, 1995; Baldwin y Newell, 1995), toxicidad (Laabir *et al.*, 2007) y la habilidad de la larva para capturar, ingerir, digerir y asimilar el alga (Lora-Vilchis y Maeda-Martinez, 1997). Baldwin (1995), sugiere la alimentación selectiva de larvas de *C. virginica*, que ingieren hasta tres veces más microalgas con menor relación C:N que microalgas con relación C:N elevadas. Algunos autores (Shumway *et al.*, 1985; Loret *et al.*, 2000; Fernández-Reiriz *et al.*, 2015) han descrito la alimentación selectiva de los bivalvos con preferencia por las criptófitas. Las criptófitas utilizadas en la alimentación larvaria presentan una relación C:N, de alrededor de 5,8, ligeramente inferior a la relación C:N de *T. suecica* (6,3) y marcadamente más baja que *I. galbana* y *Chaetoceros* sp. (9 y 10, respectivamente), evidenciando el potencial de utilización de las criptófitas en la alimentación larvaria de bivalvos, que se ve potenciada por la aplicación de TR elevadas, que generan bajas relaciones C:N. La mayor supervivencia y crecimiento obtenidos en los cultivos donde se incluyeron las criptófitas, principalmente con la mayor tasa de inclusión (25%), puede haber resultado en el consumo preferencial de los moluscos bivalvos por estas microalgas que presentan una baja relación C:N y elevado valor nutritivo como se ha discutido anteriormente.

Otro de los parámetros que pueden haber originado la mejor evolución de los cultivos larvarios en cuanto a supervivencia y crecimiento es el incremento de peso orgánico proporcionado en las dietas con criptófitas. La inclusión de las criptófitas produjo pequeñas

variaciones en el contenido lipídico, proteico y de carbohidratos en la dieta, sin embargo con su inclusión se incrementó la fracción orgánica de un 69,2% en la dieta FAO hasta un 76,2%, para la sustitución de un 25% de la dieta con *R. lens*. La inclusión de las criptófitas en la dieta mantuvo la proporción de lípidos en la dieta ante la dieta control FAO, sin embargo proporcionó una mejor calidad en el contenido de lípidos a la dieta debido a su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados. Además del EPA, presente en cantidades importantes en ambas criptófitas y del DHA en elevadas cantidades en *R. lens*, ambos esenciales para el desarrollo y crecimiento larvario de bivalvos (Langdon y Waldock, 1981; Webb y Chu, 1981), también se detectó el ácido graso docosapentanoico (22:5n6, DPA) en *C. placoides*, que a pesar de poco estudiado, al igual que el ácido graso araquidónico (20:4n6, ARA), está identificado como potencialmente importante en el crecimiento y supervivencia larvaria (Pernet *et al.*, 2005) y post-larvaria (Milke *et al.*, 2008). Se ha descrito que *R. philippinarum* no tiene un requerimiento esencial de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la dieta, ya que es capaz de sintetizarlos a partir de ácidos grasos de cadena corta (C<sub>18</sub>) presentes en la dieta, especialmente cuando se incluyen las criptófitas. Por el contrario, se ha descrito la capacidad limitada de elongación y desaturación de los ácidos grasos de la dieta en juveniles de *C. gigas*, en la que se ha demostrado que el EPA y DHA son esenciales para el desarrollo y crecimiento (Langdon y Waldock, 1981). Debido a que la inclusión de las dos especies de criptófitas incrementó la diversidad y calidad del perfil de ácidos grasos en la dieta, este factor podría justificar también en parte la mejor supervivencia y crecimiento larvarios obtenidos.

Tal y como se observa en la descripción de las dietas, el contenido proteico de las criptófitas es sustancialmente superior que en las microalgas convencionales utilizadas en la dieta control (FAO), aunque su inclusión en la dieta no resultó en un incremento importante de la proporción proteica general en las dietas. Las proteínas son una fuente de energía importante para el crecimiento y desarrollo larvario principalmente en los últimos estadios larvales y metamorfosis. Aunque no se haya incrementado la proporción de proteínas en la dieta con la inclusión de las criptófitas, estas se caracterizan por su contenido proteico de elevada calidad (Dunstan *et al.*, 2005). La proporción de aminoácidos encontrada en las criptófitas por Dunstan *et al.* (2005) es similar a la descrita en larvas de ostra (Brown, 1991), sugiriendo el elevado valor de la proteína en las criptófitas. Además, Seixas *et al.* (2009)

evidenció mayor contenido de aminoácidos en *R. lens* frente a la microalga *T. suecica*. Asimismo, debido que el mayor efecto de la calidad de la proteína es más importante en la fase final del estadio larvario (Bartlett, 1979; Rodríguez *et al.*, 1990), la diferencia en las supervivencias de *C. gigas* y *R. philippinarum*, son mayores en el último día, resultando en un mayor crecimiento y supervivencia de las larvas cuando se incluyeron las criptófitas en la dieta.

El bajo contenido de carbohidratos de las criptófitas utilizadas tampoco generó variaciones significativas en la dieta, manteniéndose el contenido de carbohidratos similar en las 5 dietas probadas. Los carbohidratos pueden desempeñar un papel importante en la dieta de larvas de bivalvos equilibrando la utilización de las proteínas y lípidos para la biosíntesis y la producción de energía (Whyte *et al.*, 1992). En este trabajo no se ha estudiado el papel de los carbohidratos en la dieta, pero Leonardos y Lucas (2000) describieron la importancia de los carbohidratos y proteínas de la criptófita *Rhodomonas reticulata*, concurrentemente con algunos de los ácidos grasos, para determinar el valor nutricional de la microalga para *Mytilus edulis*.

Se ha demostrado que las criptófitas constituyen un excelente alimento para copépodos, resultando en una mayor producción de huevos, en particular cuando se alimentan con *Rhodomonas salina* (Knuckey *et al.*, 2005; Milione and Zeng, 2007; Dahl *et al.*, 2009). No obstante, también las criptófitas *R. reticulata* y *R. baltica* (Zhang *et al.*, 2013) han resultado en una mayor producción de huevos en estas especies. Las criptófitas demostraron también resultados interesantes en la alimentación de larvas de erizo (Rogers-Bennet *et al.*, 1994), gasterópodos (Aldana-Aranda y Patiño-Suárez, 1998) y camarones peneidos (Støttrup y McEvoy, 2003). El elevado contenido proteico de la criptófita *R. lens* resultó en un mayor crecimiento de *Artemia* frente a las microalgas comúnmente utilizadas en acuicultura, además proporcionó un mejor contenido de ácidos grasos EPA y DHA en el perfil bioquímico de la *Artemia* (Seixas *et al.*, 2008, 2009).

Ha sido referenciada la ingestión preferencial de algunas criptófitas como *Rhodomonas salina*, *Leucocryptos* sp. y *R. lens* en la alimentación de adultos de moluscos bivalvos como *Arctica islandica* (L.), *Crassostrea gigas* (Gmelin), *Ensis directus* Conrad, *Mya arenaria* Linne, *Ostrea edulis* L., *Placopecten magellanicus* (Gmelin) (Shumway, *et al.*, 1985),

*Pinctada margaritifera* (Loret *et al.* 2000), *Mytilus trossulus* (Levington *et al.*, 2002) y *Mytilus galloprovincialis* (Fernández-Reiriz *et al.*, 2015). *R. salina* ha sido utilizada rutinariamente debido a su elevado valor nutricional en el cultivo de juveniles de *O. edulis* (Enright *et al.*, 1986) y *C. gigas* (Brown *et al.*, 1998; McCausland *et al.*, 1999; Dunstan *et al.*, 2005). El potencial de *R. salina* ha sido demostrado ya que su adición a la dieta *standard* mejoró la metamorfosis y las condiciones generales en *P. maximus* (Tremblay *et al.*, 2007; Gagné *et al.*, 2010), produciendo mayores tasas de crecimiento en juveniles de *C. gigas*. Sin embargo la utilización de las criptófitas ha estado limitada a *R. salina* hasta al momento, existiendo pocos estudios con otras especies. El valor nutricional de la criptófita *R. reticulata* fue demostrado para las larvas de *M. edulis* (Leonardos y Lucas, 2000) y la inclusión de *R. lens* en la dieta incrementó la supervivencia y crecimiento larvario de *R. philippinarum* (Nascimento, 2010), estando descrita como un excelente alimento también para *M. galloprovincialis* al proporcionar elevadas tasas de ingestión y absorción.

Sin embargo, Dunstan *et al.* (2005), obtuvo el peor crecimiento larvario de *C. gigas* con la dieta monoalgal con *C. placoidea*, justificando el resultado con la ausencia de DHA en el perfil de ácidos grasos y sugiriendo la insignificancia del DPA para el crecimiento de *C. gigas*. Su resultado es contradictorio con respecto a los obtenidos en este trabajo, ya que el mayor crecimiento se obtuvo con la dieta donde se incluyó *C. placoidea*, sin embargo, las mayores supervivencias se obtuvieron con las dietas con *R. lens*. No obstante, los malos resultados obtenidos por Dunstan *et al.* (2005) con la criptófita *C. placoidea* se pueden deber a una subvaloración de su composición bioquímica debido a la baja tasa de renovación aplicada a los cultivos microalgales, entre 10 y 20%, asemejándose a un cultivo *batch*, además de la utilización del medio fE, similar al medio f2, ya demostrado limitante para el crecimiento de las criptófitas (Coutinho, 2008). Es posible que el marcado efecto positivo obtenido en nuestros cultivos de *C. gigas* con la adición de *C. placoidea* sea en parte consecuencia de las deficiencias en la *I. galbana* utilizada en la dieta control de ese experimento.

Asimismo, en general los resultados obtenidos corroboran con los obtenidos con otros autores demostrando el potencial de la inclusión de las criptófitas en el desarrollo, crecimiento y metamorfosis de larvas de bivalvos.

A pesar de haber sido descritas como difíciles de cultivar (Renaud *et al.*, 1999; Knuckey *et al.*, 2005) en este trabajo se mostró la viabilidad de producción masiva de las criptófitas en sistemas semicontinuos con la aplicación de elevadas tasas de renovación, confirmando los resultados obtenidos por Coutinho (2008), Seixas *et al.* (2008, 2009) y Freire (2015) obteniéndose productividades competitivas en comparación con los cultivos de microalgas comúnmente utilizadas en acuicultura.

A pesar de que la introducción de las criptófitas resultó, en general, en una mayor supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos, en algunos casos, en particular para la menor tasa de inclusión, su efecto es poco pronunciado frente a los resultados obtenidos con la dieta control FAO. La menor inclusión de las criptófitas en la dieta, 10% del peso seco, presentó pequeñas diferencias en la composición bioquímica de la dieta, que resultaron sin embargo en diferencias en la supervivencia y crecimiento larvario de *R. philippinarum*. No obstante, con la mayor tasa de inclusión de las criptófitas en la dieta, estas pesaron un 25% del peso total, que se tradujo en una sustancial mejora en la composición bioquímica de la dieta, incrementando la supervivencia y crecimiento larvario en *R. philippinarum*, teniendo un efecto positivo igualmente en el crecimiento de *C. gigas*. Ambas criptófitas presentaron, en general, un efecto similar en la supervivencia, sin embargo, *C. placoides* proporcionó un crecimiento larvario significativamente superior, en particular con su mayor inclusión, enfatizando su diferente composición ácidos grasos con la inclusión del DPA en la dieta, ya descrito como potencialmente importante en cultivo de moluscos bivalvos (Pernet *et al.*, 2005; Milke *et al.* 2008).

Además, la inclusión de las criptófitas resultó en un mayor aporte de proteína a las larvas, referenciada como de alta calidad (Dunstan *et al.*, 2005; Zhukova y Aizdaicher, 1995; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989) y de PUFAs, como los ácidos grasos esenciales EPA y DHA con *R. lens*, y el EPA y DPA con *C. placoides*, y los de cadena corta 18:3n3 y 18:4n3, precursores en la biosíntesis del EPA y DHA.

Con este trabajo se confirmó el valor nutricional de *R. lens* y se demostró el potencial de la utilización de *C. placoides* en el cultivo larvario de moluscos bivalvos.



Tabla 9 -de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos (incluso el presente capítulo) de las Cryptophyceae *R. lens* y *C. placoidea*.

Steady state	<i>R. lens</i> 30% LL*	<i>R. lens</i> 30% HL**	<i>R. lens</i> 30% HHL***	<i>R. lens</i> 40% HHL****	<i>C. placoidea</i> 30% LL*	<i>C. placoidea</i> 30% HL**	<i>C. placoidea</i> 30% HHL***	<i>C. placoidea</i> 40% HHL****
Densidad celular (x10 <sup>6</sup> cél.mL <sup>-1</sup> )	11,94±1,00	13,6±0,58	15,57±0,9	16,45±1,77	11,62±0,51	12,14±0,81	13,63±0,6	18,93±2,07
Productividad (mg.L <sup>-1</sup> .día <sup>-1</sup> )	300,25±1,89	384,25±48,40	562,6±29,89	562,67±43,37	276,5±10,88	339±15,39	462,6±1,8	496,67±0,94
Peso celular (pg/célula <sup>-1</sup> )	83,81±0,53	94,18±11,86	120,43±6,4	102,5±21,69	79,34±3,12	93,1±4,23	113,17±0,44	65,61±0,12
Relación C:N	4,88±0,02	5,08±0,06	5,51±0,09	5,82±0,07	5,53±0,06	5,61±0,05	5,65±0,05	5,99±0,07
Proteína (% peso seco)	59,31±2,12	57,48±0,89	50,28±0,15	45,97±3,99	46,90±4,02	52,45±5,45	47,7±1,13	46,45±0,50
Lípidos (% peso seco)	-	15,8±2,4	20,9±0,6	31,5±1,8	-	17,8±2,6	23,8±3,0	28,3±6,2
Carbohidratos (% peso seco)	-	8,78±2,83	23,32±0,84	14,73±2,48	-	11,3±1,37	25,1±0,89	22,52±9,88
Otros	-	13,0	5,5	7,8	-	17,5	3,4	2,7
Ácidos grasos								
Saturados	29,35 ± 0,45 <sup>a</sup>	31,78 ± 1,42	29,85 ± 1,21	22,73 ± 0,89	33,34 ± 6,09	37,42 ± 4,0	28,02 ± 0,93	25,08 ± 2,5
Monoinsaturados	6,19 ± 0,35	5,93 ± 0,70	12,19 ± 1,64	7,0 ± 3,4	5,57 ± 2,02	4,09 ,35	7,87 ± 0,38	8,12 ± 1,51
Poliinsaturados	64,46 ± 0,80	62,30 ± 1,61	57,97 ± 0,45	73,08 ± 2,77	61,09 ± 4,82	58,49 ± 3,68	64,11 ± 1,08	66,80 ± 1,56

\* Criptófitas cultivadas en el capítulo 1 (sección 1.1.), en sistema semi-continuo con TR30% y con intensidad luminosa reducida, LL - 73,4 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>

\*\* Criptófitas cultivadas en el capítulo 1 (sección 1.2.), en sistema semi-continuo con TR30% y con intensidad luminosa elevada, HL - 147,0 μmol photon.m<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, utilizadas en la alimentación de *B. plicatilis* (ensayo A).

\*\*\* Criptófitas cultivadas en el capítulo 1 (sección 1.3.), en sistema semi-continuo con TR30% y con intensidad luminosa 228,7 μmol photon.m<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> utilizadas en la alimentación de *B. plicatilis* (ensayo B).

\*\*\*\* Criptófitas cultivadas en el presente capítulo, en sistema semicontinuo con TR40% y con intensidad luminosa 228,7 μmol photon.m<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> utilizadas en la alimentación de *R. philippinarum* y *C. gigas*.





## **Conclusiones**



### Conclusiones generales

1. Con este trabajo se ha demostrado la importancia de la utilización de sistemas semicontinuos con elevadas tasas de renovación para la obtención de biomasa microalgal de alta calidad, permitiendo incrementar la supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos, tal y como ya había sido observado en otros animales filtradores.

2. De entre las especies estudiadas, se enfatiza el potencial de la criptófita *Chroomonas placoidea* para su utilización en acuicultura, ya que presentó excelentes resultados no solo para la mejora de la supervivencia en el cultivo larvario de moluscos bivalvos, sino también para el cultivo del rotífero *B. plicatilis*.

### Conclusiones particulares

1. El sistema de cultivo semicontinuo originó una marcada mejora en el perfil bioquímico de las criptófitas *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea* con respecto a los obtenidos en fase estacionaria de cultivos discontinuos. Estas especies demostraron ser más robustas, con elevadas productividades y mejor perfil bioquímico, presentando el mayor contenido proteico y de PUFAs. A pesar de la mayor sensibilidad demostrada por *Rhinomonas reticulata* y *Rhodomonas salina*, fue posible mantenerlas en cultivo semicontinuo con una tasa de renovación intermedia, no obstante su composición bioquímica no mejoró con el sistema semicontinuo.

2. Una elevada irradiancia ( $147 \mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) resultó en una mayor productividad en peso en las criptófitas *R. lens* y *C. placoidea*, debido a un mayor peso celular de las microalgas en comparación con irradiancias menores ( $73 \mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Como era de esperar, la menor irradiancia resultó en un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados, asociados a lípidos estructurales, y de pigmentos accesorios, en este caso ficobiliproteínas. Los resultados permiten descartar que estas dos especies se encuentren estresadas en la

irradiancia más elevada utilizada, sin embargo, la pequeña diferencia en número de células y perfil bioquímico obtenido al duplicar la luz incidente indicaría que la máxima irradiancia utilizada se encuentra próxima al punto de saturación.

3. *R. lens* y *C. placoidea* presentaron elevadas productividades en cultivo semicontinuo, similares a las obtenidas por la eustigmatófita *Nannochloropsis gaditana*. El perfil bioquímico de las criptófitas se destaca por su elevado contenido proteico y de PUFAs, en particular los C<sub>18</sub>. El mayor contenido de EPA se observó en *N. gaditana*, sin embargo, a pesar de menor contenido de este ácido graso en las criptófitas, éstas presentan mayor variedad de PUFAs, incluyéndose el DHA y DPA en *R. lens* y *C. placoidea*, respectivamente.

4. Las criptófitas *C. placoidea* y *R. lens* demostraron ser un óptimo alimento para rotíferos, originando tasas de crecimiento similares o mejores que cuando se utiliza *N. gaditana*, además de generar un excelente perfil de ácidos grasos en el rotífero. Los resultados demuestran la mayor eficiencia de las criptófitas como alimento, que resultó también en un mayor peso de los rotíferos alimentados con *R. lens* y *C. placoidea*, debido a una menor FCR.

5. En los cultivos semicontinuos de las microalgas *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros* sp., la aplicación de una elevada tasa de renovación diaria (40%) incrementó la productividad de los cultivos en comparación con una tasa de renovación del 10%, produciéndose perfiles bioquímicos marcadamente diferentes en *T. suecica*. La saturación del medio con nitrógeno resultó en ligeras diferencias en el perfil bioquímico de *I. galbana* y *Chaetoceros* sp. con las dos tasas de renovación. No obstante, en la dieta obtenida de cultivos mantenidos con una tasa de renovación diaria del 40% (FAO40%) se incrementó el contenido de proteína y PUFAs, además de una disminución de la carga bacteriana aportada a los cultivos larvarios de moluscos bivalvos en comparación con la dieta obtenida con tasa de renovación 10% (FAO10%).

6. Cuando se alimentaron larvas de los moluscos bivalvos *Ostrea edulis*, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Ruditapes philippinarum* con una dieta compuesta por las microalgas *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros* sp. (dieta FAO), producidas en cultivo semicontinuo con 2 tasas de renovación diaria diferentes, 10 y 40% del

volumen del cultivo, las mejores supervivencias se obtuvieron con la dieta FAO40% en todos los casos, a pesar de que esta dieta proporciona una menor ración en peso que la dieta FAO10%. El estudio del efecto de la población bacteriana acompañante, que se valoró mediante la adición de cloranfenicol junto con la dieta, demostró que la carga bacteriana aportada con la dieta es también un factor limitante para la supervivencia larvaria de bivalvos en casi todas las especies probadas. En algunos casos el efecto beneficioso de la adición de cloranfenicol sobre la supervivencia fue solo patente sobre la dieta FAO40%, indicando que los requerimientos nutritivos de las larvas deben ser cubiertos antes de poder detectar el efecto del antibiótico. Por otro lado, el perfil bioquímico de la dieta es el factor principal que controla el crecimiento larvario.

7. *R. lens* y *C. placoidea* presentaron elevadas productividades en cultivo semicontinuo, siendo superiores o similares a las obtenidas por las especies comúnmente utilizadas para la alimentación de larvas de bivalvos, *I. galbana*, *T. suecica* y *Chaetoceros* sp., demostrando la viabilidad de su producción en cultivos semicontinuos. Las criptófitas presentan un valor nutritivo superior debido a su mayor contenido proteico y de PUFAs, en particular los C<sub>18</sub> y DHA y/o DPA.

8. La inclusión de las criptófitas *R. lens* o *C. placoidea* (25% en peso) en la dieta resultó en un incremento de la supervivencia y crecimiento larvario en *Ruditapes philippinarum* en comparación con la dieta FAO. En *Crassostrea gigas*, los mejores resultados se obtuvieron cuando estas especies se incluyeron en un porcentaje menor (10%). *C. placoidea* generó un crecimiento larvario superior en las dos especies de moluscos estudiadas, en particular con la mayor tasa de inclusión (25%), lo que podría derivar en parte de su diferente composición de ácidos grasos.





## **Resumen**





Los moluscos bivalvos son un grupo de elevado valor económico e importancia comercial, alcanzando 13 millones de toneladas producidas mundialmente en 2012 mediante técnicas de acuicultura. España es el mayor productor de moluscos bivalvos de la UE, suponiendo casi 165 mil toneladas, en 2013. Sin embargo, el valor de la producción de moluscos de acuicultura en España representa poco más de la mitad del alcanzado por Italia y Francia, debido al menor valor de mercado del mejillón, que representa un 80% de la producción acuícola nacional. En el cultivo de moluscos bivalvos en España se destaca también el cultivo de la ostra, que incluye la ostra plana (*Ostrea edulis*) y la ostra rizada (*Crassostrea gigas*), y de la almeja, que incluye la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja babosa (*Venerupis pullastra*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), en todos los casos de mayor valor comercial que el mejillón. No obstante, el cultivo de ostra es dependiente en gran medida de la importación de semilla para la siembra procedente de diversos países vecinos, al igual que el cultivo de almeja, ya que la semilla procedente de las poblaciones naturales es insuficiente para mantener los niveles de producción óptimos (Matias *et al.*, 2009; Ojea *et al.*, 2008). La producción en criadero de semillas de estas especies es claramente insuficiente, estando en parte limitada a la disponibilidad de alimento microalgal, que constituye todavía la única dieta adecuada para el cultivo de los moluscos bivalvos durante todo su ciclo de vida (Muller-Feuga, 2000). La producción de microalgas todavía es considerada como el cuello de botella para el desarrollo del cultivo de moluscos en criadero debido a las bajas productividades y elevados costes de producción derivados de los sistemas de cultivo altamente ineficientes usados en la mayoría de las instalaciones de acuicultura, alcanzando un 30-40% de los costes de explotación de los criaderos (Müller-Feuga, 2000; Borowitzka, 1997; Duerr *et al.*, 1998; Wikfors y Ono, 2001, Helm y Bourne, 2004). Sin embargo, la producción de microalgas en los criaderos de bivalvos puede ser mejorada gracias a la transferencia de las metodologías desarrolladas en el campo de la biotecnología microalgal en las últimas décadas, basada en la utilización de fotobiorreactores altamente controlados y la aplicación de técnicas de cultivo continuo. Los cultivos *batch* utilizados en la mayor parte de los criaderos son poco productivos y no permiten el control de la calidad nutritiva de la biomasa microalgal. Además del problema de la mejora de las condiciones de cultivo, otra limitación deriva del número reducido de especies cultivadas en criadero, no superando las 5-6 especies, y en la mayor parte de los casos limitándose a mezclas de las 3-4 especies aconsejadas por la FAO (Helm *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las microalgas

del grupo Cryptophyceae complementan nutricionalmente a las especies clásicas y han producido excelentes resultados en el cultivo de animales filtradores como copépodos (Milione y Zeng, 2007; Dahl *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013), *Artemia* (Thinh *et al.*, 1999; Seixas *et al.*, 2008; 2009) y en el cultivo larvario y juveniles de algunos moluscos bivalvos (Mccausland *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 2007; Gagné *et al.*, 2010; Nascimento, 2010). Sin embargo, la utilización de este grupo de microalgas en acuicultura es todavía limitada debido a la dificultad de cultivo de las especies de este grupo (Renaud *et al.*, 1999; Knuckey *et al.*, 2005), no obstante algunos autores han demostrado recientemente que es posible mantener cultivos concentrados de *Rhodomonas lens* con elevadas productividades en sistema continuo (Coutinho, 2008; Seixas *et al.*, 2008; 2009; Freire, 2015).

El principal objetivo del presente trabajo fue la mejora de cultivos larvarios de moluscos bivalvos a través de la mejora de la composición bioquímica de la dieta. Para ello se exploró el efecto de la aplicación de técnicas de cultivo continuo en las especies microalgales clásicas utilizadas en el cultivo larvario de moluscos para la mejora de su perfil nutricional y se evaluaron los efectos de la introducción de especies de criptófitas en la dieta. La aplicación de cultivos continuos en los que la biomasa microalgal posee un perfil nutricional estable y optimizado incrementa la robustez de estos estudios comparativos.

En el primer lugar, y con el objetivo de seleccionar las especies de criptófitas más adecuadas para su utilización en el cultivo de moluscos, tanto por su perfil nutricional como por su facilidad de cultivo, se llevó a cabo una evaluación de especies pertenecientes al grupo Cryptophyceae en tres trabajos diferentes. En una primera fase se comparó el crecimiento y composición bioquímica de cuatro especies de criptófitas: *Rhinomonas reticulata*, *Rhodomonas salina*, *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea*. Las microalgas se cultivaron en mini-fotobiorreactores de 80 mL, con nutrientes ajustados a 8mM de NaNO<sub>3</sub> y 147  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en sistema semicontinuo con tasa de renovación diaria de un 30% hasta estabilización del cultivo. *R. lens* presentó la mayor productividad alcanzando 384  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , frente a los 339, 281 y 170  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  obtenidos por *C. placoidea*, *R. salina* y *R. reticulata*, respectivamente. El mayor contenido de proteínas en la fase de estabilización de los cultivos semicontinuos se observó en *R. lens* con un 58% del peso seco, mientras que *R. salina*, *C. placoidea* y *R. reticulata* presentaron un 48 y 47% y 39% respectivamente. El

contenido de carbohidratos fue similar en *R. lens* y *R. reticulata*, representando un 9%, mientras que en *C. placoidea* y *R. salina* representó un 11 y 13%, respectivamente. El mayor contenido lipídico se detectó en *R. reticulata* con un 48%, seguida de *R. salina* (23%), *C. placoidea* (18%) y *R. lens* (16%). Como era de esperar, el perfil de ácidos grasos mejoró al pasar a un sistema semicontinuo en *R. lens* y *C. placoidea*, incrementándose el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, sin embargo se observó un efecto contrario en *R. reticulata* y *R. salina* que corroboraron los signos de estrés detectados en otros componentes bioquímicos para estas dos especies. El mayor contenido de PUFAs se detectó en *R. lens* (62%) seguida de *C. placoidea* (58%), representando solamente un 45% y un 33% en *R. salina* y *R. reticulata*, respectivamente. A la diferencia de las microalgas rojas del grupo, *C. placoidea* no presenta DHA, estando presente el DPA. Las microalgas *R. lens* y *C. placoidea* demostraron ser las más robustas, con elevadas productividades y mejor perfil bioquímico en sistemas semicontinuo.

En una segunda parte, con el propósito de verificar el rango óptimo de irradiancia y verificar la mayor sensibilidad a alta intensidad de luz propuesta para las criptófitas, se estudió la influencia de la luz en el crecimiento y composición bioquímica de las microalgas *R. lens* y *C. placoidea*, especies que produjeron los mejores resultados previos en el cultivo semicontinuo. Se utilizaron dos irradiancias: 74 y 147  $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La disminución de la irradiancia solamente resultó en una disminución ligera, aunque significativa, de la densidad celular en *R. lens*, que bajó de 13,6 hasta  $11,9 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$  (Test-t,  $p < 0,05$ ). A pesar de no tener efecto sobre la densidad celular de estabilización, la disminución de la irradiancia afectó a la productividad en peso de *C. placoidea*, observándose una disminución de 339 hasta 277  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  (Test-t,  $p < 0,05$ ), mientras que en *R. lens* disminuyó de 384 hasta 300  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ . La disminución de la irradiancia resultó en un ligero incremento en el contenido de proteínas hasta un 59 y un 52% en *R. lens* y *C. placoidea* respectivamente, observándose igualmente un ligero pero significativo incremento en el contenido de las ficobiliproteínas (Test-t,  $p < 0,05$ ). El contenido de PUFAs se incrementó en ambas especies con la disminución de la irradiancia alcanzando un 64 y 61%, mientras que los ácidos grasos saturados disminuyeron hasta un 29 y un 33%, en *R. lens* y *C. placoidea* respectivamente. A pesar de las pequeñas diferencias observadas en la densidad celular, la mayor irradiancia probada resultó en una mayor productividad celular debido a un mayor peso celular de las microalgas. Los resultados permiten descartar que estas dos especies se encuentren estresadas

en la irradiancia más elevada utilizada,  $147 \mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , sin embargo, la pequeña diferencia en número de células y perfil bioquímico obtenido al duplicar la luz incidente indicaría que la máxima irradiancia utilizada se encuentra próxima al punto de saturación.

En vista de los resultados obtenidos en condiciones de producción controlada que simulan la producción a gran escala, que permitieron la selección de *R. lens* y *C. placoidea* como las de mayor potencial por su robustez, productividad y perfil bioquímico, se abordó el estudio sobre el valor nutricional de estas dos especies utilizando en primer lugar como modelo el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*, comparando ambas especies con *Nannochloropsis gaditana*, comúnmente utilizada en el cultivo del rotífero. Las microalgas se cultivaron en sistema semicontinuo con tasa de renovación de 30%, con nutrientes ajustados a 8mM de  $\text{NaNO}_3$  y una irradiancia de  $229 \mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Con esta mayor irradiancia la criptófita *R. lens* alcanzó la mayor productividad, con  $563 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ , seguida de *N. gaditana* ( $551 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ), siendo ambas significativamente superiores a los  $463 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  obtenidos por *C. placoidea* (Tuckey HSD,  $p < 0,05$ ). El contenido proteico fue superior en *R. lens* (50%), seguida de *C. placoidea* (48%) y *N. gaditana* (41%), mientras que el contenido de carbohidratos fue similar en las tres, entre un 23 y 25%. El mayor contenido de lípidos se observó en *N. gaditana*, con un 30%, representando éstos un 23 y 21% en *C. placoidea* y *R. lens*, respectivamente. El perfil de ácidos grasos fue diferente en las diferentes microalgas, detectándose el mayor contenido de PUFAs en las criptófitas, alcanzando un 64 y 58% en *C. placoidea* y *R. lens*, respectivamente, marcadamente superiores que en *N. gaditana* (42%). Mientras que las criptófitas se caracterizaron por su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados  $\text{C}_{18}$ , *N. gaditana* alcanzó un 31% de EPA, que representó menos de un 10% en las criptófitas. El DHA solamente se detectó en *R. lens* (7%), el DPA en *C. placoidea* (5%) y el ARA en *N. gaditana* (7%). El mayor crecimiento de los rotíferos se obtuvo con *C. placoidea* alcanzando  $255 \text{ rotíferos.mL}^{-1}$ , densidad significativamente superior a la obtenida con *N. gaditana* ( $224 \text{ rotíferos.mL}^{-1}$ ) y *R. lens* ( $182 \text{ rotíferos.mL}^{-1}$ ) (Bonferroni multiple comparison test,  $p < 0,05$ ), justificado por el mayor número de huevos producidos diariamente. A pesar de que la ración en peso fue la misma con las diferentes dietas ( $400 \text{ ng.rotífero}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ), los rotíferos alcanzaron un mayor peso con *R. lens* ( $231 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ ), fruto de una menor FCR: 1,8 en comparación con las FCR obtenidas con *C. placoidea* 2,2 y *N. gaditana* 3,4. La

diferente composición bioquímica de la dieta no se reflejó en el contenido proteico de los rotíferos, que fue similar para las tres dietas (~58%). Sin embargo, el perfil de ácidos grasos de los rotíferos reflejó el diferente perfil de las microalgas, con el mayor contenido de PUFAs en los rotíferos mantenidos con *R. lens* (60%), seguida de *C. placoidea* (56%) y *N. gaditana* (42%). El EPA representó un 21% en los rotíferos alimentados con *N. gaditana*, más del doble del detectado cuando fueron alimentados con *R. lens* y *C. placoidea*. El 20:4n3 representó un 10% en los rotíferos alimentados con las criptófitas sugiriendo la elongación del 18:4n3 presente en ambas especies. Las criptófitas demostraron ser un óptimo alimento para el rotífero *B. plicatilis*, originando tasas de crecimiento similares o mejores que *N. gaditana*, además de un excelente perfil de ácidos grasos. Estos resultados demuestran la mayor eficiencia de las criptófitas como alimento, que resultó en un mayor peso de los rotíferos alimentados con *R. lens* y *C. placoidea*, justificado probablemente por el mayor contenido y digestibilidad de su proteína y su mejor relación C:N.

En la segunda parte de la tesis se ha trabajado en la mejora de los cultivos larvarios de los moluscos bivalvos de *O. edulis*, *V. pullastra*, *R. decussatus* y *R. philippinarum* a través de la mejora de la calidad de la dieta. Debido a que la aplicación de distintas tasas de renovación en los cultivos semicontinuos de microalgas afecta tanto a la composición bioquímica como a la carga bacteriana de los cultivos, se realizó un experimento que nos permitiese comprobar el efecto de este crucial parámetro de los cultivos continuos sobre el valor nutritivo de las microalgas para los moluscos. Para ello se realizaron cultivos continuos de las 3 especies de microalgas utilizadas más comúnmente en acuicultura de bivalvos y que han sido sugeridas como dieta óptima por la FAO: *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros* sp., (razón 1:1:1 de peso seco, Helm *et al.*, 2004), con 2 tasas de renovación distintas: 10 y 40% (Dietas FAO10% y FAO40% respectivamente). Las dietas se evaluaron con y sin adición del antibiótico cloranfenicol ( $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ ), con el objetivo de discernir la importancia relativa de la composición nutricional y la flora bacteriana acompañante. Los cultivos semicontinuos con mayor tasa de renovación resultaron en una mayor productividad volumétrica en peso. El perfil bioquímico de *T. suecica* presentó marcadas diferencias en el contenido proteico, lipídico y de carbohidratos con la aplicación de diferentes tasas de renovación, sin embargo en *I. galbana* y *Chaetoceros* sp. se observaron pequeñas diferencias entre las dos tasas de renovación, ya que todos los cultivos resultaron estar saturados de nitrógeno. No obstante, las



dietas FAO10% y FAO40% presentaron diferencias en su contenido proteico (23 y 32%, respectivamente) y contenido en carbohidratos (27 y 14%, respectivamente), mientras que el contenido de lípidos fue similar en ambas (25% del peso de la dieta). El peso del alimento suministrado a las larvas fue marcadamente inferior en la dieta FAO40%, fruto del menor peso de las células de la tasa de renovación del 40%. El contenido de PUFAs incrementó de un 33 hasta 45%, debido a un ligero incremento del EPA (14 a 16%), del 16:4n3 (1 a 5%) y del 18:3n3 (2 a 6%) en FAO10% y FAO40%, respectivamente. Las mejores supervivencias se obtuvieron con la dieta FAO40% en todos los casos a pesar de que esta dieta proporciona una menor ración en peso que la dieta FAO10%. La adición de cloranfenicol mejoró sustancialmente la supervivencia larvaria en *R. decussatus*, *V. pullastra* y *R. philippinarum*, mientras que no se encontró efecto de la adición de antibiótico en el único experimento realizado con *O. edulis*. En el caso de *V. pullastra* y *R. philippinarum* el efecto beneficioso de la adición de cloranfenicol fue solo patente sobre la dieta FAO40%, indicando que los requerimientos nutritivos de las larvas deben ser cubiertos antes de poder detectar el efecto del antibiótico. El mayor crecimiento larvario se obtuvo en las larvas alimentadas con FAO40%, no notándose en general efecto significativo de la adición de antibiótico sobre el crecimiento larvario. Tanto la composición nutricional de los cultivos de microalgas como la carga bacteriana aportada con la dieta resultaron por lo tanto ser factores limitantes para la supervivencia larvaria de bivalvos, aunque se detectaron distintas sensibilidades dependiendo de la especie, mientras que el perfil bioquímico de la dieta es el que controla el crecimiento larvario. Aunque los resultados indican que el efecto de la composición nutricional del cultivo sobre la supervivencia larvaria hasta metamorfosis es, en algunos casos, de menor relevancia que el efecto de la carga bacteriana, es necesario destacar que la variabilidad bioquímica generada en la dieta microalgal al aplicar las dos tasas de renovación es mucho menor que la obtenida en otros experimentos en los que los cultivos se encontraban limitados por nitrógeno en los cultivos de baja tasa de renovación.

Finalmente, se incluyeron las criptófitas *Rhodomonas lens* y *Chroomonas placoidea*, que presentaron el mejor crecimiento y demostraron su potencial en el cultivo de *B. plicatilis* en experimentos previos, en las dietas de larvas de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) y ostra rizada (*Crassostrea gigas*). Estas microalgas se incluyeron por separado en la dieta FAO (*I. galbana*, *T. suecica*, *Chaetoceros* sp.) con dos tasas de sustitución diferentes: 10 y 25% del peso de la dieta. Las microalgas se cultivaron en sistema semicontinuo con tasa de renovación

de 40%, presentando elevadas productividades: 562 (*R. lens*) > 518 (*T. suecica*) > 497 (*C. placoidea*) > 482 (*I. galbana*) > 464 mg.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> (*Chaetoceros* sp.). La inclusión de las criptófitas en la dieta resultó en un incremento desde un 32 hasta un 37% de proteína de la dieta FAO a la dieta Rhodo 25. El contenido lipídico y de carbohidratos presentó pocas variación entre las dietas, estando en un rango 23%-25% para los lípidos y 14-16% para los carbohidratos. El perfil de ácidos grasos de la dieta resultó en ligeras mejoras con la inclusión de las criptófitas en la dieta, principalmente en el contenido de los ácidos grasos C<sub>18</sub>. A pesar de que la inclusión de las criptófitas no generó mejoras en el contenido de EPA, el DHA se incrementó hasta un 4% en Rhodo 25, frente a los valores de alrededor del 2% alcanzados con la menor tasa de sustitución de las criptófitas. El DPA se incluyó en la dieta a través de *C. placoidea* alcanzando un 1,1% en Chroo 25%. En general, la mayor inclusión de las criptófitas resultó en mejores supervivencias larvarias en las especies estudiadas, reflejándose en un crecimiento significativamente superior (ANOVA, p<0,05). A pesar de que la introducción de las criptófitas resultó, en general, en una mayor supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos, en algunos casos, en particular para la menor tasa de inclusión, su efecto es poco pronunciado frente a los resultados obtenidos con la dieta control FAO. No obstante, con la mayor tasa de inclusión de las criptófitas en la dieta se incrementó la supervivencia y crecimiento larvario en *R. philippinarum*, teniendo un efecto positivo igualmente en el crecimiento de *C. gigas*. *C. placoidea* proporcionó un crecimiento larvario significativamente superior, en particular con su mayor inclusión, que podría derivarse en parte de su diferente composición ácidos grasos con la inclusión del DPA en la dieta, ya descrito como potencialmente importante en cultivo de moluscos bivalvos.

Los resultados aquí obtenidos demuestran la importancia de la utilización de sistemas semicontinuos con elevadas tasas de renovación para la obtención de biomasa microalgal de elevada calidad, permitiendo incrementar la supervivencia y crecimiento larvario de moluscos bivalvos, tal y como ya había sido demostrado en otros animales filtradores. De entre las especies estudiadas, se enfatiza el potencial de la criptófita *C. placoidea* para su utilización en acuicultura, que presentó excelentes resultados no solo para la mejora de la supervivencia en el cultivo larvario de moluscos bivalvos, sino también para el cultivo del rotífero *B. plicatilis*.







## **Abstract**



Bivalve molluscs are a group of organisms with high economical and commercial value, having reached an annual world production of 13 million tons by means of aquaculture techniques. Spain is the largest producer of bivalves in the EU, entailing almost 165 thousand tons in 2013. However, the value of production is only a little more than half the value registered in Italy and France, due to the lower value of the mussel market, which represents 80% of the national aquaculture production. Oyster culture is also one of the important bivalve culture products in Spain, including the flat oyster (*Ostrea edulis*) and the pacific oyster (*Crassostrea gigas*), alongside with clam culture, namely the grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*), the pullet carpet shell (*Venerupis pullastra*) and the Japanese carpet shell (*Ruditapes philippinarum*), all of them of higher commercial value than mussels. Notwithstanding, oyster culture, as for clam culture, is in great extent dependent of the importation of seed for sowing from neighbour countries, because natural populations are not capable of maintaining the desirable levels of production (Matias *et al.*, 2009; Ojea *et al.*, 2008). Hatchery production of seed of these species is clearly insufficient, being in part limited to the availability of microalgae for feeding, as they still represent the only adequate feed for culturing bivalve mollusc through its life cycle (Müller-Feuga, 2000). Microalgae production is still considered the bottleneck for the culture of molluscs in hatcheries, due to low productivities and high costs of production derived from highly insufficient culture systems used in the majority of the aquaculture units, reaching around 30 – 40% of the total production costs (Müller-Feuga, 2000; Borowitzka, 1997; Duerr *et al.*, 1998; Wikfors and Ono, 2001, Helm and Bourne, 2004). Nevertheless, microalgae production in bivalve hatcheries can be improved with the transfer of the methodologies developed in the microalgal biotechnology field in the last decades, based on the use of controlled photobioreactors and applying continuous culture techniques. Batch cultures used in most hatcheries present low productivities as well as having lower nutritive quality. Aside from this nutritive problem, another limitation is related to the reduced number of species cultured in hatcheries, no more than 5-6 species, but normally just the 3-4 species suggested by FAO (Helm *et al.*, 2004). It has been demonstrated that microalgae from the Cryptophyceae group nutritionally complement classic species, producing excellent results in filtering animals like copepods (Milione and Zeng, 2007; Dahl *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013), artemia (Thin *et al.*, 1999; Seixas *et al.*, 2008; 2009), as well as in larval and juvenile stages of some bivalve species

(Mccausland et al., 1999; Tremblay et al., 2007; Gagné *et al.*, 2010; Nascimento, 2010). Nonetheless, the utilization of Cryptophyceae species in aquaculture is limited due to difficulties found in their cultivation (Renaud *et al.*, 1999; Knuckey *et al.*, 2005). Recently, there has been evidence that it is possible to maintain concentrated cultures of *Rhodomonas lens*, with high productivities in continuous systems (Coutinho, 2008; Seixas *et al.*, 2008; 2009; Freire, 2015).

The main objective of this work has been the improvement of larval cultures of bivalve molluscs through the improvement of the biochemical composition of the diet. Having this in mind, the effect of the use of continuous culture techniques for the improvement of biochemical composition of classic microalgae species used for the larval culture of mollusc was studied. Moreover, we have evaluated the effect of the introduction of species belonging to the Cryptophyceae group in three different experiments. The use of continuous cultures, with optimized and stable nutritional profile, increased the robustness of these comparative studies.

With the objective of selecting the most adequate cryptophyte species for the culture of molluscs on the basis of their nutritional profile and culture ease, an evaluation of different species from this group was carried out in three experiments. In an initial stage, the growth and biochemical composition of four different species was compared: *Rhinomonas reticulata*, *Rhodomonas salina*, *Rhodomonas lens* and *Chroomonas placoidea*. These microalgae were cultured in mini-photobioreactors of 80 mL, with nutrient concentration adjusted to 8mM NaNO<sub>3</sub> and 147  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , in semicontinuous cultures with a daily renewal rate of 30%. *R. lens* presented the highest productivity, reaching 384  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ , while to 339, 281 and 170  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$  were obtained with *C. placoidea*, *R. salina* and *R. reticulata*, respectively. Higher protein content was observed in *R. lens*, 58% of the dry weight, while *R. salina*, *C. placoidea* and *R. reticulata* presented 48 and 47% and 39%, respectively. Carbohydrate content was similar in *R. lens* and *R. reticulata*, representing 9% of its dry weight, while for *C. placoidea* and *R. salina*, carbohydrate content reached 11 and 13%, respectively. The highest lipid content was observed in *R. reticulata*, with 48%, followed by *R. salina* (23%), *C. placoidea* (18%) and *R. lens* (16%). As expected, fatty acid profile improved with semicontinuous culture in *R. lens* and *C. placoidea*

in comparison to batch cultures, increasing the percentage of polyunsaturated fatty acids. However, the opposite was observed in *R. reticulata* and *R. salina*, which corroborates the signs of stress evident in other biochemical parameters in semicontinuous cultures for these two species. Highest PUFA content was observed in *R. lens* (62%), followed by *C. placoidea* (58%), and finally *R. salina* (45%) and *R. reticulata* (33%). Contrary to the other microalgae tested, *C. placoidea* did not present DHA, presenting instead DPA. *R. lens* and *C. placoidea*, were the most robust microalgae, with higher productivities and better biochemical composition in semicontinuous cultures.

Secondly, in order to investigate the optimal irradiance and to verify the proposed higher sensibility of cryptophytes to high light intensities, the influence of light in growth and biochemical composition of *R. lens* and *C. placoidea* was studied. Two different light intensities were studied: 74 and 147  $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . The decrease of irradiance resulted in a slight, yet significant, decrease of *R. lens* cell density, which decreased from 13,6 to 11,9x10<sup>6</sup> cell.mL<sup>-1</sup> (Test-t, p<0.05). Even though there was no effect over steady state cell density, the decrease of irradiance affected the weight productivity in *C. placoidea*, with a decrease from 339 to 277 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> (Test-t, p<0.05), while *R. lens* decreased from 384 to 300 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>. The decrease in irradiance resulted in a slight increase in protein content, reaching 59% (*R. lens*) and 52% (*C. placoidea*), accompanied by a slight but significant increase in ficobiliprotein content (Test-t, p<0.05). PUFAs content was increased in both species with the decrease in irradiance, reaching a 29% of total fatty acids for *R. lens*, and a 33% for *C. placoidea*. Even though little effect was observed in cell densities with the increase of irradiance, the increase in cell weight resulted in higher productivities. These results demonstrate that these species are not stressed at the highest irradiance tested, 147  $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Nevertheless, the little differences observed in cell density and biochemical composition probably mean that the maximum irradiance used is close to the saturation point.

On the basis of the results obtained in semicontinuous cultures that allowed the selection of *R. lens* and *C. placoidea*, as the microalgae with higher potential due to its higher robustness, productivity and best biochemical profile among those tested, the nutritional value of these

## Abstract

species was first tested in the culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*, comparing it with the commonly used species *Nannochloropsis gaditana*. Microalgae were cultured in a semicontinuous culture with a daily renewal rate of 30%, with nutrient concentration adjusted to 8mM NaNO<sub>3</sub> and 229  $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . With this irradiance, *R. lens* reached the highest productivity (563  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), followed by *N. gaditana* (551  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), both significantly superior to the 463  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$  obtained by *C. placoidea* (Tuckey HSD,  $p<0.05$ ). Protein content was higher in *R. lens* (50%), followed by *C. placoidea* (48%) and *N. gaditana* (41%), while carbohydrate content was similar in these three microalgae (23 - 25%). Highest lipid content was observed in *N. gaditana* (30%), followed by 23 and 21% in *C. placoidea* and *R. lens*, respectively. PUFAs content was higher in the cryptophytes, reaching 64 and 58% in *C. placoidea* and *R. lens*, respectively, markedly higher than *N. gaditana* (42%). While the cryptophytes were characterized mainly by the high content in C<sub>18</sub> polyunsaturated fatty acids, EPA reached 31% in *N. gaditana*, which in turn represented less than 10% in the tested cryptophytes. DHA was present in *R. lens* (7%), DPA in *C. placoidea* (5%) and ARA in *N. gaditana* (7%). Higher rotifer growth was obtained with *C. placoidea* (255 rotifers.mL<sup>-1</sup>), which was significantly superior to *N. gaditana* (224 rotifers.mL<sup>-1</sup>), and *R. lens* (182 rotifers.mL<sup>-1</sup>) (Bonferroni multiple comparison test,  $p<0.05$ ), explained by the number of eggs produced daily. Even though, diets were formulated in order to contain the same biomass in weight (400  $\text{ng}\cdot\text{rotifer}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), rotifers reached higher dry weights with *R. lens* (231  $\text{ng}\cdot\text{rotifer}^{-1}$ ), due to a lower FCR: 1.8 in comparison with FCR obtained with *C. placoidea* 2.2 and *N. gaditana* 3.4. The difference between biochemical compositions of the diets was not reflected in the protein content of the rotifers, which was similar between all three diets (~58%). Nonetheless, the fatty acid profile of the rotifers reflected the different microalgal profiles, with the largest PUFA content in rotifers cultured with *R. lens* (60%), followed by *C. placoidea* (56%) and *N. gaditana* (42%). EPA represented 21% of the rotifers fed with *N. gaditana*, doubling the amount of EPA observed when rotifers fed with *R. lens* and *C. placoidea*. The fatty acid 20:4n3 represented 10% of the rotifers fed with the cryptophytes suggesting the elongation of the 18:4n3 in both species. The cryptophytes, and particularly *C. placoidea*, showed to be an excellent diet for *B. plicatilis*, originating growth rates similar and even better than *N. gaditana*, alongside with an excellent fatty acid profile. These results demonstrate a better efficiency of cryptophytes as feed, which

resulted in a higher weight of the rotifers feed with *R. lens* and *C. placoidea*, probably justified by the higher content and digestibility of its protein and C:N ratio.

In the second part of this thesis the improvement of the larval cultures of the bivalve molluscs *O. edulis*, *V. pullastra*, *R. decussatus* and *R. philippinarum* was studied, through the optimization of the diet quality. Because the use of different renewal rates in semicontinuous cultures of microalgae affects both the biochemical composition and the bacterial load of cultures, an experiment that allowed to understand the effect of these two crucial parameters in the nutritional value of the microalgae for molluscs was carried out. To accomplish this, cultures of three species commonly used in aquaculture for bivalves that are suggested by FAO (*Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros* sp., with a 1:1:1 dry weight ratio, Helm *et al.*, 2004), were performed, using two different renewal rates: 10 (FAO diet 10%) and 40% (FAO diet 40%). Diets were supplied with and without the addition of chloramphenicol (2.5 mgL<sup>-1</sup>), with the objective of investigating the relative importance of the nutritional composition and the bacterial flora. The biochemical profile of *T. suecica* presented marked differences in the protein, lipid and carbohydrate content with different renewal rates. However, in *I. galbana* and *Chaetoceros* sp. only small differences were observed between renewal rates, since all cultures were nitrogen saturated. Nonetheless, FAO10% and FAO40% presented differences in its protein content (23 and 32%, respectively) and carbohydrate (27 and 14%, respectively), while lipid content was similar between treatments (25%). The weight supplied with the FAO40% diet was markedly lower due to the lower weight of the microalgal cells at this renewal rate. PUFA content was increased from 33 to 45% with increasing renewal rate in the diet, due to a slight increase in EPA (14 to 16%), 16:4n3 (1 to 5%) and 18:3n3 (2 to 6%) in FAO10% and FAO40%, respectively. The best survival rates were obtained with the FAO40% diets, what is remarkable because these diets provide a lower weight ration than FAO10%. The addition of chloramphenicol substantially increased the survival of *R. decussatus*, *V. pullastra* and *R. philippinarum*, but no effect was observed when this antibiotic was added to culture in *O. edulis* culture. In the case of *V. pullastra* and *R. philippinarum*, the positive effect of the addition of chloramphenicol is significant only in the diet FAO40%, indicating that the nutritional



requirements of larvae must be fulfilled before the effect of the antibiotic can be detected. Higher larval growth rates were obtained in larvae fed with FAO40%. In these cases, generally, the addition of the antibiotic did not have any effect over growth. Even though there are differences of sensibility between species, it was observed that the nutritional composition as well as the bacterial load provided by the diet were limiting factors for the survival of bivalve larvae. The biochemical composition of the diet was the main factor controlling larval growth. Even though results indicate that the effect of nutritional composition of cultures over survival until metamorphosis is, in some cases, of lower importance than the biochemical variability generated by microalgal diets when different renewal rates are applied, it should be noted that the variability of biochemical composition generated with the semicontinuous cultures tested is lower of that that recorded in other experiments, where all cultures maintained with low renewal rate were limited by nitrogen.

Finally, *Rhodomonas lens* and *Chroomonas placoidea*, which generated better growth in the cultures of the rotifer *B. plicatilis* that the standard diet based on *N. gaditana*, were included in diets for larvae of the Japanese carpet shell (*Ruditapes philippinarum*) and the pacific oyster (*Cassostrea gigas*). These microalgae were separately included in the FAO diet (*I. galbana*, *T. suecica*, *Chaetoceros* sp.), with different substitution rates: 10 and 25% of the diet dry weight. Microalgae were cultured in a semicontinuous system, in which a 40% daily renewal rate was applied, presenting high productivities: 562 (*R. lens*) > 518 (*T. suecica*) > 497 (*C. placoidea*) > 482 (*I. galbana*) > 464 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> (*Chaetoceros* sp.). The inclusion of cryptophytes in the diet originated an increase of protein in the diet, from 32 to 37% in the Rhodo25% diet in relation to the FAO diet. Lipid and carbohydrate content presented small differences between diets, being in the range 23-25% for lipid content, and 14-16% for carbohydrate. A slight improvement in the fatty acid profile was observed due to the inclusion of cryptophytes, mainly in the C<sub>18</sub> content. Even though the inclusion of cryptophytes in the diet did not generate increments in EPA content, DHA content was increased up to 4% in Rhodo25%, in opposition to the lower values (2% increase) registered in the diets with a lower substitution rate. DPA was present in diets including *C. placoidea*, reaching 1.1% in Chroo25%. Generally, higher substitution rates of the cryptophytes originated better survival rates, resulting in significantly higher growths (ANOVA, p<0.05). Even though diets including the cryptophytes generated a statistically significant



improvement in larval survival and growth, the observed increase was low for diet with the lower substitution rate in comparison to the standard FAO diet. Notwithstanding, in *R. philippinarum* cultures, higher inclusion rates of cryptophytes increased larval growth and survival. The same positive effects could be observed in *C. gigas* growth. *C. placoidea* produced the best larval growth results. This could be related with its fatty acid composition, containing DPA, which has been described as a potentially important fatty acid for bivalve culture.

Results obtained in this work corroborate the importance of high renewal rate semicontinuous systems to obtain high quality microalgal biomass for the improvement of larval survival and growth of bivalve molluscs, as previously described for other filtering organisms. *C. placoidea*, showed better larval survival rates for bivalve molluscs, as well as better results for the culture of the rotifer *B.plicatilis*. For these reasons *C. placoidea* shows great potential to be used in aquaculture for rotifer and mollusc bivalve larvae.





## **Bibliografía**



- Albentosa, M., Beiras, R., Camacho, A.P., 1994. Determination of optimal thermal conditions for growth of clam (*Venerupis pullastra*) seed. *Aquaculture*, 126, 315-328.
- Albentosa, M., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., 1996. Fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on different microalgae diets. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113A, 2, 113-119.
- Aldana-Aranda, D., Patiño Suárez, V., 1998. Overview of diets used in larviculture of three Caribbean Conchs: Queen Conch *Strombus gigas*, Milk Conch *Strombus costatus* and Fighting Conch *Strombus pugilis*. *Aquaculture*, 167, 163-178.
- Amler, M.R.W., 1999. Synoptical classification of fossil and Recent Bivalvia. *Geologica et Palaeontologica* 33: 237-248.
- Andersen, R. A., Brett, R.W., Potter, D., Sexton, J.P., 1998. Phylogeny of the eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist*, 149, 61-74.
- APROMAR, 2015. Informe: La Acuicultura en España. p.97. Available at: [www.apromar.es](http://www.apromar.es)
- Arad, S., Friedman, O., Rotem, A., 1988. Effect of nitrogen on polysaccharide production in a *Porphyridium sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2411-2414.
- Araújo, G.S., Matos, L.J.B.L., Goncalves, L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L., 2011. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, 102, 5248-5250.
- Archibald, J.M. & Keeling, P.J., 2002. Recycled plastids: a green movement in eukaryotic evolution. *Trends in Genetic*, 18, 577-584

## Bibliografía

- Archibald, J.M., 2007. Review of Genomics and Evolution of microbial eukaryotes (Katz and Bhattacharya eds.), *The Quarterly Review Of Biology*, 82, 275-276
- Avila, C., Grenier, C., Tamse, C. T., Kuzirian, A.M., 1997. Biological factors affecting larval growth in the nudibranch mollusc *Hermisenda crassicornis* (Eschscholtz, 1831). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 218, 243–262.
- Baldwin, B.S., 1995. Selective particle ingestion by oyster larvae (*Crassostrea virginica*) feeding on natural seston and cultured algae. *Marine Biology* 123, 95–107.
- Baldwin, B.S., Newell, R.I.E., 1995. Relative importance of different size food particles in the natural diet of oyster larvae (*Crassostrea virginica*). *Marine Ecology Progress Series* 120, 135–145.
- Bartual, A., Lubián, L.M., Gálvez, J.A., Niell, F.X., 2002. Redalyc. Effect of irradiance on growth, photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of *Rhodomonas salina* (Wislouch) (*Cryptophyceae*). *Ciencias Marinas*, 28, 381–392.
- Bayne, B.L., 1965. Growth and delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L). *Ophelia*, 2: 1-47.
- Bayne, B.L., 1983. Physiological ecology of mussel larvae. *The Mollusca*. Vol. 3. Development, Verdonk, N.H., Van den Biggelaar, J.A.M. y Tompa, A.S. (ed). Academic Press, New York: 299-343.
- Bayne, B.L., Salkeld, P.N. & Worrall, C.M., 1983. Reproductive effort and value in different populations of the marine mussel, *Mytilus edulis* L. *Oecologia*, 59, 18–26.
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 34-43.

- Becker, W., 2004. Microalgae for Aquaculture. The Nutricional value of Microalgae. In: Richmond, A. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. London: Blackwell Science, 380-391.
- Ben-Amotz, A., Avron, M., 1983. Accumulation of methabolites by halotolerant algae and its industrial potential. Annual Review Microbiology, 37, 95-119.
- Bennet, A., Bogorad, L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. The journal of Cell Biology 58:419-435.
- Bermúdez, J., Rosales, N., Loreto, C., Briceño, B., Morales, E., 2004. Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas sp.* in semicontinuous cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 179–183.
- Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Wängberg, S.A., Carlsson, A.S., 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Aquaculture 154, 139-153.
- Bligh, E.G., 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., 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. Journal of Applied Phycology, 9, 393–401.
- Brown, C., 1973. The effects of some selected bacteria in embryos and larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. Journal of Invertebrate Pathology, 21, 215-223.
- Brown, C., Tettelbach, L.P., 1988. Characterization of a nonmotile *Vibrio sp.* pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. Aquaculture 74, 195-204.

## Bibliografia

- Brown, J.S., 1987. Functional organization of chlorophyll a and carotenoids in the alga *Nannochloropsis salina*. *Plant Physiology* 83, 434-437.
- Brown, M.R., McCausland, M., Kowalski, K., 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 165, 281-293.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Garland, C. D., 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Mar. Lab. Rep. Ser.*, 205, 44.
- Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145, 79-99.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315-331.
- Brown, T.E. & Richardson, F.L., 1968. The effect of growth environment on the physiology of algae: light intensity. *Journal of Phycology*, 4, 38-54.
- 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.
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., Marsac, N.T., Castets, A.M., Cohen-Bazire, G. 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology* 123(2):113-127.
- Cao, S., Zhang, X., Fan, X., Qiao, H., Liang, C., Xu, D., Mou, S., Wang, W. & Ye, N. (2013). Phylogeny and characterization of *Nannochloropsis oceanica* var. *sinensis* var. nov (Eustigmatophyceae), a new leaginous alga from China. *Phycologia* 52(6): 573-577.



- Chalup, M.S., Laws, E. A., 1990. A test of the assumptions and predictions of recent microalgal growth models with the marine phytoplankter *Pavlova lutheri*. *Limnology and Oceanography*, 35, 583-596.
- Christensen, T. 1962. Alger. En: Botanik. II. Systematisk Botanik. Bocher, T. W., Lange, M., Sørensen, T. (eds). København: Munksgaard.
- Chu, F.L.E., J. Greaves, 1991. Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oysters. *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 110, 229-236.
- Chu, F.L.E., Webb, K. L., 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids* 19, 815-820.
- Coatanea, D., Vercelli, C., Chabirand, J.M., Oheix, J., Pichot, Y., Hirata, T., 1994. Controle de la maturation et du calendrier d'émission larvaire d'un stock de géniteurs d'huîtres plates *Ostrea edulis* méditerranéennes. Rapport, convention de recherche IFREMER / Région Languedoc-Roussillon n°94.3.522.001/F, pp125.
- Cortina-Burgueño, A., Nascimento, P., Otero, A., 2011. Requerimientos de vitaminas de la microalga marina *Isochrysis aff. Galbana clon T-ISO*. XXIII Congreso Nacional de Microbiología. Salamanca, 11-14 de Julio, 2011, p113.
- Coutinho, P.I., 2008. La microalga marina *Rhodomonas lens*: optimización de las condiciones de cultivo y potencial biotecnológico. PhD thesis. Universidad de Santiago de Compostela.
- Coutteau, P., 1996. Micro-algae. In: Sorgeloos, P., Lavens, P. (Eds.), *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. Fisheries Technical Paper No. 361. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 7-47.

## Bibliografia

- D'Alvise, P.W., Lillebø, S., Prol-Garcia, M.J., Wergeland, H.I., Nielsen, K.F., Bergh, Ø., Gram, L., 2012. *Phaeobacter gallaeciensis* reduces *Vibrio anguillarum* in cultures of microalgae and rotifers, and prevents vibriosis in cod larvae. *PloS one*, 7, 43996.
- Dahl, U., Lind, C. L., Gorokhova, E., Eklund, B., Breitholtz, M., 2009. Food quality effects on copepod growth and development: Implications for bioassays in ecotoxicological testing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 351-357.
- De Moreno JE, Moreno VJ, Brenner, R.R., 1977. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: 3-saturated fatty acids and acetate metabolism. *Lipids*, 12, 804-808.
- De Moreno, J.E., Moreno, V.J., Brenner, R.R., 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: I. Composition of the lipids. *Lipids*, 11, 334-340.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 173, 163-179.
- Di Salvo, L.H., Blecka, J., Zebal, R., 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Applied Environmental Microbiology*, 35, 219-221.
- Dionisio, M.L., Tsuzuki, M. & Miyachi, S., 1989. Blue Light Induction of Carbonic Anhydrase Activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 30, 215-219.
- Dionisio, M.L., Tsuzuki, M. & Shigetoh, M., 1989. Light Requirement for Carbonic Anhydrase Induction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 30, 207-213.
- Dubert, J. Fernández-Pardo, A., Nóvoa, S., Barja, J.L., Prado, S., 2015. Phytoplankton production systems in a shellfish hatchery: variations of the bacterial load and diversity of vibrios. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 1264-1275.

- Dubinsky, Z., Falkowski, P.G. & Wyman, K., 1986. Light Harvesting and Utilization by *Phytoplankton*. *Plant and Cell Physiology*, 27, 1335-1349.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 26 (3): 350-356
- Duerr, E.O., Molnar, A., Sato, V., 1998. Cultures microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology*, 7, 65-70.
- Dunstan, G.A., Dunstan, G.A., Brown, M.R., Volkman, J.K., 2005. *Cryptophyceae* and *Rhodophyceae*; chemotaxonomy, phylogeny and application. *Phytochemistry*, 66, 2557-2570.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M., Leroi, J-M., Jeffrey, S.W., 1994. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (*Bacillariophyceae*). *Phytochemistry*, 35, 155-161.
- Elston, R.A., Hasegawa, H., Humphrey, K.L., Polyak, I.K., Häse, C.C., 2008. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of aquatic organisms*, 82, 119-34.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F.; Craigie, J.S., Castell, J.D., 1986a. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96: 1-13.
- Enright, C., Newkirk, G., Craigie, J., Castell, J., 1986b. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. *Journal of Experience in Marine Biology and Ecology*, 96, 15-26.
- Establier, R., Lubián, L.M., 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.

## Bibliografía

- Fábregas, J. 1982. Las microalgas marinas como eslabón de infraestructura en la microbiología marina: aislamiento, caracterización, ciclo celular, interacciones y aprovechamiento tecnológico. Tesis doctoral. Universidad de Santiago, p 467.
- Fábregas, J. Patiño, M., Vecino, E., Cházaro, F., Otero, A., 1995b. Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 617-621.
- 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., Arán, J., Morales, E.D., Lamela, T., Otero, A., 1997. Modification of sterol concentration in marine microalgae. *Phytochemistry*, 46, 1189-1191.
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Otero, A., 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. Changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 31-35.
- Fábregas, J., Otero, A., Domínguez, A. Patiño, M., 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Mar. Biotechnology*, 3, 256-263.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E.D., Cordero, B., Patiño, M., 1996c. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture*, 143, 197-204.
- Fábregas, J., Otero, O., Morales, E.D., Arredondo-Vega, B.O., Patiño, M., 1998. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous culture. *Aquaculture*, 169, 167-176.

- Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo-Vega, B.O., Tobar, J. L., Otero, A., 1995a. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 287-292.
- Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E.D., Cordero, B., Otero, A., 1996a. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalgae *Phaeodactylum tricorutum* in semi-continuous cultures. *Applied Environmental Microbiology* 62, 266-268.
- Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E.D., Dominguez, A., Otero, A., 1996b. Distinctive control of metabolic pathways by *Chlorella autotrophica* in semicontinuous culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 1087-1090.
- FAO, 2008. *FAO Yearbook: Fisheries and Aquaculture Statistics*.
- FAO, 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture: opportunities and challenges*, Rome.
- Fawley, M. W., Yun, Y., Qin, M., 2000. Phylogenetic analyses of 18s rDNA sequences reveal a new coccoid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 36: 387–393.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J., Labarta, U., 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83, 17-37.
- Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., 2006. Lipid composition of *Ruditapes philipinarum* spat: Effect of ration and diet quality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 144, 229-237.

## Bibliografía

- Fernández, A., García, T., Asensio, L., Rodríguez, M.A., González, I., Céspedes, A., Hernández, P.E., Martín, R., 2000. Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (Grooved carpet shell), *Venerupis pullastra* (Pullet carpet shell), and *Ruditapes philippinarum* (Japanese carpet shell) by PCR-RFLP. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 3336-3341.
- Ferrario, M., Hernández-Becerril, D. U. & Garibotti, I. 2004. Morphological study of the marine planktonic diatom *Chaetoceros castracanei* Karsten (Bacillariophyceae) from Antarctic waters, with a discussion on its possible taxonomic relationships. *Botanica Marina*, 47, 349-355.
- Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J., Otero, A. 2009. Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Nannohloropsis gaditana*. *Marine Biotechnology*, 11, 585-595.
- Ferreira, M., Maseda, A., Fábregas, J., Otero, A. 2008. Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Isochrysis aff. galbana* clone T-ISO. *Aquaculture*, 279, 126-130.
- Ferreira, M., Seixas, P., Coutinho, P., Fábregas, J., Otero, A., 2011. Effect of the Nutritional Status of Semi-continuous Microalgal Cultures on the Productivity and Biochemical Composition of *Brachionus plicatilis*. *Marine Biotechnology*, 13, 1074-1085.
- Ferreiro, M.J., Pérez-Camacho, A., Labarta U., Beiras, R., Planas, M., Fernández-Reiriz M.J., 1990. Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimes. *Marine Biology*, 106, 395–401.
- Flynn, K. J., 1990. Composition of intracellular and extra- cellular pools of amino acids, and amino acid utilization of microalgae of different sizes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 139,151-166

- 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.
- Flynn, K.J., Garrido, J.L., Zapata, M., Öpik, H., Hipkin, C.R., 1992. Changes in fatty acids, amino acids and carbon/nitrogen biomass during nitrogen starvation of ammonium- and nitrate-grown *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology*, 4, 95-104.
- Freire, I., 2015. Producción de la microalga marina *Rhodomonas lens* en cultivo semicontinuo y su utilización para el enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis*. Tesina. Universidad de Santiago de Compostela.
- Gabbott, PA. 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine mollusca. *The Mollusca. Environmental biochemistry and physiology.* (K. M. Wilbur, ed), Academic Press. New York., 165-219.
- Gagné, R., Tremblay., R., Pernet, F., Miner, P., Samain, J., Olivier, F., 2010. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture*, 309, 212-221.
- Gallager, S.M., Mann, R., 1986a. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56, 105-121.
- Gallager, S.M., Mann, R., 1986b. Individual variability in lipid content of bivalve larvae quantified histochemically by absorption photometry. *Journal of Plankton Research*, 8, 927-937.

## Bibliografía

- Gallager, S.M., Mann, R., 1981. The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankter *Thalassiosira pseudonana* (3H) on its food value to the bivalve *Tapes japonica*. *Aquaculture* 26, 95-105.
- García Sánchez, J.L., Pérez, J.A.S., Camacho, F.G., Sevilla, J.F., Molina Grima, E., 1996. Optimization of light and temperature for growing *Chlorella sp.* using response surface methodology. *Biotechnology Techniques*, 10, 329-334.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Nicolas, J.L., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 358-365.
- Gayral, P. and Fresnel, J., 1983. Description, sexualité et cycle de développement d'une nouvelle Coccolithophoracée (Prymnesiophyceae): *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* sp. nov. *Protistologica* 19, 245-261.
- Genard, B., Miner, P., Nicolas, J-L., Moraga, D., Voudry, P., Pernet, F., Tremblay, R., 2013. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in pacific oyster larvae. *PLoS ONE*, 8, 64534.
- Ghioni, C, Porter, A.EA., Taylor, G.W., Tocher, D.R., 2002. Metabolism of 18:4n-3 (stearidonic acid) and 20:4n-3 in salmonid cells in culture and inhibition of the production of prostaglandin F 2 $\alpha$  (PGF 2 $\alpha$ ) from 20:4n-6 (arachidonic acid). *Fish Physiology and Biochemistry*, 27, 81-96.
- Ginzburg, M., 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research*, 14, 91-183.



- 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.
- Glize, P., 1994. Contribution à la maîtrise de l'élevage de l'huître plate (*Ostrea edulis*) en région des pays de la Loire. Syndicat mixte pour le développement aquacole en pays de la Loire, p10.
- Gnaiger, E., Bitterlich, G., 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia*, 62, 89-98.
- Goldman, J.C., McCarthy, J.J. 1979. Steady-state growth and ammonium uptake of a fast-growing marine diatom. *Limnology and Oceanography*, 23, 695-703
- Gosling, E., 2003. Bivalve Molluscs – Biology, Ecology and Culture, (Gosling, ed). Blackwell Publishing. Cornwall, United Kingdom. Pp 443.
- Green, J.C., Parke, M., 1975. A reinvestigation by light and electronmicroscopy 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., 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.
- Grossart, H.P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., Brinkhoff, T., 2005. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 7, 860-873.
- Guevara, M., Bastardo, L., Cortez, R., Arredondo-Veja, B., Romero, L., Gómez, P., 2011. Pastas de *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*, 59, 1503-1515.

## Bibliografia

- Guil-Guerrero, J.L., 2007. Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1226-1236.
- Guillard, R. R. L., 1959. Further evidence of the destruction of bivalves' larvae by bacteria. *Biological Bulletin* 55, 260-282
- Guillard, R.R.L., 1995. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds). *Culture of marine invertebrate animals*. New York: Plenum, 1975, pp. 29-60.
- Guillard, R.R.L., Lorenzen, C. J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology* 8(1) 10-14.
- Guillou, L., Eikrem, W., Chretiennot-Dinet, M. J., Le Gall, F., Massana, R., Romari, K., Pedros-Alio, C., Vaultot, D. 2004. Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist* 155: 193–214.
- Hada, H.S., West, P.A., Lee, J.V., Stemmler, J., Colwell, R.R., 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 1-4.
- Hasle, G.R. & Syvertsen, E.E. (1996). Marine diatoms. In: *Identifying Marine Phytoplankton*. (Tomas, C.R. Eds), pp. 5-385. San Diego: Academic Press.
- Haws, M.C., DiMichele, L., Hand S.C., 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2, 207-217.

- Heimdal, B. R. 1993. Modern coccolithophorids. En: Marine Phytoplankton. Tomas, C. R. (ed.). Academic Press, London, 147-247.
- Helm, M.M., Laing, I., 1987. Preliminary observations on the nutritional value of 'Tahiti *Isochrysis*' to bivalve larvae. *Aquaculture*, 62, 281-288.
- Helm, M.M., 1969. The effect of diet on the culture of the larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis* L. International council for the exploration of the sea, p11.
- Helm, M.M., 1977. Mixed algal feeding of *Ostrea edulis* with *Isochrysis galbana* and *Tetraelmis suecica*. *Journal of the Marine Biological Association UK*. 57, 1019-1029.
- Helm, M.M., Holland, D.L., Stephenson, R.R., 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *Journal of the Marine Biological Association UK* 53, 673-684.
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. *FAO Fisheries Technical Paper*, 471. p177.
- Hendriks, I.E., van Duren, L.A., Herman, P.M.J., 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296, 199-213.
- Hernández-Becerril, D. U. 1996. A morphological study of *Chaetoceros* species (Bacillariophyta) from the plankton of the Pacific Ocean of Mexico. *Bull. Nat. Hist. Mus. London (Bot.)* 26:1-73
- Herrero, Cid, A., Fábregas, J., Abalde, J., 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquaculture Engineering*, 10, 99-110.

## Bibliografía

- Hibberd, D. J., Leedale, G. F., 1970. Eustigmatophyceae – a new algal class with unique organization of the motile cell. *Nature* 225, 758-760.
- Hibberd, D. J., Leedale, G. F., 1971. A new algal class – the Eustigmatophyceae. *Taxon* 20, 523-525.
- Hibberd, D. J., 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,
- Hildebrand, M., Davis, A.K., Smith, S.R., Traller, J.C., Abbriano, R., 2012. The place of diatoms in the biofuels industry. *Future Science*, 3, 221-240
- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 100, 455-463.
- Holland, D.L., Spencer, B.E., 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L., during larval development, metamorphosis and early spat growth. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 53, 287-298.

- ICSAH. 1988. International committee for standardization in haematology (ICSH): selected method for visual platelet counting. *Labmédica*, 5, 25-36.
- Jónasdóttir, S. H., 1994. Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*. Laboratory observations. *Marine Biology*, 121, 67-81.
- Kaspar, H.F., Keys, E.F., King, N., Smith, K.F., Kesarcodi-Watson, A., Miller, M.R., 2014. Continuous production of *Chaetoceros calcitrans* in a system suitable for commercial hatcheries. *Aquaculture*, 420-421, 1-9.
- Kesarcodi-Watson, a et al., 2009. Two pathogens of Greenshell mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. *Journal of fish diseases*, 32, 499-507.
- Kitano, M., Matsukawa, R. & Karube, I., 1997. Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp. under mixotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology*, 9, 559-563.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J., Rimmer, M.A., 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture*, 249, 339-351.
- Korstad, J., Olsen, Y., Vadstein, O., 1989. Life history characteristics of *Brachionus plicatilis* (rotifera) fed different algae. *Hydrobiologia*, 186-187, 43-50.
- Krichnavaruk, S., Loataweesup, W., Powtongsook, S., Pavasant, P., 2005. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. *Chemical Engineering*, 105, 91-98.

## Bibliografía

- Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167, 191-194.
- Jeffrey, S.W., Vesk, 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., 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.
- John, D. M., Whitton, B. A., and Brook, A. J. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Klaveness, D., 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, 2nd edition, 191-213.
- Kochert, G., 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In: Hellebust J Craigie J. (Eds) *Handbook of phycological methods. Physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press, London, pp 95-97
- Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H.B., Weiler, W., 2000. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39(3), 219-227.

- Laabir, M., Amzil, Z., Lassus, P., Masseret, E., Tapilatu, Y., De Vargas, R., Grzebyk, D., 2007. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 20, 51-57.
- Lafarga-De la Cruz, F., Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Trees, C.C., Santamaria-del-Ángel, E., Núñez-Cebrero, F., 2006. Nutrient uptake, chlorophyll a and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering*, 35, 51-60.
- Laing, I. & Millican, P.F., 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*, 54, 245-262.
- Laing, I., Child, A.R., Janke, A., 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Journal of the Marine Biological Association UK*, 70, 1-12.
- Laing, I. & Psimopoulous, A., 1998. Hatchery cultivation of King scallop (*Pecten maximus*) juveniles with cultured and bloomed algae diets. *Aquaculture*, 169: 55-68.
- Laing, I., Utting, S.D., 1994. The physiology and biochemistry of diploid and triploid Manila clam (*Tapes philippinarum* Adam & Reeve) larvae and juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 184, 159-169.
- Lambert, C., Nicolas, J.L., Cilia, V., Corre, S., 1998. *Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 481-487.
- Langdon, C., Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 61, 431-448.

## Bibliografia

- Laws, E.A., 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, 457-473.
- Laws, E.A., 1991. Photosynthetic quotients, new production and net community production in the open ocean. *Deep-Sea Research* 38 (1A): 143-167.
- Leonardos, N., Lucas, I.A.N., 2000. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 182, 301-315.
- Levinton, J., Ward, J., Shumway, S., 2002. Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* to chemical composition of fresh and aged kelp detritus. *Marine Biology*, 141, 367-376.
- Lombardi, A. T., Wangersky, P., 1991. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Marine Ecology Progress Series*, 77, 39-47.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C., 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Advances in Marine Biology*, 1, 1-136.
- Lora-Vilchis MC, Maeda-Martinez, A.N., 1997. Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research*, 28, 905-910.
- Loret, P., Pastoureaud, A., Bacher, C., Delesalle, B., 2000. Phytoplankton composition and selective feeding of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* in the Takapoto lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia): in situ study using optical microscopy and HPLC pigment analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 199, 55-67.



- Lubián, L. M., 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., 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., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A., 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*, 133, 295-309.
- Lucas, A., 1976. La culture des mollusques ou conchyliculture. L'exploitation de la vie marine. *Océanographie biologique appliquée*. Paris. Ed. Masson, 229-258.
- Lucas, A., Rangel, C. 1983. Detection of the first larval feeding in *Crassostrea gigas*, using the epifluorescence microscope. *Aquaculture*, 30, 369-374.
- Marin B., 2012. Nested in the Chlorellales or independent class? Phylogeny and classification of the Pedinophyceae (Viridiplantae) revealed by molecular phylogenetic analyses of complete nuclear and plastid-encoded rRNA operons. *Protist*, 163, 778–805
- Marshall, R., McKinley, S., Pearce, C. M. 2010. Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture* 2, 33-55.
- Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M. A., 2000. Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth. *Journal of Phycology* 36: 821–840.
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., Rangel-Dávalos, C., 2004. Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture*, 230, 417-423.

## Bibliografía

- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., Southgate, P.C., 2006. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture* 257, 491-503.
- 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., 2002. La luz modifica la productividad, la composición y el proteoma de microalgas del género *Nannochloropsis*. PhD thesis. Universidade de Compostela, 2002, p326.
- Matias, D., Joaquim, S., Leitão, A., Messapina, C., 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquaculture International*, 17, 257-271.
- Mattox, K. R., Stewart, K.D., 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. In D. E. G. Irvine and D. M. John [eds.], *The Systematics of green algae*, 29–72. Academic Press, London, UK.
- McCausland, M.A., Brown, M.R., Barret, S.M., Diemar, J., Heasman, M., 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 174, 323-342.
- McGinnis, K.M., Dempster, T.A., Sommerfeld, M.R., 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Journal of Applied Phycology*, 9, 19-24
- McKinnon, a. D., Duggan, S, Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G., Robino, B., 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, 223, 89-106.

- Melkonian, M., 1990. Phylum Chlorophyta. Class Prasinophyceae. In L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, and D. J. Chapman [eds.], Handbook of Protoctista, 600
- Merchuk, J.C., Ronon, M., Giris, S., Arad, S.M., 1998. Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp. Biotechnology and Bioengineering, 59, 705-713.
- Michels, M.H.A., Slegers, P., Vermue, M.H., Wijffels, R., 2014. Effect of biomass concentration on the productivity of *Tetraselmis suecica* in a pilot-scale tubular photobioreactor using natural sunlight. Algal Research, 4, 12-18.
- Milione, M., Zeng, C., 2007. The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. Aquaculture, 273, 656-664
- Milke, L.M., Bricelj, V.M., Parrish, C.C., 2008. Biochemical characterization and nutritional value of three *Pavlova* spp. In unialgal and mixed diets with *Chaetoceros muelleri* for postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*. Aquaculture, 276, 130-142.
- Miller, K.A., Brown, M.R., 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. Journal of Applied Phycology, 4, 205-215.
- Miller, M.R., Quek, S.Y., Staehler, K., Nalder, T., Packer, M., 2012. Changes in oil content, lipid class and fatty acid composition of the microalga *Chaetoceros calcitrans* over different phases of batch culture. Aquaculture Research, 1-14.
- Molina Grima, E., Pérez, J.A.S., Camacho, F.G., Sevilla, J.M.F., Fernández, F.G.A., 1994. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. Applied of Microbiology Biotechnology, 41, 23-27.

## Bibliografia

- Monroig, Ó., Tocher, D. & Navarro, J., 2013. Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in Marine Invertebrates: Recent Advances in Molecular Mechanisms. *Marine Drugs*, 11, 3998-4018.
- Mortensen, S.H., Børsheim, K.Y., Rainuzzo, J.R., Knutsen, G., 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 122, 173-185.
- Morton, B., 1996. The evolutionary history of the Bivalvia. Pp. 337-359 in Taylor, J., ed. *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford University Press.
- Muller-Feuga, A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12, 527-534
- Müller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., Divanach, P., 2003. Uses of microalgae in aquaculture. In Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp 252-299.
- Murchelano, R.A., Brown, C., Bishop, C., 1975. Quantitative and qualitative studies of bacteria isolated from sea water used in the laboratory culture of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32, 739-745.
- Nagata, W.D., 1985. Long-term acclimation of a parthenogenetic strain of *Brachionus plicatilis* Mueller to subnormal temperatures, 2: Effect on clearance and ingestion rates [on *Chlorella saccharophila*]. *Bulletin of the Faculty of Fisheries - Hokkaido University (Japan)*. 1-11
- Nakano, S., 1996. Bacterial response to extracellular dissolved organic carbon released from healthy and senescent *Fragilaria crotonensis* (Bacillariophyceae) in experimental systems. *Hydrobiologia*, 339, 47-55.

- Nascimento, I.A., 1980. Growth of the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg, fed with different algal species at high cell concentrations. *Journal du Conseil / Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*, 39: 134-139.
- Nascimento, P., 2010. Optimização da produção de *Pavlova lutheri* com diferentes meios nutritivos e cultura de larvas de amêijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*) com microalgas de composição controlada. Master thesis, Universidade do Porto.
- Nell J.A., O'Connor, W.A., 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley) larvae. *Aquaculture* 99: 277–284.
- Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G., Sorgeloos P., 2003. Supplementation of EPA and DHA emulsions to a *Dunaliella tertiolecta* diet: effect on growth and lipid composition of scallop larvae, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 217, 613–632.
- Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G., Sorgeloos, P., 2003. Energy vs. essential fatty acids: What do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 134, 599–613.
- Nottage, A.S., Birkbeck, T.H., 1986. Toxicity to marine bivalves of culture supernatant fluids of the bivalve-pathogenic *Vibrio* strain MCNB 1338 and other marine vibrios. *Journal of Fish Disease*, 9, 249-256.
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27, 67-76.
- Norris, R. E. 1980. Prasinophytes. In E. R. Cox [ed.], *Phytoflagellates*, 85– 145. Elsevier, New York, New York, USA.

## Bibliografía

- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Nóvoa, S., García-Martínez, P., Sánchez, J.L., 2008. Effects of Temperature Regime on Broodstock Conditioning of *Ruditapes decussatus*. *Journal of Shellfish Research*, 27, 1093-1100.
- Olson, J.A., 1988. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *Journal of Nutrition*, 119, 105-108.
- Oltra, R. et al., 2000. Life history and fatty acid composition of the marine rotifer *Synchaeta cecilia* valentina fed different algae. *Marine Ecology Progress Series*, 125-133.
- Otero, A., 1995. Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato. PhD thesis. Universidad de Santiago de Compostela, p 168.
- Otero, A., Arrendondo-Veha, B.O., Patiño, M., Lamela, T., Fábregas, J., 1995. Production of eicosapentaenoico and docosahexaenoico acids in semicontinuous cultures of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Marine Biotechnology* 3, 82-85.
- Otero, A., Domínguez, A., Lamela, T., García, D., Fábregas, J. 1998. Steadystates of semicontinuous cultures of a marine diatom: effect of saturating nutrient concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 227, 23-24.
- Otero, A., Fábregas, J., 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture* 159, 111-123.
- Otero, A., García, D., Fábregas, J., 1997a. Factors controlling eicosapentaenoic acid in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9, 465-469.

- Otero, A., García, D., Morales, E., Arán, J., Fábregas, J., 1997b. 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., Patiño, M., Domínguez A., Fábregas, J., 2002. Tailoring the nutritional composition of microalgae for aquaculture proposes – the use of semicontinuous culture techniques. *Aquaculture Europe*, 33, 13-16.
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, 17, 477-498.
- Palacios, E., Racotta, I., Kraffe, E., Marty, Y., Jeanne, M., Jean-Francois, S., Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture*, 250, 270-282.
- Parke, M., Manton, I., 1965. Preliminary observations on the fine structure of *Prasino cladus marinus*. *Journal of Marine Biology. Ass. U.K.*, 45, 525-536.
- Parrish, C.C., Wangersky, P.J., 1990. Growth and lipid class composition of the marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, in laboratory and mass culture turbidostats. *Journal of Plankton Research*, 12, 1011-1021.
- Parrish, C.C., French, V.M. & Whiticar, M.J., 2012. Lipid class and fatty acid composition of copepods (*Calanus finmarchicus*, *C. glacialis*, *Pseudocalanus* sp., *Tisbe furcata* and *Nitokra lacustris*) fed various combinations of autotrophic and heterotrophic protists. *Journal of Plankton Research*, 34, 356–375.
- Patiño, M. 1995. Nutrición de *Brachionus plicatilis* y *Artemia* sp. con microalgas marinas. Tesis de doctoramiento. Universidad de Santiago de Compostela.

## Bibliografía

- 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.
- Pernet, F., Bricelj, V.M., Parrish, C.C., 2005. Effect of varying dietary levels of  $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 327, 115-133.
- Pernet, F., Tremblay, R., 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 310, 73-86.
- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E., Roussy, M., 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221, 393-406.
- Piña, P., Voltolina, D., Nieves, M., Robles, M., 2006. Survival, development and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. *Aquaculture*, 253, 523-530.
- Plante, A., Arts, M., 2000. Effects of chronic, low levels of UV radiation on carbon allocation in *Cryptomonas erosa* and competition between *C. erosa* and bacteria in continuous culture. *Journal of Plankton Research*, 22 (7), 1277-1298.
- Ponis, E., Parisi, G., Le Coz, J.R., Robert, R., Zittelli, G.C., Tredici, M.R., 2006a. Effect of the culture technique on biochemical characteristics of *Pavlova lutheri* and its nutritional value for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture Nutrition*, 12, 322-329.
- Ponis, E., Parisi, G., Zittelli, G.C., Lavista, F., Robert, R., Tredici, M., 2008. *Pavlova lutheri*: production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282, 97-103.



- Ponis, E., Probert, I., Véron, B., Le Coz, J.R., Mathieu, M., Robert, R., 2006b. Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture*, 254, 544-553.
- Ponis, E., Robert, R., Parisi, G., Tredici, M., 2003. Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri* concentrates. *Aquaculture International*, 11, 69-79.
- Prado, S. et al., 2005. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67, 209-215.
- Prado, S., Dubert, J., Romalde, J., Toranzo, A., Barka, J.L., 2014. *Vibrio ostreicida* sp. nov., a new pathogen of bivalve larvae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1641-1646.
- Prieur, D., Carval, Y.J.P., 1979. Bacteriological and physico-chemical analysis in a bivalve hatchery: Techniques and preliminary results. *Aquaculture*, 17, 359-374.
- Proskauer, J. (1950). On *Prasinocladus*. *American Journal of Botany* 37: 59-66.
- Provasoli, L. 1968. Media and prospects for cultivation of marine algae. *In Cultures and Collections of Algae* (A. Watanase & A. Hattori, eds.). Japanese Society of Plant Physiology, Tokyo, p.47-74.
- Ragg, N.L.C., King, N., Watts, E., Morrish, J., 2010. Optimising the delivery of the key diatom *Chaetoceros calcitrans* to intensively cultured Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*. *Aquaculture*, 306, 270–280.

## Bibliografia

- Reinfeldeer, J.R., Fisher, N.S., 1994. The assimilation bivalve larvae of elements ingested by marine planktonic. *Cell*, 39, 12-20.
- 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., Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155, 207-221.
- Renaud, S., Thinh, L., Lambrinidis, G., Parry, D., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195-214.
- Renaud, S., Thinh, L., Parry, D., 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170, 147-159.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 256, 377-388.
- Rines, J. E. B. & Hargraves, P. E. 1988. The Chaetoceros Ehrenberg (Bacillariophyceae) flora of Narragansett Bay, Rhode Island, U.S.A. *Bibl. Phycol.* 79, 1-196.
- Robert, R., Gérard, A., 1999. Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources*, 12, 121-130.

- Robert, R., Miner, P., Nicolas, J.L., 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquaculture International*, 4, 305-313.
- Rodríguez, J.L., Sedano, F.J., García-Martín, L.O., Pérez-Camacho, A., Sánchez, J.L., 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. *Marine Biology*, 106, 109-111
- Rogers-Bennet, L., Fasteneau, H.C., Hibbard-Robbins, T., Cain, Z., Dewees, C. M., 1994. Culturing red sea urchin of experimental outplanting in Northern California. Final Report of Bodega Marine Laboratory, Santa Cruz University, USA.
- Romanovicz, D. K. 1981. Scale formation in flagellates. En: *Cytomorphogenesis in Plants*. Kiermayer, O. (ed.). Springer-Verlag, Viena, 27-62.
- Sakshaug, E., Andresen, K., Myklestad, S., Olsen, Y., 1983. Nutrient status of phytoplankton communities in Norwegian waters (marine, brackish, and fresh) as revealed by their chemical composition. *Journal of Plankton Research*, 5, 175-196.
- Salvini-plawen, L., Steiner, G., 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of mollusca. Pp. 29-51 in Taylor, J. , ed. *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford University Press.
- Santos, L. M. A. 1996. The Eustigmatophyceae: Actual knowledge and research perspectives. *Beiheft Nova Hedwigia* 112, 391-405.
- Sato, N., Murata, N., 1988. Membrane lipids. *Methods Enzimology*. 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.

## Bibliografía

- Scott, A.P. & Baynes, S.M., 1978. Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 14, 247-260
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods*, 77, 191-197.
- Scott, J.M., 1980. Effect of growth rate of the food alga on the growth/ingestion efficiency of a marine herbivore. *Journal of Marine Biology Association UK.*, 60, 681-702.
- Seixas, P., 2009. Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), alimentados con juveniles de *Artemia* enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales. PhD thesis. Universidade de Santiago de Compostela. P 254.
- Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, Martiña, F., Otero, A., 2009. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp.. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 381, 1-9.
- Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L.M.P., Otero, A., 2008. Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*, 283, 83-91.
- Serôdio, J., Silva, R., Ezequiel, J., Calado, R., 2011. Photobiology of the symbiotic acoel flatworm *Symsagittifera roscoffensis*: algal symbiont photoacclimation and host photobehaviour. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 91, 163–171.
- Shelef, G., Soeder, C.J. (Eds) 1980. *Algae Biomass. Production and use*. Elsevier-North Holland Biomedical Press. Amesterdam. pp 852.

- Shifrin, N.S., Chisholm, S.W., 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light–dark cycles. *Journal of Phycology*, 17, 374-384.
- Shumway, S., Cucci, T., Newell, R., Yentsch, C., 1985. Particle selection, ingestion, and absorption in Filter-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 91, 77-92.
- Shiran, D. et al., 1996. Biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*. I: The use of externally supplied fatty acids. *Lipids*, 31, 1277-1282.
- Spaulding, S., and Edlund, M. (2008). *Muelleria*. In *Diatoms of the United States*. Retrieved November 18, 2015
- Spolaore, P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (2): 87-96.
- Stemberger, R.S., 1981. A general approach to the culture of planktonic rotifers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 721-724.
- Starobogatov Ya. I. 1992. Morphological basis for phylogeny and classification of *Bivalvia*. *Ruthenica*, 2, 1–25.
- Støttrup, J.G., 2003. Production and Nutricional Value of Copepods. In: Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell Science Ltd., pp 145-195.
- Støttrup, J.G., Jensen, J., 1990. Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 141, 169-182.

## Bibliografia

- Sukenik, A., Carmeli, Y. & Berner, T., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*, 25, 686-692.
- Sukenik, A., Wahnon, R., 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97, 61-72.
- 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.
- Sym, S. D., And r. N. Pienaar. 1993. The class Prasinophyceae. In F. E. Round and D. J. Chapman [eds.], *Progress in phycological research*, 281–376. BioPress Ltd., London, UK.
- Taguchi, S., Hirata, J.A., Laws, E.A., 1987. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. *Journal of Phycology*, 23, 260-267.
- Tang, B., Liu, B., Wang, G., Zhang, T., Xiang, J., 2006. Effects of various algal diets and starvation on larval growth and survival of *Meretrix meretrix*. *Aquaculture*, 254, 526–533.
- Tang, K. W., Jakobsen, H. H., Visser, A. W., 2001. *Phaeocystis Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the planktonic food web: Feeding, growth, and trophic interactions among grazers. *Limnology Oceanography*, 46, 1860-1870.
- Tempest, D.W., Norris, J.R. & Richmond, M.H., 1978. Dynamics of microbial growth. Pp 32
- Thin, L.-V., Renaud, S.M. & Parry, D.L., 1999. Evaluation of recently isolated Australian tropical microalgae for the enrichment of the dietary value of brine shrimp, *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 170, 161-173.

- Thomas. W.H., Seibert, D.L.R., Alden, M., Neori, A., Eldridge. P., 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum tricornutum* experiments. *Biomass* 5, 181-209.
- Thompson, P.A., Harrison, P.J., 1992. Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Marine Biology* 113, 645-654.
- Thompson, P.A., Harrison, P.J., Whyte, J.N.C., 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *Journal of Phycology*, 26, 278-288.
- Thompson, P.A., Ming-Xin, G., Harrison, P.J., Whyte, J.N.C., 1992. Effects of variation in temperature. II: on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28, 488-497.
- Tremblay, R., Cartier, S., Miner, P., Pernet, Quéré, C., Moal, J., Muzellec, M., Mazuret, M., Samain, J., 2007. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture*, 262, 410-418.
- Tubiash, H. S., Chanley, P.E., Leifson, E., 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and Epizootology. *Journal of Bacteriology* 90, 1036-1044
- Tubiash, H. S., Colwell, R. R., Sakazaki, R., 1970. Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of Bacteriology* 103, 272-273.
- Tubiash, H.S., Otto, S.V., 1986. Bacterial problems in oysters. A review. In: Vivarès, C.P., Bonami, J.R., Jasper, E., eds. *Pathology in Marine Aquaculture*. Bredene, Belgium, European Aquaculture Society, Spec. Publ. 9: 233-242.

## Bibliografía

- Ukeles, R., and B. M. Sweeney. 1969. Influence of dinoflagellatetrichocysts and other factors on the feeding of *Crassostrea virginica* larvae on *Monochrysis lutheri*. *Limnology and Oceanography* 14, 403-410.
- Ulloa, G. Coutens, C., Sánchez, M., Sineiro, J., Fábregas, F., Deive, F.J., Rodríguez, A., Núñez, M.J., 2012. On the double role of surfactants as microalga cell lysis agents and antioxidants extractants. *Creen Chemistry*, 14, 1044-1051.
- Uriarte I., Farías, A., Hernández, J., Schäfer, C., Sorgeloos, P., 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture*, 230, 349–357.
- Utting, S.D., 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacultural Engineering* 4, 175-190.
- Utting, S.D., 1986. A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture*, 56, 123-138.
- Utting, S.D., Doyou, J., 1992. The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture*, 103, 17-28.
- Valenzuela-Espinoza, E., Lafarga, F., Millan-Núñez, R., 2005. Growth, nutrient uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp. cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers. *Ciencias Marinas*, 31, 79–89.
- Veloza, A.J., Chu, F.-L.E. & Tang, K.W., 2006. Trophic modification of essential fatty acids by heterotrophic protists and its effects on the fatty acid composition of the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Biology*, 148, 779-788.



- Volkman, J.K. et al., 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class *Eustigma tophyceae*. *Journal of Phycology*, 29, 69-78.
- Vymazal, J. *Algae and element cycling in wetlands*. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers; 1995. 698 pp
- 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.
- Waldock, M.J., Holland, D.L., 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 19, 332-336.
- Waldock M.J., Nascimento, I.A., 1979. The triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. *Marine Biology Letters*, 1: 77-86.
- Walker, K.F., 1998. Molluscs of inland waters. In: Beesley PL, Ross GJB, Wells A (eds) *Mollusca: the southern synthesis*. Fauna of Australia, vol 5. CSIRO, Melbourne, pp 59–65
- 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.
- Walne, P.R., 1956a. Experimental rearing of the larvae of *Ostrea edulis* (L.) in the in the laboratory. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Fishery Investigation Series II 20, p22
- Walne, P.R., 1956b. Bacteria in experiments on rearing oyster larvae. *Nature* , 178, 91
- Walne, P.R., 1958. The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of *Ostrea edulis* (L.). *Journal of Marine Biology*, 37, 415-425.

## Bibliografia

- Walne, P.R., 1966. Large scale culture of larvae *Ostrea edulis* L. Fishery Investigation Series II 25, 1-52.
- Webb K.L., Chu F.L., 1981. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: Pruder G.D., Landgon, C., Conklin, D. (eds) Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Special Publication Nr. 2, 272–291, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA. October 27-29.
- 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.
- Whyte, J.N.C., 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture 60, 231-241.
- Whittle, S. J., Casselton, P. J. 1969. The chloroplast pigments of some green and yellow-green algae. British Phycological Journal 4, 55-64.
- Whittle, S.J., 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., Bourne, N., Ginther, N.G., Hodgson, C.A., 1992. Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantea* (Gray). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 163, 13-29.
- Whyte, J.N.C., Bourne, N. & Hodgson, C.A., 1990. Nutritional condition of rock scallop, *Crassadoma gigantea* (Gray), larvae fed mixed algal diets. Aquaculture, 86, 25-40.

- Wikfors, G.H., Patterson, G.W., Ghosh, P., Lewin, R.A., Smith, B.C., Alix, J.H., 1996. Growth of post-set oysters, *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp. *Aquaculture*, 143, 411-419.
- Wilson, J.A., Chaparro, O.R., Thompson, R.J., 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture*, 139, 63-75.
- Wilson, J.H., The food value of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to the larvae of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture*, 13, 313-323.
- Wood, A.M., Everroad, R.C., Wingard, L.M., 2005. Measuring growth rate in microalgal cultures. En: *Algal culturing techniques*. Anderson, L.A. (Ed.). Elsevier Academic Press, Oxford, pp.269-286.
- Yan. X., Zhang, G., Yang, F., 2006. Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture*, 253, 350-358.
- Zhang, J., Ianora, A., Wu, C., Pellegrini, D., Esposito, F. and Buttino, I. (2015), How to increase productivity of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): effects of population density and food concentration. *Aquaculture Research*, 46: 2982–2990
- Zhang, J., Wu, C., Pellegrini, D., Romano, G., Esposito, F., Ianora, A., Buttino, I., 2013. Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture*, 400-401, 65-72.
- Zhukova, N., Aizdaicher, N. A., 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39, 351-356.

## Bibliografia

Zhu C. Lee Y. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 9, 189-194

Zittelli, G.C., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M., 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261, 932-943.

Zlotnik, I., Sukenik, A., Dubinsky, Z., 1993. Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the chlorophyte *Haematococcus pluviialis*. *Journal of Phycology*, 29, 463-469.





## **Anexos**



1. Cortina-Burgueño, A., Nascimento, P., Freire I., Ación, F.G., Otero, A. 2011. Comparación del crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO en distintos modelos de fotobiorreactor. IV Foro Iberoam. Rec. Mar. Acuí.:163-170
2. Otero, A., Romero, M., Mayer, C., Muras, A., Nascimento, P., Reyero, I., 2014. *Quorum quenching*: una alternativa al uso de antibióticos en acuicultura. Foro Rec. Mar. Ac. Rías. Gal., 16, 275-284
3. Malpartida, I., Jerez, C.G., Morales, M.M., Nascimento, P., Freire, I., Ezequiel, J., Rico, R.M., Peralta, E., Malapascua, J.R. Florez, Y., Masojidek, J., Abdala, R., Figueroa, F.L., Navarro, E., 2014. Synergistic effect of UV radiation and nutrient limitation on *Chlorella fusca* (Chlorophyta) cultures grown in outdoor cylindrical photobioreactors. Aquatic Biology, 22, 141-158.



## Comparación del crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO en distintos modelos de fotobiorreactor

Cortina-Burgueño<sup>1\*</sup> A., Nascimento<sup>1</sup> P., Freire I., Ación<sup>2</sup> F.G., Otero<sup>1</sup> A.

<sup>1</sup>Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela

\*E-mail: angela.cortina@usc.es

<sup>2</sup>Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería

### Resumen

Las microalgas son la base de la cadena trófica en acuicultura además de una fuente potencial de compuestos de interés biotecnológico y han sido propuestas como la vía más rentable de producción de biodiesel. Por ello es de gran interés desarrollar sistemas de cultivo que permitan alcanzar máxima productividad y abaratar los costes de producción. Aunque últimamente se ha mejorado mucho el diseño y manejo de los fotobiorreactores (FBRs), existen pocos datos comparativos de los distintos modelos en uso para identificar los sistemas más eficientes, siendo éste el objetivo del presente trabajo. Se comparó el crecimiento de la microalga *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO en una bolsa cilíndrica tradicional de 400 L y 60 cm de diámetro, en FBR-bolsa plana de 200 L con 5 cm de paso de luz y en una columna de metacrilato de 100 L y 25 cm de diámetro. Estos prototipos, diseñados por la UAL, están situados en un invernadero en la EE Las Palmerillas (Fundación Cajamar, Almería) con luz natural, control de temperatura para no superar 27 °C y enriquecimiento del aire con CO<sub>2</sub> para mantener el pH en 7,6. El seguimiento de la densidad celular finalizó cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria.

No hay diferencias significativas en la densidad máxima alcanzada entre el FBR bolsa plana y la columna, con 44,25±1,07 células·mL<sup>-1</sup> en la bolsa plana y 44,50±0,7 células·mL<sup>-1</sup> en la columna. Sin embargo, el sistema tradicional de cultivo en bolsa cilíndrica no superó los 12,68±1,9 células·mL<sup>-1</sup>. Estas diferencias en densidad se deben probablemente a que la



cantidad de luz por célula disponible es mayor en los sistemas más productivos debido a una mayor relación superficie/volumen. Por lo tanto, y debido a la diferencia de volumen existente entre los distintos sistemas, la producción del FBR panel es aproximadamente el doble que la columna y la bolsa cilíndrica con  $8,85 \cdot 10^{12}$  células totales en la Panel frente a  $4,45 \cdot 10^{12}$  células totales en la columna y  $5,07 \cdot 10^{12}$  células totales en la cilíndrica. Como conclusión, el sistema de bolsa plana se presenta como un sistema eficiente y manejable para obtener biomasa microalgal.

## Palabras clave

Microalgas, fotobiorreactores, *Isochrysis*.

## Introducción

En los últimos años ha habido un creciente protagonismo de las microalgas para sectores diversos como la acuicultura, la cosmética o la nutrición, especialmente porque son fuente de moléculas de interés biotecnológico, como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y pigmentos. Además, debido a la necesidad de diversificación en la producción de energía, se ha centrado el interés en las microalgas para la producción de biodiesel, ya que se las considera la fuente más rentable (Mata *et al.*, 2010). Para poder dar respuesta a la creciente demanda, es necesario desarrollar y comparar nuevos sistemas de cultivo masivo que permitan conseguir altas productividades con un manejo sencillo y bajos costes de producción. En el sector de la acuicultura, la producción de microalgas para larvas y semilla de moluscos, alimento vivo en la cadena trófica de peces y crustáceos así como aguas verdes, se realiza generalmente con biomasa producida *in situ* en los criaderos. *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO, una de las microalgas más utilizadas en acuicultura por su excelente perfil nutricional (Ferreira *et al.*, 2008), se cultiva *in situ* en bolsas plásticas cilíndricas poco eficientes y que producen biomasa de baja calidad nutricional. Se han ensayado otros sistemas para cultivo masivo para esta microalga, más productivos y con luz natural, como el cultivo en *raceway* (Boussiba, *et al.*, 1988), en columnas (Qiang & Richmond, 1994), reactores planos de vidrio (Zhang & Richmond, 2003) y en fotobiorreactores tubulares (Molina Grima *et al.*, 1994). La optimización de los parámetros físicos de cultivo en bolsas de polietileno con paso de luz reducido, en sustitución de los sistemas planos de vidrio (Sierra *et al.*, 2008), las presenta como una opción interesante para el cultivo de microalgas, de tal forma que es necesario realizar una comparación con los diseños existentes, en condiciones de producción reales, para identificar los modelos más eficientes.

## Objetivo

El objetivo fue comparar el crecimiento de la microalga *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO en distintos sistemas de cultivo para determinar su eficiencia.

## Materiales y métodos

La microalga marina *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO (CCMP1324) se cultivó en agua de riego ultrafiltrada y ozonizada a la que se añadieron 35 g·L<sup>-1</sup> de NaCl, fertilizante basado en NaNO<sub>3</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, oligoelementos, hasta una concentración de nitrógeno de 12 mM, y las vitaminas tiamina y B<sub>12</sub> en una concentración de 140 y 12 µg·L<sup>-1</sup>. Los sistemas de cultivo, una columna de 100 L y 25 cm de diámetro (Sánchez Mirón *et al.*, 2002), un sistema de panel consistente en una bolsa de polietileno de 200 L y 5 cm de paso de luz (Sierra *et al.*, 2008) y el sistema tradicional de cultivo en bolsa de polietileno de 400 L y 60 cm de diámetro, son un diseño propio del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería. Estos se situaron en un invernadero en la EE Las Palmerillas, con aireación, control de temperatura a 27 °C y pH 7,6 por enriquecimiento del aire con CO<sub>2</sub>.

## Resultados

En todos los sistemas, la densidad máxima se alcanza a los 9 días de iniciar el cultivo. Ningún sistema estaba limitado por nutrientes o CO<sub>2</sub> por lo que probablemente, el factor limitante del crecimiento fue la luz. Todos los sistemas presentan un retardo en el inicio del crecimiento de 4 días, antes de empezar a dividirse exponencialmente.

Como se observa en la figura 1, los sistemas que permiten que se alcance la mayor densidad son la bolsa plana y la columna, no habiendo diferencias significativas entre las densidades de ambos sistemas (44,50±0,7·10<sup>6</sup> células·mL<sup>-1</sup> en la columna de 100 L y 44,25±1,07·10<sup>6</sup> células·mL<sup>-1</sup> en la bolsa plana. Sin embargo, como ambos sistemas son igualmente productivos, la bolsa plana, que tiene el doble de volumen, permite el cosechado del doble de células en el mismo periodo de tiempo. La bolsa cilíndrica tan solo alcanzó 12,68±1,9·10<sup>6</sup> células·mL<sup>-1</sup>, demostrando la baja productividad de estos sistemas (1,4·10<sup>9</sup> células·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup>

frente a una media de  $4,93 \cdot 10^9$  células  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\cdot$  día<sup>-1</sup> alcanzada en la columna y la bolsa plana). Debido a esta baja densidad, hace falta 4 veces más volumen para obtener un cosechado similar que el que se obtiene en la columna (Fig. 2).

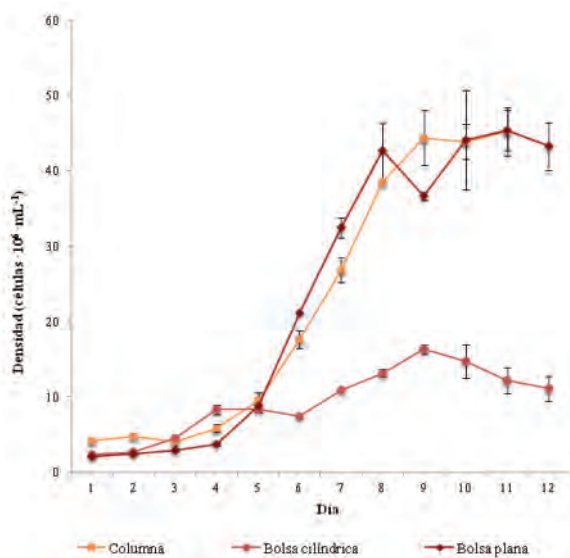


Figura 1.- Evolución de la densidad en los distintos sistemas.

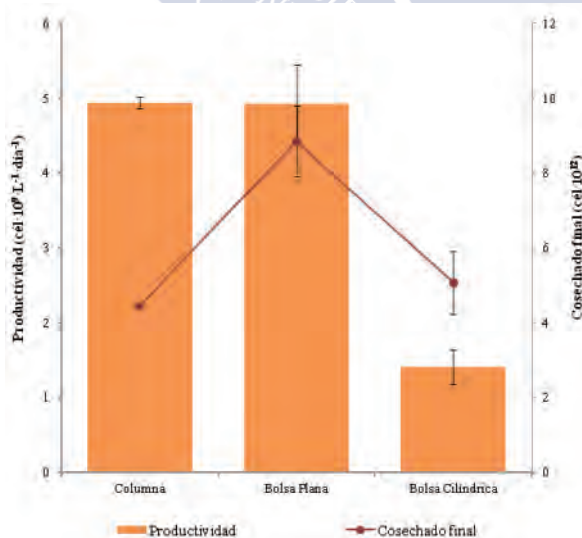


Figura 2.- Productividad y producción total en los sistemas de cultivo.

## Discusión

El retraso inicial de 4 días en el crecimiento ya se observó para esta especie en cultivos con luz natural (Molina-Grima *et al.*, 1994; Bergeijk *et al.*, 2003) y se atribuye a la fotoinhibición debida al incremento de la luz en el cultivo a causa de la dilución del inóculo. Sin embargo, tras este período, T-ISO creció con normalidad en todos los sistemas. Las columnas de burbujeo normalmente se utilizan en interior, con luz artificial (Chini-Zittelli *et al.*, 2003; Oncel & Sukan, 2008; Ranjbar *et al.*, 2008) pero, en el presente trabajo, el cultivo con luz natural para T-ISO se muestra posible en este sistema y permite obtener cultivos densos. La densidad alcanzada en la columna de 100 L es similar a la obtenida en cultivos densos de menor volumen en laboratorio (Seixas *et al.*, 2008) aunque el volumen es mucho mayor en la columna, probablemente debido a que el diámetro de los sistemas es similar, igualando la cantidad de luz recibida por célula. De la misma manera, no hay diferencias significativas con la bolsa plana de 200 L, a pesar del incremento de volumen. Obtener una densidad similar en sistemas con volúmenes inferiores y el fracaso productivo de la bolsa cilíndrica pueden ser causados por la menor cantidad de luz disponible por célula, debido a una menor relación superficie/volumen. Varios autores (Qiang & Richmond, 1994; Chini-Zittellin *et al.*, 2003; Zhang & Richmond, 2003) también atribuyen una mayor productividad al incremento de la luz por célula, ya sea por incremento de la iluminación incidente o por reducción del paso de luz del reactor.

La baja productividad de las bolsas cilíndricas de elevado diámetro para el cultivo de microalgas ya es conocida (Tredici, 1999) y sin embargo es un sistema frecuente de cultivo debido a su bajo coste. Esto se debe a que la mayoría de los sistemas de cultivo son caros y de complicado manejo. De hecho, la mayoría de los sistemas planos se elaboran con materiales de precio elevado como metacrilato (Fábregas *et al.*, 2002; Tamburic *et al.*, 2011), frágiles como el vidrio (Zhang & Richmond, 2003) o difíciles de limpiar y de deterioro rápido como el policarbonato. A pesar de esto, los reactores planos, con una elevada relación superficie/volumen son mejor opción que las bolsas tradicionales porque, además del mejor aprovechamiento de la luz, se pueden escalar sin perder productividad, alargando el sistema. Además son los diseños que mejor gestionan la eliminación del O<sub>2</sub>, el reparto de nutrientes y la evitación de la sedimentación (Sierra *et al.*, 2008; Grobbelaar, 2009). La bolsa plana de polietileno de 5 cm resultó 3,5 veces más productiva que la cilíndrica, con costes similares de producción y mantenimiento, permite mejorar la productividad *in situ* y por lo tanto reducir los costes de producción de microalga, que para un criadero pueden alcanzar el 33% de los costes totales (Coutteau & Sorgeloos, 1993).

Densidades similares a las obtenidas en la bolsa plana y la columna también se han

conseguido en sistemas abiertos. En un reactor tipo *raceway*, con elevada relación superficie/volumen (Boussiba *et al.*, 1988), se consiguieron  $43 \cdot 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> en 12 días, con un inóculo similar. Kaplan *et al.* (1986), en miniestanques de 150 L con iluminación natural, consigue una densidad máxima de  $50 \cdot 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, a pesar de que en sistemas abiertos también se pueden obtener elevadas productividades, en acuicultura este tipo de producción no es viable en localizaciones con elevada evaporación o riesgo de precipitación, no asegurando además un cultivo fiable a largo plazo, ya que hay mayor riesgo de colapso por predación, competición con otras especies o contaminación bacteriana.

## Conclusiones

La bolsa plana de 200 L se presenta como un sistema eficiente y manejable para la obtención de biomasa de *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO cuyo cultivo masivo es altamente productivo. Así mismo, la columna también permite obtener cultivos densos con un mayor control sobre la producción, aunque con mayor coste y dificultad de escalado.

## Bibliografía

- Boussiba S., Sandbank E., Shelef G., Cohen Z., Vonshak A., Ben-Amotz A., Arad S., Richmond, A. 1988. Outdoor cultivation of the marine microalga *Isochrysis galbana* in open reactors. *Aquaculture*, 72: 247-253.
- Chini-Zittelli G., Rodolfi L., Tredici, M.R. 2003. Mass cultivation of *Nannochloropsis sp.* in annular reactors. *Journal of Applied Phycology*, 15: 107-114.
- Coutteau P., Sorgeloos P. 1993. Substitute diets for live algae in the intensive rearing of bivalve mollusk-a state of the art report. *World Aquaculture*, 24: 45-52.
- Fábregas J., Maseda A., Domínguez A., Ferreira M., Otero A. 2002. Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light : dark cycle. *Biotechnology Letters*. 24: 1699-1703.
- Ferreira M., Fábregas J., Otero A. 2008. Enriching rotifers with "premium" microalgae. *Isochrysis aff. galbana* clone T-ISO. *Aquaculture*. 279: 126-130.
- Grobbelaar J.U. 2009. Factors governing algal growth in photobioreactors: the "open" versus "closed" debate. *Journal of Applied Phycology* 21: 489-492.
- Kaplan D., Cohen Z., Abeliovich A. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*,

*Biomass.* 9: 37-48.

- Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14: 217-232.
- Molina Grima E., Pérez J.A.S., Camacho F.G., Sánchez J.L.G., Fernández F.G.A., López Alonso D.L. 1994. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 37: 159-166.
- Oncel S., Sukan F.V. 2008. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Artrospira platensis* (*Spirulina platensis*), *Bioresource technology*, 99: 4755-4760.
- Qiang H., Richmond A. 1994. Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoor in a glass column photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 6: 391-396.
- Ranjbar R., Inoue R., Shiraishi H., Katsuda T., Katoh S. 2008. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochemical engineering journal*, 39: 575-580.
- Sánchez Mirón A., Cerón García M.C., García Camacho F., Molina Grima E., Chisti Y. 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 1015-1023.
- Seixas P., Rey-Méndez M., Valente L., Otero A. 2008. Producing juvenile Artemia as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*, 283: 83-91.
- Sierra E., Acien F.G., Fernández J.M., García J.L., González C., Molina E. 2008. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 38: 136-147.
- Tamburic B., Zemichael F.W., Crudge P., Maitland G.C., Hellgardt K. 2011. Design of a novel flat-plate photobioreactor system for green algal hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 6: 6578-6591.
- Tredici M.R. 1999. Photobioreactors. In: Flickinger M.C. and Drew S.W. (eds), *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. J. Wiley & Sons, New York, pp. 395-419.
- Van Bergeijk S.A., Salas-Leiton E., Canavate J.P. 2010. Low and variable productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte *Isochrysis aff. galbana* (T-iso) in outdoor tubular photobioreactors. *Aquacultural Engineering*, 43: 14-23.
- Zhang C., Richmond A. 2003. Sustainable, high-yielding outdoor mass cultures of *Chaetoceros muelleri* var. *subsalsum* and *Isochrysis galbana* in vertical plate reactors. *Marine Biotechnology*, 5: 302-310.





## Comparación del crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO en distintos modelos de fotobiorreactor

Cortina-Burgueño, A.<sup>1</sup>, Nascimento, P.<sup>1</sup>, Freire, I.<sup>1</sup>, Acián, F. G.<sup>2</sup>, y Otero, A.<sup>1</sup>, e-mail: angela.cortina@usc.es  
<sup>1</sup>Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, España  
<sup>2</sup>Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería, España

Las microalgas son la base de la cadena trófica en acuicultura además de una fuente potencial de compuestos de interés biotecnológico y han sido propuestas como la vía más rentable de producción de biodiesel. Por ello es de gran interés desarrollar sistemas de cultivo que permitan alcanzar máxima productividad y abaratar los costes de producción. Aunque últimamente se ha mejorado mucho el diseño y manejo de los fotobiorreactores (FBRs), existen pocos datos comparativos de los distintos modelos en uso para identificar los sistemas más eficientes.

### Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue comparar el crecimiento de la microalga marina *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO en distintos sistemas de cultivo masivo para determinar la eficiencia de cada uno.

### Material y métodos

- La microalga marina *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO (CCMP1324) se cultivó en agua de riego a la que se añadió 35 g·L<sup>-1</sup> de NaCl, abono Welgro Hidroponic hasta una concentración de nitrógeno de 12 mM y vitaminas tiamina y B<sub>12</sub>, en una concentración de 140 y 12 µg·L<sup>-1</sup>.
- Los fotobiorreactores, diseño propio del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, se situaron en un invernadero en la EE Las Palmerías, con aireación, control de temperatura para no superar 27°C y mantenimiento de pH en 7,6 por enriquecimiento del aire con CO<sub>2</sub>.



Imagen 1. Columnas de 100L y 25 cm de diámetro.

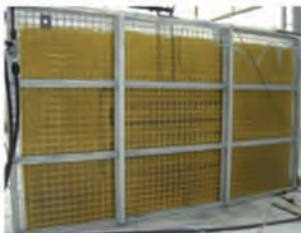


Imagen 2. Sistema de Bolsa plana. Bolsa de polietileno de 200 L y 5 cm de paso de luz



Imagen 3. Bolsa de polietileno de 400 L y 60 cm de diámetro.

### Resultados

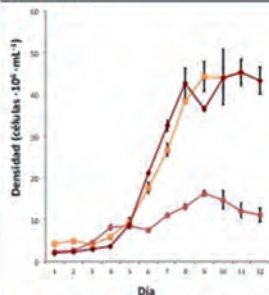


Figura 1. Evolución de la densidad de T-ISO en los distintos sistemas de cultivo.

- A pesar de la diferencia de volumen, no hay diferencias significativas en la densidad máxima alcanzada entre la columna de 100 L (44,50±0,7 células·mL<sup>-1</sup>) y la bolsa plana de 200 L (44,25±1,07 células·mL<sup>-1</sup>). La bolsa cilíndrica tan solo alcanzó 12,68±1,9 células·mL<sup>-1</sup> probablemente a la menor cantidad de luz disponible debido a una menor relación superficie/volumen.

- Por lo tanto, la productividad de la columna y la bolsa plana también son similares cerca de 5·10<sup>9</sup> células·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup> y son 3,5 veces más productivos que la bolsa cilíndrica.

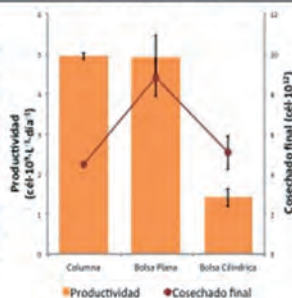


Figura 2. Productividad y producción total en los distintos sistemas de cultivo.

### Conclusiones

El sistema Panel-Bolsa se presenta como un sistema eficiente y manejable para la obtención de biomasa de *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO cuyo cultivo masivo en este sistema es altamente productivo.



## ***Quorum quenching*: una alternativa al uso de antibióticos en Acuicultura**

Otero<sup>1</sup> A., Romero M., Mayer C., Muras A., Nascimento P., Rejero I.

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología/CIBUS, Campus Vida, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela. España.

Anamaria.otero@usc.es

### RESUMEN

Uno de los principales desafíos para el desarrollo sostenible de la acuicultura es la búsqueda de alternativas al uso de antibióticos para el control de la mortalidad derivada de las infecciones bacterianas, tanto en las fases de engorde como en cultivos larvarios. Una de las estrategias más prometedoras como alternativa a los antibióticos, es la inactivación de la capacidad patogénica de las bacterias mediante la interceptación de los procesos de comunicación bacteriana que controlan la virulencia, denominados *Quorum Sensing* (QS). La interceptación del QS o *Quorum Quenching* (QQ) es de especial interés en el campo de la acuicultura, ya que numerosas bacterias patógenas de peces utilizan este mecanismo para coordinar la infección. Trabajos previos realizados por nuestro grupo permitieron identificar la cepa *Tenacibaculum sp. 20J* con una elevada capacidad de QQ enzimático, cuya aplicación ha sido patentada. La aplicación de células vivas de la cepa 20J en cultivos larvarios de almeja babosa, almeja fina y ostra plana produjo una mejora de la supervivencia en todos los casos, igualando o superando el efecto de la adición de antibiótico. La inclusión del 0,5% de biomasa de 20J en piensos permitió una rápida eliminación de síntomas en cultivos de juveniles de rodaballo, infectados experimentalmente con *Vibrio anguillarum*, que persistieron con el pienso control, lo que demuestra la viabilidad de la aplicación industrial de QQ para el control de las infecciones bacterianas.



## PALABRAS CLAVE

*Quorum sensing*, *Quorum quenching*, anti-patogénicos, lactonasa, ingrediente funcional.

## INTRODUCCIÓN

Los continuos episodios de mortandad, que merman notablemente la producción, son uno de los mayores problemas de la acuicultura marina. Hasta ahora la búsqueda de soluciones para la eliminación de esta flora bacteriana se ha centrado en el uso de antibióticos, el desarrollo de vacunas y el tratamiento del agua de cultivo. El uso abusivo de antibióticos, en algunos casos usados de forma profiláctica, ha conducido a la aparición de numerosas resistencias, y como consecuencia, han dejado de ser efectivos (Alderman *et al.*, 1998), provocando además problemas de salud ambiental y humana Cabello (2006). Una alternativa al uso de antibióticos es la inactivación de los sistemas de comunicación bacteriana denominados “quorum sensing” (QS). Esta comunicación se basa en la producción de pequeñas moléculas de señalización química denominadas auto-inductores (Fuqua *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2007). Debido a la gran cantidad de bacterias patógenas que coordinan la expresión de factores de virulencia mediante sistemas de QS, se ha propuesto la interceptación de este tipo de comunicación bacteriana como un método prometedor de control de patógenos bacterianos (Dong y Zhang 2005; Dong *et al.*, 2007), especialmente en el campo de la acuicultura (Defoird *et al.*, 2004). Esta nueva estrategia anti-patogénica ha sido denominada de forma genérica *Quorum Quenching* (QQ) y no afecta a la supervivencia del patógeno, por lo que este tipo de tratamiento no generaría resistencias.

Estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio permitieron la obtención de una colección de 20 cepas bacterianas marinas con actividad QQ de amplio espectro (Romero, 2010; Romero *et al.*, 2011; 2012). Una de las cepas de mayor interés debido a su elevadísima capacidad de degradación de señales autoinductoras fue la cepa *Tenacibaculum sp. 20J* (CECT 7426), cuya efectividad para el control de infecciones en el campo de la acuicultura ha sido probada en este trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVO DE CEPA *TENACIBACULUM SP. 20J*

*Tenacibaculum sp. cepa 20J* (CECT 7426) se cultivó de forma rutinaria en agar marino o caldo marino (AM/ CM, Difco) a 22°C o en caldo de triptona y soja suplementado con una disolución de sal de mar (TSC+SM, 30 g/L). Las bacterias añadidas a los tanques de cultivo de larvas de moluscos procedían de un cultivo de 24 horas de 15 mL, el cual tras ser centrifugado se resuspendió en 15 mL de agua de mar estéril, obteniéndose una concentración de  $2 \times 10^9$  cel/mL ( $O.D._{600} = 1,9$ ). La biomasa utilizada para la elaboración de los piensos se produjo en fermentadores de 200 litros en medio TSA+SM en la empresa CZ Veterinaria (Porriño, Pontevedra). La biomasa se pre-concentró mediante centrifugación continua y finalmente se centrifugó en tubos Falcon de 50 mL congelándose para su posterior liofilización y utilización en la elaboración del pienso.

### CULTIVO DE LARVAS DE MOLUSCOS

Las larvas de *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) proceden de una puestade 64 reproductores de la ría de Noia. Las larvas de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) fueron obtenidas de 180 reproductores de Taboeiro (Noia) acondicionados unas semanas en el criadero de la cofradía de Noia y sometidos después a choques térmicos para inducir la puesta. Los huevos fueron fecundados a una densidad de 5-10 huevos/ml. Las larvas de *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) proceden de una muestra de 132 reproductores obtenida en las mismas condiciones que las larvas de *V. pullastra*.

Los experimentos se iniciaron a las 48 horas del desove, edad a la que las larvas llegan a la fase de larva D veliger. El cultivo larvario se realizó en circuito cerrado en tanques de 2.300 mL, con agua de mar filtrada a 5  $\mu$ m a una temperatura ambiente de 18-22°C con aireación. Los números iniciales de larvas fueron: 6 larvas/mL de *Ostrea edulis*, 30 larvas/mL de *Venerupis pullastra* y 18 larvas/mL de *Ruditapes decussatus*. Se cambió el agua de los cultivos cada dos días mediante filtración, momento en el que se añadieron nuevas microalgas y la cepa 20J. Las larvas fueron alimentadas con una mezcla de *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica* siguiendo las proporciones aconsejadas por la FAO (Helm *et al.*, 2006). Las microalgas se cultivaron en medio ALGAL 8 mM en régimen semicontinuo, reemplazando diariamente un 10% del volumen (Otero y Fábregas, 1997). Se aplicaron cuatro tratamientos: dos concentraciones de la cepa 20J:  $10^3$  y  $10^5$  UFCs/mL, otro en el que se añadió cloranfenicol (2,5mg/L), y un control sin tratamiento, estableciéndose tres réplicas para cada condición (Fig. 1).



Figura 1.- Tanques de cultivo de las larvas de moluscos.

El muestreo de las larvas para estimar la supervivencia se realizó a los 9 días del comienzo del experimento para las larvas de almeja y a los 15 para las larvas de ostra. Se filtró la totalidad del cultivo con una malla de tamaño adecuado ajustándose a un volumen conocido. Se tomaron tres muestras de 1 mL de cada réplica que fueron introducidas en una cámara de recuento Sedgewick-Rafter para el recuento de las larvas.

#### DESAFÍOS DE JUVENILES DE RODABALLO *SCOPHTHALMUS MAXIMUS* (LINNAEUS, 1758) CON *VIBRIO ANGUILLARUM*

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del ECIMAT (Isla de Toralla, Universidad de Vigo) en tanques de PVC rectangulares con esquinas redondeadas de 100 L con 75 L de agua, en cada uno de los cuales se estabularon 30 peces (Fig.2). Se siguió un modelo experimental de infección por co-habitación, de forma que se infectaron 10 peces de cada tanque mediante inyección intraperitoneal de  $2,6 \times 10^6$  UFCs (0,1 mL) de una solución de *Vibrio anguillarum* (cepa 90-11-287 Pedersen *et al.*, 1997) en solución salina estéril. Se establecieron 3 tanques para cada uno de los tratamientos: pienso control y pienso suplementado con 0,5% de células liofilizadas de la cepa 20J. Los piensos fueron fabricados por la unidad de piensos experimentales de la Universidad de Almería.

#### CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos fueron calculados como las medias de las tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar (DS). Los análisis estadísticos de ANOVA y Test de Tukey (HSD) de múltiples comparaciones hecho a posteriori, a un nivel de significación del 0.05 fueron analizados con el paquete estadístico R.2.12.2.



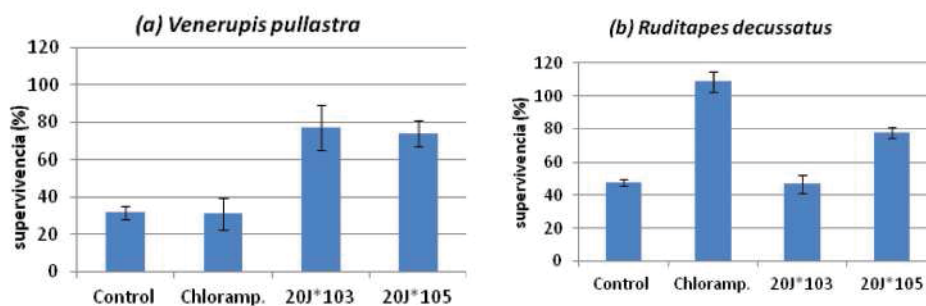


**Figura 2.-** Sistema de cultivo de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) con *Vibrio anguillarum*.

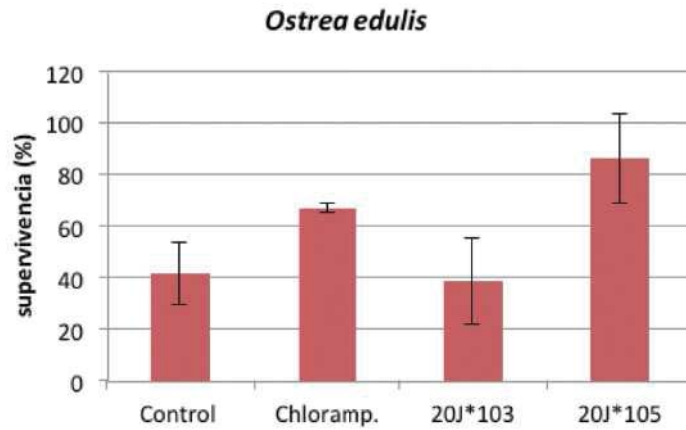
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adición de la cepa 20J mejoró significativamente la supervivencia de las larvas con respecto al control en las 3 especies de moluscos probadas: almeja babosa, almeja fina y ostra plana, y en alguno de los casos produjo resultados incluso mejores que la adición de cloranfenicol, aunque la dosis óptima varió dependiendo de la especie de molusco tratada. En el caso de la almeja babosa (*Venerupis pullastra*) hubo claras diferencias entre tratamientos para la supervivencia larvaria después de 9 días de cultivo (ANOVA,  $F_{3,32} = 21.567$ ,  $P = 7.924 \cdot 10^{-8}$ ), siendo la supervivencia larvaria en los tratamientos con la cepa 20J considerablemente más alta que la del control y la tratada con cloranfenicol (Fig. 3a), alcanzando valores superiores al 70% frente al 31,7% del control. Las diferentes concentraciones de la cepa 20J no mostraron diferencias entre ellas ( $p > 0.05$ ). Es interesante hacer notar que en esta especie, en la que la cepa 20J tuvo efectos más positivos, las condiciones de cultivo fueron claramente estresantes, ya que la densidad de población inicial (30 larvas/mL) se hallaba muy por encima de la empleada en explotaciones comerciales (10-15 larvas/mL; Helm *et al.*, 2006). En los cultivos con almeja fina (*Ruditapes decussatus*) el tratamiento con antibiótico es el que presentó mejores resultados, seguido por los cultivos con 20J a la concentración de  $10^5$  UFC/mL (Fig. 3b). Todos ellos fueron significativamente superiores al control ( $P < 0.05$ ). En esta especie los cultivos larvarios se establecieron a una concentración de 18 larvas/mL, una

concentración semejante a las usadas en condiciones comerciales (10- 15 larvas/ml; Helm, *et al.*, 2006). En el caso de las larvas de ostra plana (*Ostrea edulis*) también se cultivó control y tratado con cloranfenicol, aunque en este caso sólo resultó efectiva la dosis de  $10^5$ UFC/mL, que produjo una supervivencia del 86%, frente al 40% de supervivencia obtenido en los cultivos control (Fig. 4), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Aunque el valor medio de la supervivencia fue mayor para las larvas con 20J (86%) que el valor medio de las tratadas con cloranfenicol (66%), el error estándar de la media fue muy alto en las primeras, por lo que esta diferencia no se confirma estadísticamente ( $P > 0.05$ ). Esto sugiere que el antibiótico homogeneiza la variabilidad y disminuye la varianza entre los cultivos en las mismas condiciones. Este resultado reflejaría el modo de actuación de ambos: obtuvieron mayores supervivencias al adicionar la cepa 20J que las obtenidas en los tratamientos, ya que el cloranfenicol es un agente antibacteriano de amplio espectro que produciría un efecto más homogéneo, mientras que la cepa 20J actúa sólo sobre determinadas bacterias, por lo que su efectividad depende de la población bacteriana establecida en el tanque, que puede variar entre réplicas por pequeñas diferencias en la aireación, lavado de los tanques, etc. En cualquier caso, los efectos de los agentes antibacterianos, aunque significativos, no fueron tan marcados en este ensayo como los obtenidos en los cultivos de almeja babosa. Esto podría deberse a que los cultivos de *Ostrea* se realizaron a una densidad de 6 larvas/mL (Helm *et al.*, 2006) que es la habitual para las larvas de esta especie y no genera el estrés que, como se explicó con anterioridad, tiende a potenciar la virulencia de los patógenos en acuicultura.



**Figura 3.-** Supervivencia media de las larvas de almeja babosa (*Venerupis pullastra* (a)) y almeja fina (*Ruditapes decussatus* (b)) a los 9 días de cultivo obtenida en los cultivos control y con la adición de cloranfenicol (2,5mg/L) o de la cepa 20J en dos concentraciones: 103 y 105 UFCs/mL. Se muestran las medias de supervivencia de los 3 tanques  $\pm$  SD para cada tratamiento. Los superíndices denotan diferencias significativas (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

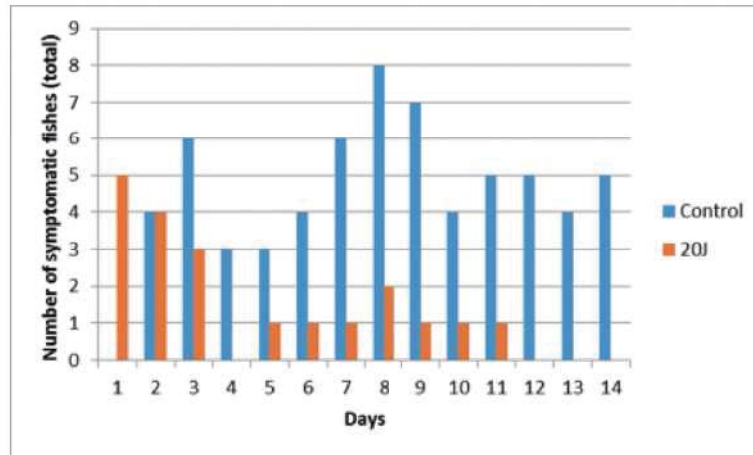


**Figura 4.-** Supervivencia media de las larvas de *Ostrea edulis* a los 15 días de cultivo obtenida en los cultivos control y con la adición de cloranfenicol (2,5mg/L) o de la cepa 20J en dos concentraciones: 103 y 105 UFCs/mL. Se muestran las medias de supervivencia de los 3 tanques  $\pm$ DS para cada tratamiento. Los superíndices denotan diferencias significativas (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **EFEECTO DE LA CEPA 20J COMO INGREDIENTE FUNCIONAL EN PIENSOS PARA LAS INFECCIONES DE PECES**

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la mortalidad de los peces, debido a la baja efectividad encontrada en el experimento de infección por co-habitación, se encontraron diferencias importantes en cuanto a la evolución del número total de peces que mostraban síntomas de infección. Mientras que en los tanques que recibieron el pienso control se mantuvo un número constante de peces con síntomas durante los 14 días en los que se realizó el seguimiento, el número de peces sintomáticos en los tanques que recibieron el pienso medicado disminuyó de forma continuada hasta desaparecer (Fig. 5). Estos datos indican una menor prevalencia de la infección en los tanques tratados con el pienso medicado con la cepa de QQ.





**Figura 5.-** Evolución del número de peces con síntomas de infección presentes en los tanques alimentados con pienso control y con pienso suplementado con liofilizado de la cepa 20J al 0,5%.

## CONCLUSIONES

La adición de células vivas de la cepa 20J en cultivos larvarios de *Ostrea edulis*, *Venerupis pullastra* y *Ruditapes decussatus* mejora la supervivencia en los cultivos, igualando o incluso mejorando el efecto de la adición de cloranfenicol, siendo el efecto más importante en la supervivencia en condiciones intensivas de cultivo.

La utilización de piensos suplementados con 0,5% de biomasa liofilizada de la cepa 20J permitió una rápida eliminación de síntomas en cultivos de juveniles de rodaballo infectados experimentalmente con *Vibrio anguillarum*, que por el contrario persistieron con el pienso control, lo que demuestra la viabilidad de la aplicación industrial de QQ para el control de las infecciones bacterianas en acuicultura.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con financiación del Fondo de Inversión en Ciencia de la

Fundación Barrié de la Maza. Agradecemos a la Cofradía de Noia y Cofradía de Aguiño su colaboración en la cesión de las larvas de moluscos y a Antonio Villanueva y Damián Costas su asistencia en el diseño y realización de los experimentos llevados a cabo en la ECIMAT.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alderman D.J., Hasting T.S. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance- potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. Technol.* 33,139-155.
- Cabello F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8,1137-1144.
- Defoirdt T. mejor poner el resto de los autores 2009. Short-chain fatty acids and poly-beta-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnol Adv*:27:680-5.
- Dong Y.H. mejor poner el resto de los autores 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil.Trans. R. Soc. B* 362:1201-1211.
- Dong Y.H., Zhang L.H. 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol* 43: 101-109.
- Fuqua W.C. mejor poner el resto de los autores 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell densityresponsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269-275.
- Helm 2006. mejor poner el resto de los autores Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 471. Roma, FAO. 184 pp.
- Otero A., Fábregas J. 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture* 159:111-123.
- Pedersen K. 1997. mejor poner el resto de los autores Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* serogroup O1 strains compared to plasmids, outer membrane protein profiles and siderophore production. *Journal of Applied Microbiology* 82:365-371.
- Romero M. 2010. Interceptación de señales de comunicación bacteriana tipo N-acilhomoserín lactona (AHL) en bacterias aisladas del medio marino. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 379 pp.
- Romero M. mejor poner el resto de los autores 2011. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75:205-217.
- Williams P. 2007. mejor poner el resto de los autores Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1119-1134.





# Synergistic effect of UV radiation and nutrient limitation on *Chlorella fusca* (Chlorophyta) cultures grown in outdoor cylindrical photobioreactors

I. Malpartida<sup>1</sup>, C. G. Jerez<sup>1</sup>, M. M. Morales<sup>2</sup>, P. Nascimento<sup>3</sup>, I. Freire<sup>3</sup>, J. Ezequiel<sup>4</sup>,  
R. M. Rico<sup>1</sup>, E. Peralta<sup>1</sup>, J. R. Malapascua<sup>1</sup>, Y. Florez<sup>1</sup>, J. Masojidek<sup>5</sup>,  
R. Abdala<sup>1</sup>, F. L. Figueroa<sup>1</sup>, E. Navarro<sup>6,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, University of Almería, Almería, Spain

<sup>3</sup>Department Microbiology and Parasitology, Faculty of Biology-CIBUS, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>4</sup>Departamento de Biología and CESAM – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>5</sup>Academy of Sciences, Institute of Microbiology, Opatovickýmlýn, 37981 Trěboň, Czech Republic

<sup>6</sup>Pyrenean Institute of Ecology (CSIC), Av. Montañana 1005, Zaragoza 50059, Spain

**ABSTRACT:** This study assessed the interactive effects of UVR and nutrient depletion on *Chlorella fusca* cultures on the production and accumulation of particular biomolecules. To accomplish this, algae were grown for 5 d in outdoor thin-layer cascade cultivators under 3 nutrient treatments (full nutrients, –N and –S) and then transferred to outdoor cylindrical photobioreactors for another 5 d. Cultures were then exposed to full solar radiation (PAB) and decreased UVR. During the last 5 d, bio-optical properties, photosynthetic activity, pigments, biochemical composition and oxidative stress were assessed. Initially, nutrient depletion caused changes in productivity and cell number in a manner that affected biochemical composition. After 3 d, the percentage of lipids in the cultures under N deprivation reached values appropriate for being used as feed or food additives or for energy applications (35% of lipid content), regardless of the light conditions. A longer exposure (5 d) resulted in interactive effects of light and nutrient conditions. Specifically, PAB increased lipid content in all cases (1.3- to 2.3-fold), but particularly under S deprivation. Longer exposure to PAB also increased oxidative stress in UVR and nutrient-limited treatments (–N and –S). These results showed that the benefits expected from nutrient depletion (increase in biomolecule content e.g. lipids, carbohydrates and pigments) were modulated by the negative effects of algal UVR acclimation costs.

**KEY WORDS:** Bio-optic · *Chlorella fusca* · *In vivo* chlorophyll fluorescence · Photosynthetic pigments · UV radiation · Lipids · Lipid peroxidation · Proteins · Biochemical composition

## INTRODUCTION

During the last 50 yr, microalgae have been cultivated in both out- and indoor systems to produce biomass used as food or feed or for the extraction of high-value molecules. Today, about 20 different

genera of algae are used to produce compounds of interest, including carotenoids, fatty acids, polysaccharides and antioxidant substances, or to obtain biofuels (Tredici 2010, Stengel et al. 2011, Wilhelm & Jakob 2011, Sharma et al. 2012). Accordingly, the economic sectors impacted by such biotechnology

\*Corresponding author: enrique.navarro@ipe.csic.es

range from the food, cosmetic, energy, agri- and horticultural sectors to human health (De Pauw & Persoone 1988, Stengel et al. 2011, Adarme-Vega et al. 2012). Microalgae are cultured using different systems, commonly called photobioreactors, which allow for the control of the environmental variables affecting algal growth. Changes from optimal conditions (i.e. in light quantity and quality and nutrient limitation) may result in algal stress, requiring biochemical and metabolic adjustments that may result in the synthesis and accumulation of some of these molecules of interest. A few reports are available on the effects of UVR, nutrient availability, or other physiological processes (oxidative stress, membrane damage, carbon [C] allocation and photosynthesis), considering species from the genus *Chlorella* (Malanga & Puntarulo 1995), *Nannochloropsis* (Sobrinho et al. 2005), *Scenedesmus* (Kasai & Arts 1998, Germ et al. 2002), *Platymonas* (Yu et al. 2004) and the cyanobacteria *Nostoc* and *Arthrospira* (Helbling et al. 2006). To date, however, no study has focused on outdoor microalgal culture systems in the context of modifying both UVR intensity and nutrient availability.

In outdoor cultures, microalgae can be exposed to elevated irradiance ( $>2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) of photosynthetic active radiation (PAR,  $\lambda = 400$  to  $700 \text{ nm}$ ) and UVR ( $\lambda = 280$  to  $400 \text{ nm}$ ). Solar UVR is an environmental variable with a range of deleterious effects on microalgae. In particular, UVR, through different mechanisms, causes DNA damage (Buma et al. 1996, Helbling et al. 2006) and decreases C incorporation rates by reducing photosystem II (PSII) efficiency, the RUBISCO pool (McKenzie et al. 2011) and the carboxylation process (Beardall & Raven 2004). However, positive effects involve the increase of C uptake under relatively low UVR levels (Nilawati et al. 1997, Barbieri et al. 2002) or DNA damage repair mediated by UVA radiation (Karentz et al. 1991). Indeed, many planktonic organisms are rather resistant to UVR, with only negligible cellular effects (Cabrera et al. 1997). Indirect effects might be viewed as positive, such as the breakdown of dissolved organic matter by UVR, which may result in an increase in nutrient supply. The vulnerability of plants to UVR is the result of a balance between photodamage, photoprotection and the photorepair mechanisms of DNA mediated by PAR and UVR (Mitchell & Karentz 1993, Murata et al. 2007), to the accumulation of lipidic and water-soluble antioxidants and the activation of antioxidant enzymes (Cockell & Knowland 1999) and to the accumulation of UV screen photoprotectors (Korbee et al. 2010). Since the irradiance of UVB radiation reaching Earth's surface is expected to change in the

next decades (Hegglin & Shepherd 2009, Watanabe et al. 2011), concerns have focused on assessing and forecasting the potential impacts of such changes on the productivity of cultivated plants (Schultz 2000, Golaszewski & Upadhyaya 2003). In addition, because of the ecological and economic importance of algae and macrophyta, their responses to UVR have been extensively assessed in natural environments (Häder & Figueroa 1997, Wulff et al. 2000, Helbling et al. 2003, Navarro et al. 2007, Pessoa 2012) and under artificial conditions (Sobrinho et al. 2004, Korbee et al. 2010). Other studies demonstrated that algal acclimation to UVR entails metabolic costs in the form of reduced growth that may facilitate the effects of other stressors, such as heavy metals (Navarro et al. 2008). Furthermore, UVR may promote the accumulation of secondary metabolites in algae (i.e. high-value compounds), while reducing biomass productivity (Figueroa et al. 2008). In contrast, culture under artificial light or in greenhouses with UV cut-off filters reduces the accumulation of high-value compounds, but conversely, productivity can increase (Figueroa et al. 2006). Thus, although mass algal cultivation is concentrated at latitudes with high global solar exposure throughout the year (Tredici 2010, Ación Fernández et al. 2012), insufficient information is available about the effects of UVR on the productivity of outdoor microalgae cultures and even less is known about the synergistic effects of UVR and nutrient limitation.

Nutrient deprivation (-S, -P, -N, etc.) results in a decrease of growth rate and photosynthetic rates by both direct (reduction of the synthesis of certain biomolecules) and indirect effects (reduction of protection or repair mechanisms). S is needed in protein synthesis (Grossman & Takahashi 2001) but also in a wide range of secondary cell compounds, including glucosinolates and sulpholipids (Leustek & Saito 1999). S deprivation may result in the cessation of algal cell division (Hase et al. 1959) and in the degradation of endogenous protein and starch (Melis et al. 2000, Zhang et al. 2002, Kosourov et al. 2003). The depletion of phosphate can increase photoinhibition and reduce the capacity for photoprotection against UV radiation (Carrillo et al. 2008). N is needed for the synthesis of proteins, and N deprivation increases the sensitivity of photosynthesis to UVR in several organisms (Litchman et al. 2002, Bouchard et al. 2008) due to less efficient repair of UVB damage that depends on N compounds. Fluorescence-based measurements of phytoplankton photosynthesis have been used to assess N limitation, which causes a decrease in the PSII photochemical quantum yield that

reduces the efficiency of light-harvesting, energy transduction and CO<sub>2</sub> fixation (Kolber et al. 1988, Berges et al. 1996, Geider et al. 1998, Young & Beardall 2003). Aquatic organisms have several mechanisms to counteract and repair UVR effects, such as the accumulation of UV-absorbing substances with antioxidant properties, i.e. mycosporine-like amino acids (MAAs) (Shick & Dunlap 2002), phenols and carotenoids (Goiris et al. 2012), or the effective dissipation of excess energy by the action of the xanthophyll cycle (Demmig-Adams & Adams 1996). Therefore, a lack of N would decrease the rate of repair, slowly and progressively decreasing photosynthetic efficiency (Litchman et al. 2002).

Three different methods may lead to increased yield of algal biomolecules: (1) by increasing algal cell density, (2) by increasing the intracellular accumulation of such products or (3) a combination of both. While the first method may depend, largely, on the type of photobioreactor, the second and third may rely more on the growing conditions and stress to which algae are exposed. Therefore, knowledge about the effects of changes in culture conditions that may, in turn, change the synthesis and quantity of certain molecules would be of great interest for both basic and applied research.

In this study, *Chlorella fusca* (Chlorophyta) cultures were grown during 5 d in outdoor thin-layer cascade (TLC) cultivators under 3 nutrient treatments (full nutrients, -N and -S). The cultures were then exposed to different light conditions, including full solar radiation (PAB) or decreased UV radiation (P(AB-)). To evaluate the combined effect of UVR and nutrient depletion, different functional indicators were used (Figueroa et al. 2013). Based on the rationale previously presented, the working hypothesis was that the expected benefits from nutrient depletion (increase of certain biomolecules, such as lipids, carbohydrates and pigments) would be modulated by negative direct effects (i.e. algal acclimation costs) and decreased biomass productivity provoked by an increased exposure to UVR.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental set-up

*Chlorella fusca* (Chlorophyta, from the Spanish Collection of Algae) cultures were grown for 5 d in 3 outdoor TLC systems (4 m<sup>2</sup>) (see description in Jerez et al. 2014, this Theme Section) and acclimated to different nutrient conditions, i.e. full nutri-

ents (F), limited nitrogen (-N) and limited sulphur (-S). Full media contained the following (g l<sup>-1</sup>) according to Sorokin & Krauss (1958): KNO<sub>3</sub>, 1.25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1; CaCl<sub>2</sub>, 0.0835; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0498; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1143; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0882; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.0142; MoO<sub>3</sub>, 0.0071; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0157; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0049 and EDTA, 0.5. The -N treatment received only 25% of the initial nitrate concentration, while the -S treatment received 50% of the normal sulphate concentrations. After this acclimation period, samples of 1.25 l from each treatment were transferred to 18 UVR-transparent methacrylate cylinders (diameter 10 cm, height 20 cm) (see Aphalo et al. 2012). Strong aeration was applied to keep high hydrodynamic conditions in both the TLC tank (see Jerez et al. 2014) and the cylinders. Cultures in cylinders were maintained for 5 d.

Two different light conditions were set: (1) full solar radiation (natural conditions), i.e. PAR+UVA+UVB (PAB), and (2) decreased natural UVA+UVB (P[AB-]) by using cut-off filters surrounding the methacrylate cylinders (Ultraplan 395) according to Villafañe et al. (2003). The PAR irradiance in PAB was the same as in P(AB-) by use of the cut-off filter Ultraplan 295 (Villafañe et al. 2003, Aphalo et al. 2012). This design avoided any problem caused from having different PAR irradiances, e.g. differences in photoinhibition (Villafañe et al. 2003). As a result, algal cultures in PAB vessels were exposed to 75% of incident UVB and UVA radiation, whereas cultures in P(AB-) vessels were exposed to 8% of UVB and UVA. Daily temperature variations were minimized (25 to 28°C) by placing the cylinders in a thermostatically controlled water bath (Fig. 1). Three replicates were set up for each treatment.

### Solar radiation, temperature and pH measurements

Temperature was monitored using a HOBO Pro v2 Water Temperature Logger U22-001. The pH was measured using a portable pH meter (pH 3110, WTW). Incident solar irradiance was measured continuously in air using a UV-PAR multifilter radiometer NILU UV6 (Geminali). The irradiance of UVA (320 to 400 nm) and UVB (280 to 320 nm) was calculated from the data of the different UV filters according to Høiskar et al. (2003). The integrated daily irradiance (kJ m<sup>-2</sup>) was calculated for the whole duration of the experiment. The NILU UV6 is located on the roof of the building housing the Central Services

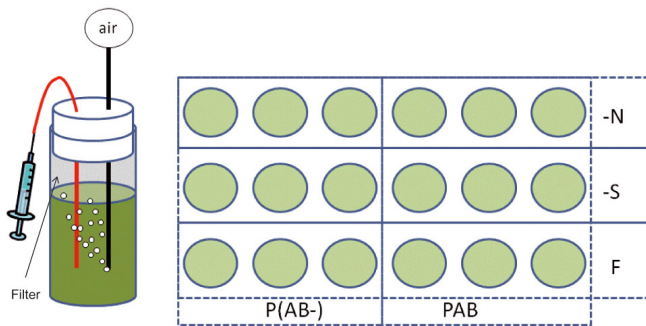


Fig. 1. Left: diagram showing the algal culture vessels equipped with an outlet syringe for sampling algal cultures and surrounded with UV cut-off filters, such as Ultraphan 295 (PAB) and Ultraphan 395 in the P(AB-) treatment. The cultures were kept under agitation by air bubbling. Right: the experimental setup of the vessels in the thermostatic bath. F: full nutrients; -N: nitrogen-limited; -S: sulphur-limited; PAB: full solar radiation and P(AB-) with the same PAR but decreased UVR. The position of the vessels was not randomly selected to facilitate daily measurement protocols. No temperature or light gradients were noticed in the bath

Research of Malaga University, where the experiments were conducted (36° 40' N, 4° 28' W).

### Bio-optical variables: PAR and UVR extinction

The irradiance of UVR (295 to 400 nm) reaching different depths in the algal cultures was measured using a UV203 radiometer (MACAM, Scotland) connected to UV-B ( $\lambda_{\max} = 295 \pm 2$  nm, bandpass FWHM =  $19 \pm 2$  nm) or UV-A ( $\lambda_{\max} = 365 \pm 2$  nm, bandpass FWHM =  $35 \pm 2$  nm) sensors, following the procedures described in Navarro et al. (2014). In short, the algal suspensions were added to the upper part of a 50 ml Utermöhl chamber fixed over the sensor; this part is a tube 95 mm in length and 25 mm diameter made with plastic that is opaque to UVR wavelengths. A bit of silicon was used around the bottom of the tube, just making contact with the glass surface of the sensors, in order to avoid leaching of the cell suspension. The natural sunlight UVA and UVB were measured before adding 5 ml suspension aliquots to completely fill the column. Each aliquot increased the height of the suspension column by 1 cm, allowing UVA and UVB intensity data to be plotted as a function of depth (see details in Navarro et al. 2014). The UVR irradiance was calculated using the following equation:  $(UVA_{\text{irradiance}} \times 2.94) + (UVB_{\text{irradiance}} \times 1.17)$ ; these constants were used to correct for the sensor's underestimation under the optic conditions of the measuring set-up. The PAR extinction was measured at different depths (0.4 and 3.5 cm) of algal suspensions using a spherical quan-

tum sensor (US-SQS/L, Walz). The extinction coefficients  $K_{d, \text{UVR}}$  and  $K_{d, \text{PAR}}$  were estimated by adjusting the UVR and PAR measured irradiances to the Beer-Lambert equation.

The specific attenuation coefficient  $K_c$  was calculated for both PAR and UVR ( $K_{c, \text{PAR}}$  and  $K_{c, \text{UVR}}$ ). This is an apparent optical property of cell cultures since it considers both the effect of cell size and pigment content on light absorption (Figueroa et al. 1997) and is expressed as  $\text{m}^2 \text{mg chl a}^{-1}$ .

### UV index

In this study, we assessed the UVR screening capacity of algal cells, by measuring the absorbance of cell pigment extracts in the range of UVR wavelengths. That was done using a spectrophotometer (Shimadzu UV-16-03). The absorbances at 3 different wavelength bands (UVR: 295–400 nm, UVA: 320–400 nm, UVB: 295–320 nm) were measured from the pigment extract. Examination of the whole UVR-absorbance range is expected to integrate and reflect any UVR-induced change in the pigment composition of the algal community (Navarro et al. 2007). This UVR index has been previously tested for algal communities and pure cultures (Navarro et al. 2007). In short, the relative proportion of UVR absorbance to chl *a* was calculated as the ratio of absorbance intensity over the range of UVR to that of chl *a* at 665 nm. The area under the absorbance curve in the range of 295 to 400 nm was calculated by the sum of light absorbance at any wavelength (1 nm step). The resulting UVR ratio is a dimensionless number, representing a ratio between the absorbance capacities of the UVR-absorbing compounds per absorbance-unit of chl *a* (Navarro et al. 2007). The same procedure was used to calculate UVA and UVB ratios.

### Algal biomass and photosynthetic pigments

Algal biomass was expressed as cell numbers  $\text{ml}^{-1}$  assessed using Neubauer chambers according to Utermöhl (1958). Total chlorophyll (*a* and *b*) and carotenoids were estimated spectrophotometrically by adding 2 ml of dimethylformamide (DMF) to 1 mg of freeze-dried sample, which was kept overnight in darkness at 4°C. Then, the sample was centrifuged and analyzed at different wavelengths (750, 664, 647 and 480 nm) with a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu UV-16-03). The concentrations of chl *a*



and  $b$  as well as total carotenoids were calculated according to Wellburn (1994). The results were expressed as  $\mu\text{g mg}^{-1}$  of biomass.

### Functional variables: photosynthetic activity as *in vivo* chl *a* fluorescence

Photosynthetic performance was measured using pulse-amplitude-modulated (PAM) chl *a* fluorescence of photosystem II (Schreiber et al. 1995). The recommendations of Kromkamp & Forster (2003) were followed for nomenclature. Effective quantum yield ( $\Delta F/F_m'$ ), as defined by Genty et al. (1989), was measured *in situ* from outside the culture using a Pocket-PAM fluorometer (Gademann Instruments) by placing the optical fiber directly into the wall of the experimental vessel, as reported by Figueroa et al. (2013). At the same time, the photon fluence rate of PAR inside the cylinders was measured with a spherical quantum sensor (US-SQS; Walz). Both measurements were performed on the third and fifth day of the experiment at 3 cm depth from the culture surface 3 times a day: morning (09:00 h), noon (13:00 h) and evening (18:00 h).

Rapid light curves (RLCs) were constructed using a Junior-PAM fluorometer (Walz) twice a day (12:00 and 18:00 h) by sampling 10 ml of cultures and transferring them to light-protected chambers for dark adaptation (15 min) to obtain optimal quantum efficiency ( $F_v/F_m$ ). Samples were exposed for 20 s to 12 increasing  $E_{\text{PAR}}$  levels between 0 and 1500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , which were provided by the internal blue LED of the fluorometer. Relative electron transport rates (rETR) were determined as follows:

$$\text{rETR} = \Delta F/F_m' \times E_{\text{PAR}} \quad (1)$$

where  $\Delta F/F_m'$  is the effective yield where  $\Delta F = F_m' - F_t$ ,  $F_m'$  is the maximal fluorescence after saturation light pulse ( $< 4000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), and  $F_t$  is the intrinsic fluorescence of light-exposed algae.  $E_{\text{PAR}}$  ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) is the photon fluence rate of PAR determined by a US-SQS spherical quantum sensor. Unless the number of absorbed quanta is known, it is not possible to give absolute ETR values as an estimation of production. However, RLCs presented as rETR values vs. irradiance can provide data about the relative change of photosynthetic activity under experimental conditions. Therefore, rETR values were fitted according to Eilers & Peeters (1988), using least square error calculation and the Solver function of Excel (Microsoft) to obtain photosynthetic parameters, i.e. photon-capturing efficiency of PSII

in the light-limited range ( $\alpha_{\text{ETR}}$ ),  $\text{rETR}_{\text{max}}$  and the light saturation coefficient ( $E_k$ ).

### Biochemical composition

Total C and total N were determined from dry biomass, using a CNH Perkin-Elmer 2400 elemental analyzer in which C was oxidized at 600°C, and resulting peaks were compared with a known mass of an acetanilide standard to determine mass. Acetanilide has a composition of 71.09% C and 10.36% N. The C and N values were expressed as a percentage of dry weight biomass.

Soluble proteins were analyzed using the Bradford method (Bradford 1976): 20  $\mu\text{l}$  of sample supernatant from the cellular extracts and 235  $\mu\text{l}$  of Bradford reagent were added into each well of a 96 well plate and given 45 min to react. The protein levels were quantified in a plate reader (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific) with absorption readings at 595 nm. The total protein concentration in samples was calculated from a standard curve (0 to 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) made with bovine serum albumin and expressed as mg of protein per ml of extract.

Lipid content (% of dry wt) was measured using the sulpho-phospho-vanillin method (Knight et al. 1972, Izard & Limberger 2003). Concentrated sulphuric acid (2 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) was added to a blank in a tube containing 100  $\mu\text{l}$  of 80% methanol, to tubes with a triolein standard (100  $\mu\text{l}$ ) and to tubes with 100  $\mu\text{l}$  of sample supernatant. Each tube was incubated for 30 min at 100°C and then cooled to room temperature in a water bath. After the addition of 5 ml of phospho-vanillin reagent, the tubes were incubated at room temperature for 15 min. Absorbance was read on a spectrophotometer at 530 nm (Shimadzu UV-16-03).

Lipid peroxidation was calculated using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method after Heath & Packer (1968). Samples for lipid peroxidation were collected on the first and fifth day of the experiment. From each cylinder, 15 ml of algal suspension were collected and centrifuged. The supernatant was discarded, and the cellular pellet was frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . Each sample was resuspended in 2 ml of cold extraction buffer (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.1 mM EDTA; 0.1% Triton X-100, pH = 7.4) with butylated hydroxytoluene (BHT) (40  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ). Extraction was done by sonication (3 cycles of 30 s, with 30  $\mu\text{m}$  amplitude, on ice) on a U200S control sonicator (IKA-Werke, Staufen). Then, 2 ml of 0.5% thiobarbituric acid in 20% trichloroacetic acid were added to cell extracts. The mixture was heated for 30 min at

90°C and immediately put on ice, followed by centrifugation. TBARS absorption peak and unspecific turbidity were read at 532 and 600 nm, respectively. Absorption readings were done on a dual-beam spectrophotometer (HALO DB-20, Dynamica). TBARS concentration was calculated from a tetraethoxypropane standard curve (0 to 250  $\mu\text{M}$ ) and expressed as  $\text{nmol cell}^{-1}$ .

In all cases, at least 1 sample per cylinder was analyzed (i.e. minimum 3 replicates per treatment).

### Statistical analysis

Most of the statistical analyses were performed with R statistical computing software ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Unless otherwise indicated, errors are expressed as standard deviation (SD). A combination of parametric and nonparametric statistics was used. Normality was tested with the Shapiro-Wilkinson test and the Fligner-Killeen test to determine homocedasticity. When variances were homogeneous, the Fisher test was used for comparisons. The Welch 2-sample *t*-test was performed to compare the means when the normality assumption was satisfied, and the Wilcoxon range test was used when normality was not achieved. One-way, 2-way or 3-way ANOVAs were used to compare the treatments when normality and homocedasticity were satisfied, while the Kruskal-Wallis test was applied when they were not. Tukey HSD or Duncan's MRT post-hoc tests were applied to evaluate differences between treatments.

Light extinction curves were fitted to a 2-parameter exponential decay model, using R and the drc package to obtain the corresponding  $K_d$  values. The compPAR function was used to compare  $K_d$ , using *t*-tests with *p*-values adjusted using Bonferroni correction for multiple tests. The null hypothesis was that the ratio equals 1. The ratio was obtained by dividing  $K_d$  values (i.e.  $K_{d,UVB} \text{ PAR} - N / K_{d,UVB} \text{ PAR} - S$  from Day 1). If the ratio significantly differed from 1, the null hypothesis was rejected, meaning those values were significantly different ( $p < 0.05$ ).

Pearson's correlation coefficient (*r*) was determined to define the extent of a linear correlation between the studied variables and was calculated using the Statistica software (v.7.0, Statsoft).

## RESULTS

### Physico-chemical and bio-optical variables

#### Daily integrated irradiance

The daily PAR, UVA and UVB integrated irradiance during the 5 experimental days is shown in Fig. 2. On the first day of the experiment (18 September 2012) the daily integrated irradiance of PAR and UVR was much lower than that on the remaining days as a result of cloudy conditions (4065, 472 and 24  $\text{kJ m}^{-2}$  of PAR, UVA and UVB daily integrated irradiance, respectively). During the acclimation period (13 to 17 September 2012), PAR daily integrated irradiance ranged between 9330 and 9870  $\text{kJ m}^{-2}$ , and this value ranged between 7859 and 9074  $\text{kJ m}^{-2}$  in the experimental period (19 to 23 September 2012, see Fig. 2). The UVA daily integrated irradiance during the acclimation period ranged between 1066 and 1124  $\text{kJ m}^{-2}$  and between 899 and 1004  $\text{kJ m}^{-2}$ , while the UVB ranged between 50–55  $\text{kJ m}^{-2}$  and 44–48  $\text{kJ m}^{-2}$ , respectively.

#### pH

The pH of all cultures transferred to the cylinders showed similar values around  $7.15 \pm 0.15$ , essentially because pH was controlled by  $\text{CO}_2$  injection in the TLC systems. Once in the cylinders, the pH was not controlled. The pH was measured on the last day at 18:40 h. The  $-\text{S}$  deficiency provoked a significant

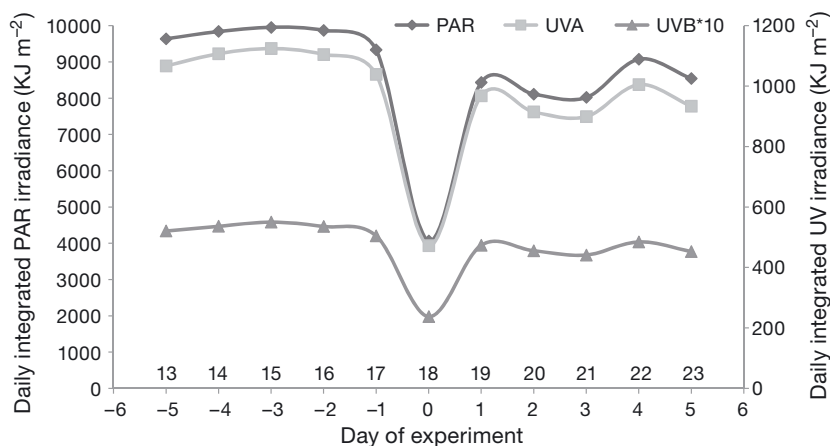


Fig. 2. Daily integrated irradiance of PAR (400 to 700 nm), UVA (320 to 400 nm) and UVB (280 to 320 nm) during the experiment: preacclimation of cultures in thin-layer cascades (from 13 to 17 Sep); Day 0 (18 Sep), transfer from TLC to methacrylate cylindrical vessels; Day 1 to 5 (19 to 23rd Sep), experimental period. UVB irradiance values are multiplied by a factor of 10 for inclusion in the same scale as UVA. Numbers above the x-axis are dates in September 2012

increase of pH in the algal culture with values around 7.8 to 8.0, and this effect was significantly enhanced by UVR (data not shown). The pH in the other treatments was around 7.4, a value slightly higher than the initial one.

### Extinction coefficients

After 3 d of growing in cylinders,  $K_{d,UVR}$  and  $K_{d,PAR}$  of the algal cultures increased (Table 1). Later on,  $K_{d,UVR}$  and  $K_{d,PAR}$  slightly decreased or increased until the end of the experiment, always showing values higher than the initial ones. Statistical analysis was performed each day to compare different nutrient conditions, and no statistical differences were found in  $K_{d,UVR}$  values. However, significant differences were shown along the time course such that Day 0

presented lower values than Day 5. Although intermediate values were shown for Day 3, these values were not significantly different from either Day 0 or 5. In the P(AB-) treatment,  $K_{d,UVR}$  values increased in all nutrient conditions except under F, where they decreased at Day 5. The highest value was found in -S at Day 5. Similarly,  $K_{d,UVR}$  values in the PAB cultures increased throughout the experiment; P(AB-) cultures also increased  $K_{d,UVR}$ , but to a lesser extent. In this case, the F conditions also showed a slight decrease at the end of the experiment.

$K_{d,PAR}$  was affected by changes in both light and nutrient conditions. P(AB-) light conditions resulted in higher  $K_{d,PAR}$ . N-deprived cultures presented significantly lower  $K_{d,PAR}$  values than the F treatments, while S-deprived algae presented intermediate values, which were not significantly different from the others.

Table 1. Number of cells, bio-optical properties and algal pigments during the experiment. Analyses were performed on Days 0, 3 and 5 (see Figs. 1 & 2 for details and abbreviations). Parameters shown are biomass, expressed as number of cells ( $\times 10^6$  ml $^{-1}$ ); UVR and PAR extinction coefficients expressed in m $^{-1}$ ;  $K_c$  expressed as  $\times 10^7$  m $^2$  mg chl $^{-1}$ ; chl *a* and *b* and total carotenoids expressed as  $\mu$ g of pigment per mg dry biomass. Two- (light  $\times$  nutrients) or 3-way (time  $\times$  light  $\times$  nutrient) ANOVAs have been performed per each parameter, depending on whether time was relevant or not and on the availability of replicates. Letters (a, b, c...) are used to denote differences (Tukey HSD tests,  $p < 0.05$ ); treatments presenting values with same letter are not significantly different. Error terms are available only for those values obtained using replicates. Differences between extinction coefficients ( $K_d$ ) have been tested by *t*-tests, and the results are detailed in the corresponding section. nd: not determined

		TLC	Light regime in cylinders			
		Day 0	P(AB-)		PAB	
		Day 0	Day 3	Day 5	Day 3	Day 5
No. of cells	F	4.55	nd	$8.5 \pm 4.1^a$	nd	$7.9 \pm 3.2^a$
	-S	11.5		$10.1 \pm 1.3^a$		$7.3 \pm 2.9^a$
	-N	9.54		$5.9 \pm 2.3^a$		$5.5 \pm 1.8^a$
$K_{d,UVR}$	F	129	161	130	167	163
	-S	116	146	170	162	179
	-N	109	125	143	128	176
$K_{d,PAR}$	F	42	45	$46^a$	45	47
	-S	40	46	$50^a$	38	33
	-N	33	42	$45^a$	40	39
$K_{c,UVR}$	F	$0.028 \pm 0.006^b$	$0.120 \pm 0.03^{ab}$	$0.135 \pm 0.01^{ab}$	$0.128 \pm 0.02^{ab}$	$0.164 \pm 0.02^a$
	-S	$0.030 \pm 0.004^b$	$0.119 \pm 0.03^{ab}$	$0.165 \pm 0.01^a$	$0.124 \pm 0.01^{ab}$	$0.158 \pm 0.02^{ab}$
	-N	$0.029 \pm 0.004^b$	$0.092 \pm 0.04^{ab}$	$0.097 \pm 0.01^{ab}$	$0.069 \pm 0.01^{ab}$	$0.166 \pm 0.03^a$
$K_{c,PAR}$	F	$0.009 \pm 0.002$	$0.033 \pm 0.008$	$0.048 \pm 0.003$	$0.035 \pm 0.004$	$0.047 \pm 0.006$
	-S	$0.011 \pm 0.001$	$0.038 \pm 0.011$	$0.048 \pm 0.003$	$0.029 \pm 0.003$	$0.029 \pm 0.004$
	-N	$0.009 \pm 0.001$	$0.031 \pm 0.016$	$0.031 \pm 0.002$	$0.022 \pm 0.002$	$0.037 \pm 0.008$
Chl <i>a</i>	F	$8.18 \pm 0^a$	$2.69 \pm 0.81^{cd}$	$1.92 \pm 0.1^d$	$2.59 \pm 0.32^{cd}$	$1.98 \pm 0.26^d$
	-S	$5.72 \pm 0^b$	$2.59 \pm 0.84^{cd}$	$2.06 \pm 0.12^d$	$2.81 \pm 0.09^{cd}$	$2.27 \pm 0.26^{cd}$
	-N	$5.83 \pm 0^b$	$2.73 \pm 1.62^{cd}$	$2.93 \pm 0.2^{cd}$	$3.7 \pm 0.35^c$	$2.13 \pm 0.38^d$
Chl <i>b</i>	F	$4.36 \pm 0^a$	$2.06 \pm 0.26^{ab}$	$0.96 \pm 0.07^b$	$1.86 \pm 0.31^b$	$0.99 \pm 0.02^b$
	-S	$2.7 \pm 0^{ab}$	$1.75 \pm 0.51^b$	$1.32 \pm 0.05^b$	$2.05 \pm 0.17^{ab}$	$1.63 \pm 0.48^b$
	-N	$2.66 \pm 0^{ab}$	$0.53 \pm 3.25^b$	$1.77 \pm 0.07^b$	$2.36 \pm 0.2^{ab}$	$1.81 \pm 0.41^b$
Carotenoids	F	$3.86 \pm 0^s$	$0.45 \pm 0.37^{de}$	$0.42 \pm 0.04^{de}$	$0.61 \pm 0.08^{cde}$	$0.43 \pm 0.07^{de}$
	-S	$3.09 \pm 0^b$	$0.5 \pm 0.18^{de}$	$0.38 \pm 0.04^c$	$0.65 \pm 0.19^{cde}$	$0.45 \pm 0.05^{de}$
	-N	$3.06 \pm 0_b$	$0.76 \pm 0.06^{cd}$	$0.6 \pm 0.01^{cde}$	$0.9 \pm 0.16^c$	$0.39 \pm 0.07^e$

For  $K_{c,UVR}$ , both time and the interaction of time and light provoked significant differences between treatments. Day 0 presented significantly lower values of  $K_{c,UVR}$  than Days 3 or 5; consequently, the results show the same general trend as with  $K_d$ , i.e. increasing values until the end of experiment for all the treatments. In detail,  $K_{c,UVR}$  showed the highest values in PAB F and -N. Although also higher, PAB -S values were closer to those of P(AB-) -S. Higher values of  $K_{c,PAR}$  were found in PAB -N and P(AB-) -S. No differences between light conditions were found in the F treatments.

#### UV index

The different light conditions did not yield significant differences between treatments. Hence, values were grouped and analyzed according the nutrient condition prevailing during the experiment. Different nutrient conditions resulted in changes in the UVR index (Fig. 3). N depletion resulted in a reduction of UVR-screening capacity, caused by the reduction in the absorbance capacity in the UVA range. In contrast, no differences in UVR-screening capacity were detected, regardless of nutrient conditions.

#### Pigment content

During the acclimation period, chlorophyll and carotenoid content decreased in the nutrient-depleted treatments (see Day 0 in Table 1). The average chl *a* content under F was about  $8 \mu\text{g mg}^{-1}$ , decreasing to  $5.77 \mu\text{g mg}^{-1}$  in both the -N and -S treatments. A similar trend was found for chl *b* and carotenoids. These trends were even more marked after 3 d in the cylinders (exposed to different light conditions in addition to the nutrient treatment). Chl *a* decreased in all treatments, irrespective of nutrient or light conditions, except for in the PAB -N treatment which showed significantly higher values, although lower than in Day 0. Chl *b* decreased in all treatments, and carotenoids showed very low concentrations. After 5 d, chl *a* content still decreased, but when different treatments were compared, P(AB-) -N presented significantly higher chl *a* content than the others. In contrast, chl *b* was affected by nutrient conditions: -N treatments presented the highest values and F the lowest, while -S presented intermediate values, although not statistically different. Although carotenoid content was generally very low, it was higher under P(AB-) -N conditions.

#### Biomass and growth

After the acclimation period in the TLC, the number of cells showed no statistical differences among nutrient treatments. However, -N and -S cultures presented higher values than F. After transferring cultures to the cylinders, the average cell number increased under F conditions but decreased under -S and -N, although this difference was not statistically different. This effect was more marked in this last treatment, irrespective of light conditions (Table 1).

#### Photosynthetic activity

Maximal quantum yield ( $F_v/F_m$ ) presented similar values, both initially (0.61 to 0.62) and after 5 d of culture in the TLC (Table 2), but significant differences were found after 5 d in cylinders. Under full nutrient conditions,  $F_v/F_m$  did not change after 5 d in either light regime. However, significant differences were found by the end of the experiment under -N and -S. For -S,  $F_v/F_m$  values did not vary under P(AB-), but a decrease was observed under PAB after 5 d. On the contrary,  $F_v/F_m$  increased when N-depleted cultures were exposed to P(AB-), although no changes were observed in PAB.

At the beginning of the experiment,  $rETR_{max}$  values obtained from the RLCs were lower under F than in -S and -N conditions. Although  $rETR_{max}$  under F

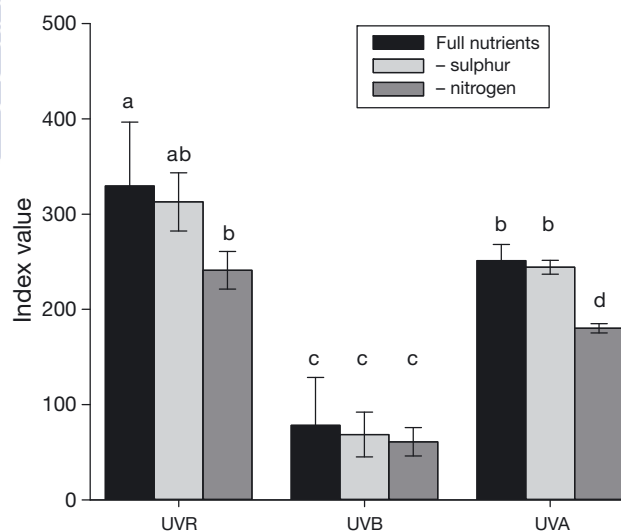


Fig. 3. UVR indexes as UVR (280 to 400 nm), UVB (280 to 320 nm) and UVA (320 to 400 nm) for the different nutrient treatments at Day 5 combining both light treatments, PAB and P(AB-), since no significant differences were found. Columns showing different letters indicate that differences are statistically significant, whereas the use of the same letter indicates no differences



Table 2. Maximal quantum yield ( $F_v/F_m$ ) and the ETR parameters obtained from the rapid light curves as maximal relative ETR ( $rETR_{max}$ ,  $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), photosynthetic efficiency ( $\alpha_{ETR}$ ), saturated irradiance ( $E_k$ ,  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and  $rETR$  at noon i.e. 13:00 h ( $rETR_{noon}$ ,  $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at the initial time (values of cells after 6 d culture in thin-layer cascades [TLC]) and after 3 and 5 d under the different nutrient regimes, including full nutrients (F), sulphur (-S) and nitrogen (-N) starvation, as well as different light treatments, including natural solar radiation with a 295 nm cut-off filter (PAB) and reduced UVR using a 395 nm cut-off filter, i.e. P(AB-). Three-way ANOVA (time  $\times$  light  $\times$  nutrient) has been performed for each parameter. Letters (a, b, c...) are used to denote differences (Tukey HSD tests,  $p < 0.05$ ); treatments presenting values with same letter are not significantly different. nd: not determined

		TLC	Light regime in cylinders			
			P(AB-)		PAB	
		Day 0	Day 3	Day 5	Day 3	Day 5
$F_v/F_m$	F	0.61 $\pm$ 0.00 <sup>abc</sup>	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>	0.61 $\pm$ 0.02 <sup>abcd</sup>	0.62 $\pm$ 0.01 <sup>bcd</sup>	0.60 $\pm$ 0.01 <sup>abc</sup>
	-S	0.62 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.66 $\pm$ 0.02 <sup>f</sup>	0.60 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.59 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.58 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	-N	0.61 $\pm$ 0.03 <sup>abc</sup>	0.66 $\pm$ 0.05 <sup>ef</sup>	0.66 $\pm$ 0.03 <sup>f</sup>	0.67 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	0.65 $\pm$ 0.01 <sup>def</sup>
$rETR_{max}$	F	87.04 $\pm$ 0.90 <sup>bc</sup>	109.46 $\pm$ 13.5 <sup>d</sup>	109.24 $\pm$ 1.30 <sup>d</sup>	81.50 $\pm$ 7.84 <sup>bc</sup>	70.28 $\pm$ 4.78 <sup>ab</sup>
	-S	110.58 $\pm$ 2.66 <sup>d</sup>	88.42 $\pm$ 3.34 <sup>bc</sup>	84.48 $\pm$ 0.30 <sup>dc</sup>	150.44 $\pm$ 22.60 <sup>e</sup>	86.78 $\pm$ 5.56 <sup>bc</sup>
	-N	116.02 $\pm$ 6.88 <sup>d</sup>	181.96 $\pm$ 13.42 <sup>b</sup>	57.12 $\pm$ 6.70 <sup>a</sup>	87.40 $\pm$ 15.40 <sup>bc</sup>	98.28 $\pm$ 4.88 <sup>cd</sup>
$\alpha_{ETR}$	F	0.090 $\pm$ 0.004 <sup>e</sup>	0.092 $\pm$ 0.002 <sup>e</sup>	0.066 $\pm$ 0.004 <sup>bcd</sup>	0.100 $\pm$ 0.008 <sup>e</sup>	0.076 $\pm$ 0.002 <sup>d</sup>
	-S	0.060 $\pm$ 0.006 <sup>abc</sup>	0.090 $\pm$ 0.002 <sup>e</sup>	0.116 $\pm$ 0.012 <sup>f</sup>	0.088 $\pm$ 0.008 <sup>e</sup>	0.124 $\pm$ 0.006 <sup>f</sup>
	-N	0.058 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.050 $\pm$ 0.002 <sup>e</sup>	0.058 $\pm$ 0.002 <sup>ab</sup>	0.052 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.072 $\pm$ 0.002 <sup>cd</sup>
$E_k$	F	169.77 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	213.63 $\pm$ 26.05 <sup>bc</sup>	215.17 $\pm$ 20.38 <sup>bc</sup>	147.04 $\pm$ 25.54 <sup>a</sup>	120.68 $\pm$ 1.79 <sup>a</sup>
	-S	260.55 $\pm$ 14.7 <sup>bc</sup>	326.72 $\pm$ 4.00 <sup>d</sup>	160.93 $\pm$ 24.52 <sup>a</sup>	185.49 $\pm$ 77.57 <sup>bc</sup>	170.01 $\pm$ 8.46 <sup>a</sup>
	-N	266.36 $\pm$ 65.4 <sup>bcd</sup>	149.84 $\pm$ 18.86 <sup>a</sup>	164.49 $\pm$ 6.36 <sup>a</sup>	162.97 $\pm$ 32.49 <sup>a</sup>	116.64 $\pm$ 15.54 <sup>a</sup>
$rETR_{noon}$	F	nd	132.68 $\pm$ 13.44 <sup>b</sup>	99.90 $\pm$ 14.92 <sup>b</sup>	60.74 $\pm$ 9.70 <sup>a</sup>	89.60 $\pm$ 19.32 <sup>ab</sup>
	-S		88.82 $\pm$ 17.48 <sup>ab</sup>	57.56 $\pm$ 7.52 <sup>a</sup>	63.22 $\pm$ 6.96 <sup>a</sup>	56.78 $\pm$ 4.42 <sup>a</sup>
	-N		61.10 $\pm$ 11.22 <sup>a</sup>	100.84 $\pm$ 5.58 <sup>b</sup>	68.74 $\pm$ 14.60 <sup>a</sup>	96.90 $\pm$ 2.12 <sup>b</sup>

conditions increased when the cultures were exposed to P(AB-) light, it decreased in -S and -N treatments. On the contrary,  $rETR_{max}$  did not vary after 5 d in PAB conditions, although a peak was observed after 3 d in -S cultures. By the end of the experiment, cultures under F conditions showed the highest values under P(AB-) light, whereas the lowest values were reached in -N treatment. The opposite was observed in PAB conditions, where the highest values corresponded to -N cultures and the lowest values were observed in full nutrient conditions.

Photosynthetic efficiency ( $\alpha_{ETR}$ ) was affected by the initial nutrient conditions; the F treatment presented higher efficiency than the nutrient-deprived ones (Table 2). After being transferred to cylinders for 5 d, efficiency in the -S treatment was significantly higher than in the others regardless of the light conditions, whereas in the F treatment efficiency was reduced. In contrast, PAB light conditions caused an increase over time in efficiency in the -N treatment.

Saturated irradiance ( $E_k$ ) from the RLCs decreased after 5 d in both -S and -N cultures, irrespective of light regime. However, in full nutrient conditions,  $E_k$  increased in P(AB-), whereas it did not vary under PAB. By the end of the experiment,  $E_k$  did not show

significant differences between treatments, except cultures under full nutrient and P(AB-) conditions, which showed the highest values.

Under outdoor conditions, after 3 d, the photon fluence of PAR followed a similar daily cycle with maximum values at midday in all cases (Fig. 4). Daily maximal values were higher in F and -N than in -S cultures under both light regimes. Common daily  $\Delta F/F_m'$  cycles with midday decrease were observed on Day 3 in P(AB-) conditions. After 5 d under these light conditions and throughout the whole experimental period, such a decrease was not observed in PAB treatments, except for cultures in full nutrient conditions. *In situ*  $rETR$  reached a peak at midday in all cases. Maximal values tended to decrease in P(AB-) treatments, except for in -N cultures, whereas an increasing trend was observed during the experiment under PAB light conditions.

### Biochemical composition

The elemental composition expressed as % of C, N and S varied depending on the treatment and the day of the experiment (Table 3). At Day 0, F cultures presented the highest content of C, N and S, whereas the

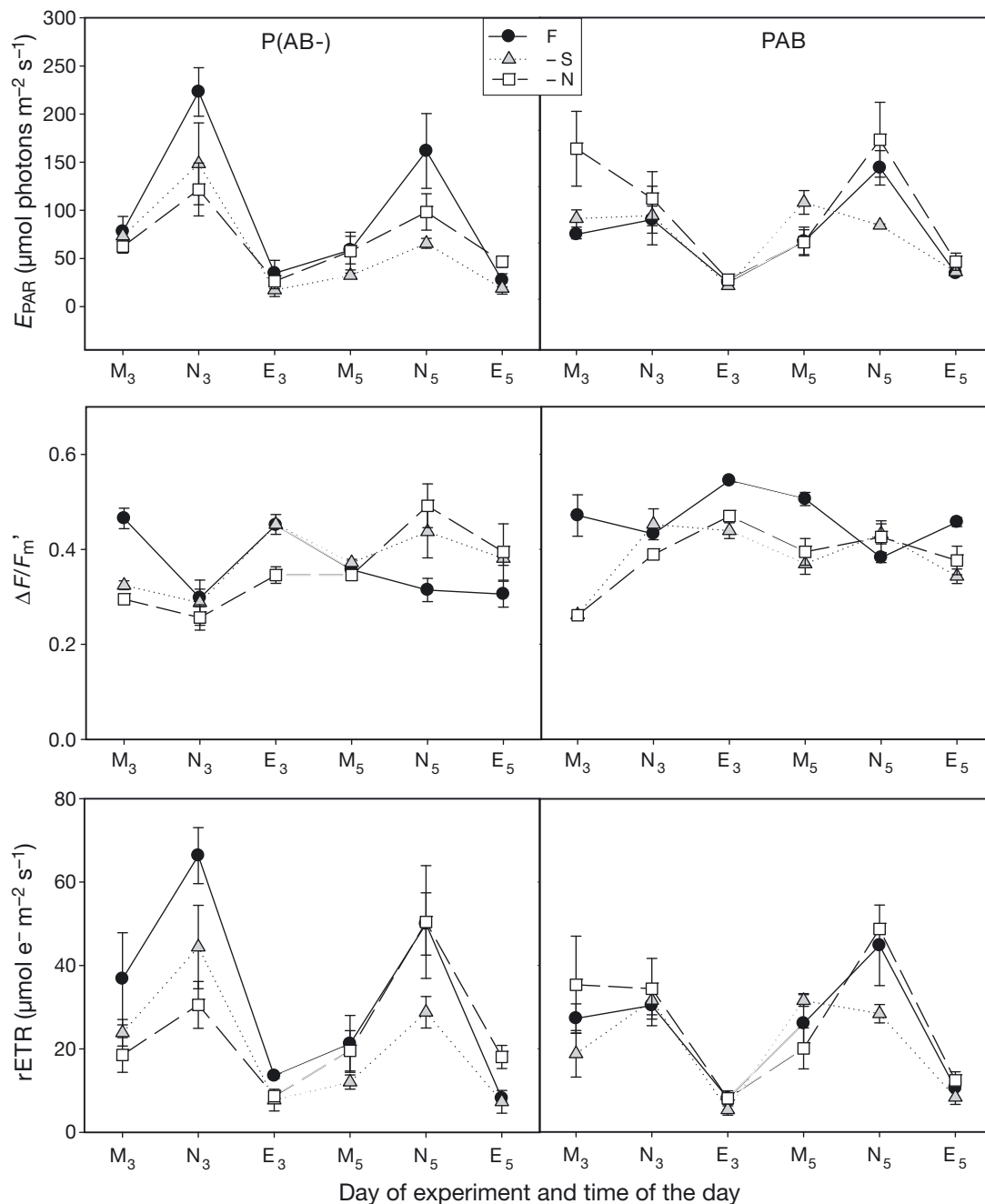


Fig. 4. Photon fluence rate of PAR ( $E_{PAR}$ ), effective quantum yield of PSII ( $\Delta F/F_m'$ ) and relative electron transport rate (rETR) in the morning (M), noon (N) and evening (E) for 2 different days during the experimental period of culture in methacrylate cylindrical vessels: Day 3 (21 September 2012) and Day 5 (23 September 2012) for the different nutrient treatments, F: full nutrients; -N: nitrogen limited; -S: sulphur limited; and light treatments, including full solar radiation (PAB) or the same PAR but decreased UVR (P(AB-))

-N treatment had the lowest, and -S cultures showed intermediate values for all components. At Day 5, PAB F treatment presented the highest C content, whereas -S had the lowest. The other treatments showed intermediate values that were not statistically different (Table 1). PAB F and P(AB-) -N

treatments presented the highest N content, whereas PAB -S presented the lowest, with the remaining treatments presenting intermediate values, although not significantly different from the highest and lowest ones. The S content was slightly affected by all nutrient conditions, with -N presenting the highest

content. A general trend of increasing content of C, N and S occurred over time for the -N treatment, while they decreased or remained the same in F cultures. Along the time course, the -S treatment was more affected by light conditions such that C and N decreased in the PAB -S treatment, while C increased in P(AB-) -S; the S content showed a slight increase in both light conditions.

The nutrient conditions prevailing in the outdoor TLC caused differences in protein content in the vessels at Day 0: -S presented the highest protein content, F the lowest, and -N showed intermediate values, although no statistical differences were found between these initial values. However, after 5 d of culture in the cylinders, these differences disappeared, and all treatments presented similar protein content, regardless of the nutrient and/or light condition. It should be noted that the final protein content was nearly double the initial one. Day 3, not shown, presented intermediate values between Day 0 and 5 (Table 3).

Lipid content (% of dry wt) for the different light and nutrient depletion treatments are presented in Fig. 5. N deprivation in the outdoor TLC resulted in higher lipid content. After 3 d of culture in the cylinders, the lipid content increased in all samples. The

greatest increase of lipids was observed in those cylinders combining reduced UVR and nutrient depletion: P(AB-) -S and P(AB-) -N. Of particular interest is the case of -N, with values around 35%. Lipid content reached its lowest values in the F treatment. After 5 d, light conditions continued affecting the lipid content, with cultures exposed to PAB presenting the highest percentages of lipids. Both F and PAB -S conditions increased the lipid content compared to Day 3. Accordingly, P(AB-) -S and -N presented the lowest lipid content, although these treatments showed the highest lipid percentage at Day 3.

### Lipid peroxidation

After 5 d in cylinders, all algal cultures, with the exception of controls (full nutrients), showed a doubling of TBARS content (Fig. 6). Both nutrient conditions ( $p < 0.01$ ) and time ( $p < 0.001$ ) caused changes in lipid peroxidation (TBARS per cell). The TBARS concentration shown a time-related increase, and both -S and -N resulted in greater increases of TBARS compared to the full nutrient condition. Nutrient limitation, even when the cultures were exposed to a lower UVR intensity, was enough to significantly increase TBARS per cell (101% and 168%, respectively). The synergistic effect of nutrient limitation and UVR increased the TBARS content, especially in the case of the -N cultures (34% and 18% for -N and -S, respectively).

Table 3. Total internal C, N and S expressed as percentage (% of dry wt) and soluble protein content (SP,  $\mu\text{g mg}^{-1}$  dry wt biomass) from Day 0 (inocula from thin-layer cascade, so no replicates are available, except for SP analysis) and after 5 d in vessels (Day 5) ( $n = 3$ ). Two-way (treatment  $\times$  light) or 3-way (treatment  $\times$  light  $\times$  time) ANOVAs were performed depending on the availability of samples and replicates. If required, a letter (a, b, c...) is used to denote differences (HSD tests,  $p < 0.05$ ); treatments presenting values with the same letter are not significantly different. F: full nutrients; -S (-N): sulphur (nitrogen) starvation

	TLC	Light regime		
		P(AB-) Day 5	PAB Day 5	
	Day 0	Day 5	Day 5	
%C	F	37.5	$35.5 \pm 0.9^{ab}$	$37.3 \pm 0.8^a$
	-S	35.9	$36.3 \pm 1.5^{ab}$	$33.3 \pm 1.6^b$
	-N	33.7	$36.9 \pm 1.1^a$	$35.5 \pm 0.5^{ab}$
%N	F	7	$6.2 \pm 0.3^a$	$6.5 \pm 0.2^a$
	-S	6.3	$6.1 \pm 0.3^a$	$5.6 \pm 0.3^b$
	-N	6.1	$6.4 \pm 0.3^a$	$6.2 \pm 0.1^a$
%S	F	0.4	$0.4 \pm 0.0^a$	$0.3 \pm 0.0^c$
	-S	0.3	$0.4 \pm 0.0^a$	$0.4 \pm 0.0^a$
	-N	0.2	$0.5 \pm 0.0^b$	$0.5 \pm 0.0^b$
SP	F	$124 \pm 29^a$	$318 \pm 28^c$	$320 \pm 36^c$
	-S	$193 \pm 18^a$	$340 \pm 98^c$	$324 \pm 67^c$
	-N	$147 \pm 22^a$	$282 \pm 34^{bc}$	$319 \pm 56^c$

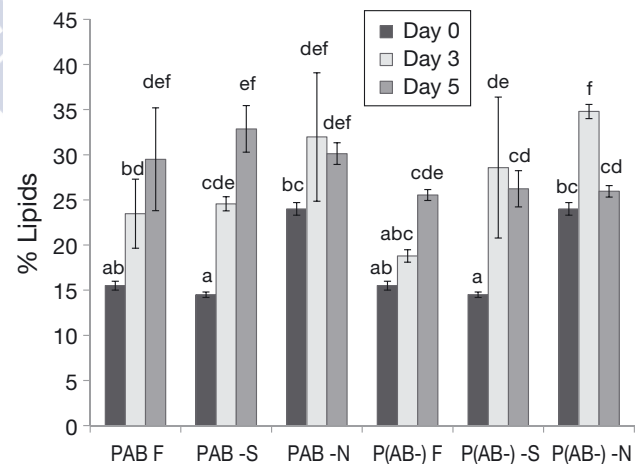


Fig. 5. Lipid content (% of dry wt) in the different nutrient and light treatments (see Fig. 1) at the initial time (algae just transferred from TLC, Day 0), on Day 3 (21 September 2012), and on Day 5 (23 September 2012). Columns showing different letters indicate that differences are statistically significant ( $p < 0.05$ ), whereas the use of the same letter indicates no differences

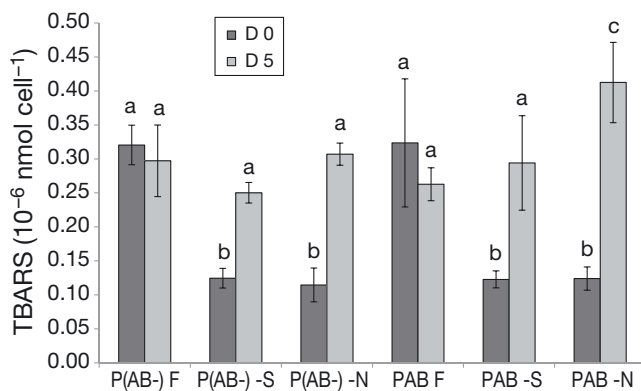


Fig. 6. Lipid peroxidation expressed as nmol MDA equivalent by total cell number in the different nutrient and light treatments (see Fig. 1) at the initial time (algae just transferred from TLC; Day 0) and on Day 5, the last day of the experiment (23 September 2012). Columns showing different letters indicate that differences are statistically significant ( $p < 0.05$ ), whereas the use of the same letter indicates no difference. TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

### Correlation analysis

As expected, both  $K_{C,UVR}$  and  $K_{C,PAR}$  were negatively correlated with pigments and cell numbers, whereas a positive correlation was found with proteins and lipids (Table 4). Pigments were positively correlated with cell density. In contrast, cell density was negatively correlated with  $rETR_{noon}$  ( $rETR$  measured *in situ* at 13:00 h) and with internal compounds, such as proteins and lipids, as well as percentages of C, N, and S. The  $rETR_{noon}$  and  $rETR_{max}$  (obtained from RLCs) were positively correlated with other RLC parameters, i.e.  $\alpha_{ETR}$  and  $E_k$ , and also with the UV index. Proteins and lipids were positively correlated, both presenting a negative correlation with pigments. The rest of the analyzed internal compounds, i.e. C, N, S were positively correlated.

### DISCUSSION

Initially, cell cultures were grown in TLC to acclimate to the nutrient conditions (N and S deprivation) under complete sunlight (including UVA and UVB). In the TLC, approximately two-thirds of the time, the cells were under dark conditions (due to the pipes and tank of the TLC system), whereas once they were transferred to cylinders, algae were exposed to different light conditions both in quality and quantity (see Jerez et al. 2014). This difference may explain some of the changes during the first moments of the culture in cylinders. The stationary bottle incubation

technique for estimating rates of primary productivity has mainly been criticized because of 'bottle effects' related to the elimination of natural turbulence and the presence of photoinhibition. However, these growing conditions have 2 separate, but synergistic, effects. On the one hand, phytoplankton cells move through a light/dark cycle. On the other hand, the boundary layer decreases, which increases the rate of exchange of nutrients and metabolites through the cell wall. Hence, more nutrients are available, and light could be utilized more efficiently, resulting in increased productivity (Grobbelaar 1989). In our study, vigorous aeration was applied to achieve greater hydrodynamics in the culture.

Algae under PAB showed photosynthetic parameters similar to the sun-type pattern, i.e. algae acclimated to high irradiances presented high capacity for energy dissipation and photoprotection (Krause & Jahns 2004). Accordingly, these algae presented an increase of  $rETR_{max}$  and  $E_k$  but a slight decrease of  $\alpha_{ETR}$ , as observed under F nutrient conditions on Day 3. The  $ETR_{max}$  was higher on Day 3 under -S and PAB compared to P(AB-), but  $E_k$  decreased without any variation in  $\alpha_{ETR}$ ; no differences were observed after 5 d of culture. However, under -N, no differences in the photosynthetic parameters were observed on Day 3, whereas after 5 d,  $rETR_{max}$  was higher under PAB than P(AB-), although  $E_k$  and  $\alpha_{ETR}$  were not significantly different (Table 2). Higher photosynthetic capacity and recovery after damage under PAB compared to P(AB-) has been previously reported in algae growing under high natural solar irradiance (Flores-Moya et al. 1999, Helbling et al. 2003, Hanelt et al. 2006).

The depletion of nutrients influences many biochemical processes, such as nutrient uptake, pigment synthesis, photosynthesis, cellular growth and organism composition (Dean et al. 2010). The level of proteins in cultures was higher in all nutrient treatments in cylinders than in those under TLCs, even though the total internal N content was similar in the 2 culture systems. No differences in the level of proteins were found due to nutrient treatments. In contrast, the content of chlorophyll and carotenoids was reduced under nutrient-deprived treatments on Day 1. As reported by Young & Beardall (2003), photosynthetic capacity and, consequently, pigment content decrease in microalgae under limitation of N. Overall, pigment concentration was heavily impacted by the N concentration of the medium (Li et al. 2008, I. Malpartida et al. unpubl. data). Moreover, since chlorophyll is a N-rich compound, it can be used as an internal supply of N for algae metabolism (Smart

Table 4. Pearson correlation for the studied variables (\*p < 0.05). (1) Bio-optics: UVR extinction coefficient,  $K_{d,UVR}$  ( $m^{-1}$ ); PAR extinction coefficient,  $K_{d,PAR}$  ( $m^{-1}$ ); UVR specific attenuation coefficient,  $K_{C,UVR}$  ( $m^2$  mg chl  $a^{-1}$ ); PAR-specific attenuation coefficient,  $K_{C,PAR}$  ( $m^2$  mg chl  $a^{-1}$ ); chl *a* concentration ( $\mu g$  ml $^{-1}$ ); chl *b* concentration ( $\mu g$  ml $^{-1}$ ); total carotenoids (Car.) ( $\mu g$  ml $^{-1}$ ) and UV index (r.u.). (2) Growth: cell numbers (cells ml $^{-1}$ ). (3) Photosynthetic performance: effective quantum yield ( $\Delta F_v/F_m$ ); photosynthetic active radiation (PAR) ( $\mu mol$  photons  $m^{-2} s^{-1}$ ); *in situ* rETR measured at noon ( $\mu mol e^{-} m^{-2} s^{-1}$ ); maximum rETR (rETR $_{max}$ ) ( $\mu mol e^{-} m^{-2} s^{-1}$ ); photosynthetic efficiency ( $\alpha_{ETR}$ ) and light saturation ( $E_k$ ) ( $\mu mol$  photons  $m^{-2} s^{-1}$ ). (4) Internal compounds: total proteins (PRT) ( $\mu g$  ml $^{-1}$ ); lipid (% of dry wt), carbon, nitrogen and sulphur content (% of dry wt)

	Bio-optics				Growth			Photosynthetic performance			Internal compounds									
	$K_{d,UVR}$	$K_{d,PAR}$	$K_{C,UVR}$	$K_{C,PAR}$	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car.	UV index	No. cells	$\Delta F_v/F_m$	PAR	rETR $_{noon}$	rETR $_{max}$	$\alpha_{ETR}$	$E_k$	PRT	Lipids	%C	%N	%S
1	1																			
$K_{d,UVR}$	0.27																			
$K_{d,PAR}$	0.87*	1																		
$K_{C,UVR}$	0.70*	0.20	1																	
$K_{C,PAR}$	-0.65*	0.09	0.94*	1																
Chl <i>a</i>	-0.31	0.01	-0.69*	-0.76*	1															
Chl <i>b</i>	-0.47	-0.13	-0.72*	-0.70*	0.84*	1														
Car.	0.07	-0.05	0.14	0.21	-0.17	-0.07	0.75*	1												
UV index	-0.61*	-0.19	-0.83*	-0.82*	0.94*	0.75*	0.94*	-0.17	1											
No. cells	0.47	0.18	0.27	0.24	-0.24	0.11	0	0.20	-0.20	1										
$\Delta F_v/F_m$	0	-0.26	0.20	0.25	-0.41	0.46	-0.56*	-0.12	-0.45	-0.33	1									
PAR	0.20	-0.21	0.32	0.37	-0.52*	-0.44	-0.57*	-0.04	-0.54*	0.04	0.92*	1								
rETR $_{noon}$	-0.21	-0.15	-0.20	-0.17	0.07	0.06	-0.11	0.70*	0.09	0.20	-0.07	0.02	1							
rETR $_{max}$	0.78*	0.15	0.56*	0.40	-0.22	0.06	-0.11	0.11	-0.21	0.17	-0.17	-0.11	-0.28	1						
$\alpha_{ETR}$	-0.33	-0.09	-0.34	-0.35	0.23	0.14	0.09	0.57*	0.28	0.06	-0.17	-0.15	0.95*	-0.30	1					
$E_k$	0.55*	-0.03	0.75*	0.73*	-0.69*	-0.65*	-0.51*	-0.13	-0.56*	-0.04	0.28	0.32	-0.26	0.29	-0.33	1				
PRT	0.35	0.01	0.59*	0.56*	-0.70*	-0.69*	-0.76*	0.18	-0.80*	-0.07	0.31	0.30	-0.02	-0.03	-0.19	0.50*	1			
Lipids	0.26	0.35	0.25	0.26	-0.41	-0.16	-0.35	0.34	-0.50*	0.59*	-0.12	0.05	0.09	0	-0.04	-0.29	0.32	1		
%C	0.26	0.35	0.25	0.26	-0.42	-0.17	-0.37	0.34	-0.51*	0.58*	-0.11	0.05	0.09	0	-0.04	-0.29	0.33	1.00*	1	
%N	0.27	0.35	0.26	0.26	-0.43	-0.18	-0.37	0.34	-0.51*	0.58*	-0.11	0.06	0.09	0	-0.04	-0.28	0.34	1.00*	1.00*	1
%S																				

1994, Díaz et al. 2006). After 5 d, all treatments showed a decrease in pigment contents. Niyogi et al. (1997) described how promotion of the production of carotenoids allows adaptation to possible photo-oxidation when irradiance decreases the synthesis of chlorophyll structures. Low N nutrition reduces the levels of chlorophyll and soluble proteins, such as RUBISCO, in different algae (Beardall 1991, Wulff et al. 2000). Bili-protein contents decreased in both cyanobacteria (Boussiba & Richmond 1979, Schenk et al. 1983) and red algae (Talarico & Maranzana 2000); in contrast, high nutrient supply produced a rapid increase in phycobiliproteins, reaching about 30 to 40% of the soluble proteins in cyanobacteria (Tandeau de Marsac & Houmardd 1993). Our results show a decrease in chlorophyll but not an increase in carotenoids content, which was very low. This pattern can be explained by the possible cellular acclimation to photo-oxidation of pigments under high irradiance, as suggested by Rosales-Loaiza et al. (2008). In fact, these cultures were first acclimated to complete sunlight, as they were cultivated in TLCs.

Because of the potential commercial interest in lipids, lipid accumulation was carefully assessed. The variation in biomass productivity provoked by treatments affected the biochemical composition of the cultures, showing a clear bioaccumulation of lipids under starvation conditions (-S and -N treatments). Lipid metabolism is a good example of the synergistic effect of nutrients and UVR, showing 2 differentiated stages. That is, during the first 3 d, the nutrient condition factor controlled the accumulation of lipids, while during the last 2 d, light was the controlling factor. After 3 d in cylinders, the -N treatment, irrespective of light conditions, showed the highest lipid content, reaching nearly 35% of dry wt. At the same time, the low ETR data indicated that this increase was realized under low-production conditions, in agreement with other studies (Illman et al. 2000, Yeh & Chang 2012). In other studies, the addition of N and Fe increased the lipid production in *Dunaliella salina* based on the increase of biomass productivity (Mata et al. 2013). In our case, the decrease in the cell number by N limitation was



not compensated by the increase of lipid content per cell, as in the case of  $-S$  cultures. This effect may have been a response to nutrient stress; the responses to stress may include a decrease of cellular growth along with the simultaneous increase of energy storage molecules (Meng et al. 2009).

The UVR effects presented a strong time dependency, suggesting the importance of the UVR dose accumulated by the algae. After 5 d, cultures under PAB presented the greatest lipid content. Particularly,  $-S$  showed the greatest enhancement in lipid production, possibly because microalgal requirements of S are quite low, between 0.15 and 1.96% (Barsanti & Gualtieri 2006). S deficiency provoked a significantly higher pH in the algal culture, with values around 7.8 to 8.0. The pH increase was significantly enhanced by UVR. Kosourov et al. (2003) reported that S deprivation of cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* resulted in the photoproduction of  $H_2$ , which could alter pH equilibrium. However, a significant change in  $CO_2$  availability is not expected due to pH differences among treatments (in the range of pH shown, most of the C is available as  $HCO_3^-$ ). Several studies have shown that negative effects on productivity of marine or freshwater planktonic algae appear only at  $pH > 8.8$  (Azov 1982, Chen & Durbin 1994).

The effect of UVR depends on maintaining a dynamic equilibrium between damage and repair (Lesser et al. 1994, Heraud & Beardall 2000, Litchman et al. 2002). Any imbalance in these processes affects PSII dynamics and leads to photoinhibition. The decrease in chlorophyll fluorescence under UVR was related to the decrease in pigment content observed under both of the light treatments. The fluorescence decrease was probably also related to damage to PSII (see review by Vincent & Neale 2000). Over both short and long terms, Carrillo et al. (2008) showed the lack of harmful UVR effects on primary production, chl *a* and biomass, suggesting that the loss of C, which results in low sestonic C:P ratios, might be part of an adaptive strategy of phytoplankton to high UVR and extreme nutrient limitation. It is also known that nutrient enrichment (P) may reduce the negative effect of UVB radiation on the growth of other microalgae (Germ et al. 2002).

High PAR irradiance can also provoke photoinhibition (Villafañe et al. 2003). In our study, PAR irradiance was the same under both light treatments, and in P(AB-), both UVA and UVB were decreased by the cut-off filter used. UVA has been reported to have both negative and positive effects in phytoplankton. A decrease in primary production (mea-

sured as C incorporation) is among the negative effects (Villafañe et al. 2003), while among the positive effects, UVA can act to enhance C fixation (Helbling et al. 2003), allow photorepair (Buma et al. 2003), increase biomass (Wu et al. 2005) and favour primary productivity by means of utilization of UVA as an energy supply for  $CO_2$  fixation (Gao et al. 2007). The impact of UVR on the cells depends on the bio-optical characteristics related to cell size and pigment composition (Figuerola et al. 1997).

Evidence of photoacclimation can also be seen in our study. *Chlorella fusca* is a relatively large species, and therefore, it is expected to present higher resistance to UVR than species with smaller cells. The increase in cell size diminishes UVB penetration in the nucleus and chloroplasts, reducing the potential damage to DNA and photosystems. It is commonly accepted that small cells (nanoplankton) are more vulnerable to UVR than large cells (microplankton) because the latter have slower kinetics of photoinhibition and can therefore resist greater UVR-related damage to photosynthesis (Figuerola et al. 1997, Villafañe et al. 2003). In this study, both  $K_{c,PAR}$  and  $K_{c,UVR}$  were correlated with photosynthetic efficiency ( $\alpha_{ETR}$ ) but not with photosynthetic capacity (rETR). Figuerola et al. (1997) showed that a specific attenuation coefficient ( $K_c$ ) ranging from 0.01 to  $0.03 \text{ m}^2 \text{ mg}^{-1} \text{ chl } a$  explained the acclimation to increased irradiance, demonstrating that increases of  $K_c$  were related to increased photoinhibition. In our experiment,  $K_{c,UVR}$  showed the highest values for PAB F and  $-N$ , which is consistent because UVR was complete in these treatments, allowing for a certain level of photoinhibition. In the case of  $-S$ , the value is higher in P(AB-) conditions but still close to the value in PAB. It is possible that PAB conditions provoked more damage and less recovery in cells and that this effect was also important for the  $-S$  treatment after 5 d, even under lower UVR conditions.

Finally, the UVR effect on lipids was determined because UVR is a known source of reactive oxygen species, which increase oxidative stress in photosynthetic organisms (Lesser et al. 1994, Foyer & Shigeoka 2011). However, oxidative stress may also be increased if the antioxidant mechanisms of cells are stopped or diminished. One of the consequences of oxidative stress is lipid peroxidation, as a result of the oxidation of unsaturated lipids; this process has been reported in most algal groups (Malanga & Puntarulo 1995, Lesser 1996, Malanga et al. 1997, Rijstenbil 2001, 2002). However, it is noteworthy that lipid peroxidation did not happen in the full nutrient treatment, which can be attributed to the full effec-

tiveness of repair mechanisms that had no limitation from nutrient availability. Nutrient limitation is known to induce ROS production and decrease the repair capability of a cell (Berges & Falkowski 1998, Logan et al. 1999, Bucciarelli & Sunda 2003, Menon et al. 2013). Here, the combined effect of limitation of essential nutrients like N and S needed for oxidative repair mechanisms under PAB conditions resulted in increased lipid peroxidation (Lesser et al. 1994, Litchman et al. 2002, Van De Poll et al. 2005).

Based on appropriate control of the nutrient and light growing conditions, our data showed that it would be feasible to control productivity, growth and UVR acclimation of *Chlorella fusca* cultures. These processes would lead to changes in the biochemical composition of the algal cells, which may result in the bioaccumulation of molecules at rates that make its commercial exploitation feasible.

**Acknowledgements.** We acknowledge the financial and technical (use of PAM fluorometers) support by Walz to the GAP 9 Workshop 'Influence of the pulsed-supply of nitrogen on primary productivity in phytoplankton and marine macrophytes: an experimental approach'. We also thank Redox, the University of Málaga, Ministry of Economy and Competitiveness of Spanish Government (Acción Complementaria CTM2011-15659-E) and the Spanish Institute of Oceanography. The participation of E.N. was also supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness of Spanish Government (Ref. BFU2010-22053).

#### LITERATURE CITED

- Acién Fernández FG, González-López CV, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E (2012) Conversion of CO<sub>2</sub> into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO<sub>2</sub> removal? *Appl Microbiol Biotechnol* 96:577–586
- Adarme-Vega TC, Lim DKY, Timmins M, Vernen F, Li Y, Schenk PM (2012) Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb Cell Fact* 11:96
- Aphalo PJ, Albert A, Mcleod AR, Robson TM, Rosenqvist E (eds) (2012) Beyond the visible. A handbook of best practice in plant UV photobiology. University of Helsinki
- Azov Y (1982) Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures inorganic carbon uptake in algal cultures. *Appl Environ Microbiol* 43:1300–1306
- Barbieri ES, Villafañe VE, Helbling EW (2002) Experimental assessment of UV effects on temperate marine phytoplankton when exposed to variable radiation regimes. *Limnol Oceanogr* 47:1648–1655
- Barsanti L, Gualtieri P (2006) Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology. Taylor & Francis, Boca Raton, FL
- Beardall J (1991) Effects of photon flux density on the 'CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism' of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J Plankton Res* 13:133–141
- Beardall J, Raven JA (2004) The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia* 43:26–40
- Berges JA, Falkowski PG (1998) Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: induction of proteases in response to nitrogen or light limitation. *Limnol Oceanogr* 43:129–135
- Berges JA, Charlebois DO, Mauzerall DC, Falkowski PG (1996) Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. *Plant Physiol* 110:689–696
- Bouchard JN, Longhi ML, Roy S, Campbell DA, Ferreyra G (2008) Interaction of nitrogen status and UVB sensitivity in a temperate phytoplankton assemblage. *J Exp Mar Biol Ecol* 359:67–76
- Boussiba S, Richmond A (1979) Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch Microbiol* 120:155–159
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bucciarelli E, Sunda WG (2003) Influence of CO<sub>2</sub>, nitrate, phosphate, and silicate limitation on intracellular dimethylsulfoniopropionate in batch cultures of the coastal diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol Oceanogr* 48:2256–2264
- Buma AGJ, Zemmeling HJ, Sjollem K, Gieskes WWC (1996) UVB radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Mar Ecol Prog Ser* 142:47–54
- Buma AGJ, Boelen P, Jeffrey WA (2003) UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. In: Helbling W, Zagarese H (eds) Comprehensive series in photosciences: UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Cabrera S, Lopez M, Tartarotti B (1997) Phytoplankton and zooplankton response to ultraviolet radiation in a high-altitude Andean lake: short- versus long-term effects. *J Plankton Res* 19:1565–1582
- Carrillo P, Delgado-Molina JA, Medina-Sánchez JM, Bullesos FJ, Villar-Argaiz M (2008) Phosphorus inputs unmask negative effects of ultraviolet radiation on algae in a high mountain lake. *Glob Change Biol* 14:423–439
- Chen CY, Durbin EG (1994) Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 109:83–94
- Cockell CS, Knowland J (1999) Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol Rev Camb Philos Soc* 74:311–345
- De Pauw N, Persoone G (1988) Microalgae for aquaculture. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds) Microalgal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, p 197–221
- Dean AP, Sigee DC, Estrada B, Pittman JK (2010) Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour Technol* 101:4499–4507
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1:21–26
- Díaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P and others (2006) Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47:74–83
- Eilers PHC, Peeters JCH (1988) A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol Modell* 42:199–215

- Figueroa F, Mercado J, Jiménez C, Salles S and others (1997) Relationship between bio-optical characteristics and photoinhibition of phytoplankton. *Aquat Bot* 59:237–251
- Figueroa FL, Santos R, Conde-Álvarez R, Mata L and others (2006) The use of chlorophyll fluorescence for monitoring photosynthetic condition of two tank-cultivated red macroalgae using fishpond effluents. *Bot Mar* 49:275–282
- Figueroa FL, Bueno A, Korbee N, Santos R, Mata L, Schuenhoff A (2008) Accumulation of mycosporine-like amino acids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of gilthead sea bream, *Asparus aurata*. *J World Aquacult Soc* 39:692–699
- Figueroa FL, Jerez CG, Korbee N (2013) Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. *Lat Am J Aquat Res* 41: 801–819
- Flores-Moya A, Hanelt D, Figueroa FL, Altamirano M, Viñepla B, Salles S (1999) Involvement of solar UV-B radiation in recovery of inhibited photosynthesis in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux. *J Photochem Photobiol B* 49:129–135
- Foyer CH, Shigeoka S (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* 155:93–100
- Gao K, Wu Y, Li G, Wu H, Villafañe VE, Helbling EW (2007) Solar UV radiation drives CO<sub>2</sub> fixation in marine phytoplankton: a double-edged sword. *Plant Physiol* 144: 54–59
- Geider RJ, MacIntyre HL, Graziano LM, McKay RML (1998) Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *Eur J Phycol* 33:315–332
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990:87–92
- Germ M, Drmaz D, Sisko M, Gaberscik A (2002) Effects of UV-B radiation on green alga *Scenedesmus quadricauda*: growth rate, UV-B absorbing compounds and potential respiration in phosphorus rich and phosphorus poor medium. *Phyton (Horn)* 42:25–37
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I and others (2012) Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J Appl Phycol* 24: 1477–1486
- Golaszewski J, Upadhyaya MK (2003) The effect of UV-B radiation on plant growth and development. *Plant Soil Environ* 49:135–140
- Grobbelaar JU (1989) Do light/dark cycles of medium frequency enhance phytoplankton productivity? *J Appl Phycol* 1:333–340
- Grossman A, Takahashi H (2001) Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:163–210
- Häder DP, Figueroa FL (1997) Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochem Photobiol* 66:1–14
- Hanelt D, Hawes I, Rae R (2006) Reduction of UV-B radiation causes an enhancement of photoinhibition in high light stressed aquatic plants from New Zealand lakes. *J Photochem Photobiol B* 84:89–102
- Hase E, Otsuka H, Mihara S, Tamiya H (1959) Role of sulfur in the cell division of *Chlorella*, studied by the technique of synchronous culture. *Biochim Biophys Acta* 35: 180–189
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198
- Hegglin MI, Shepherd TG (2009) Large climate-induced changes in ultraviolet index and stratosphere-to-troposphere ozone flux. *Nat Geosci* 2:687–691
- Helbling E, Gao K, Gonçalves R, Wu H, Villafañe V (2003) Utilization of solar UV radiation by coastal phytoplankton assemblages off SE China when exposed to fast mixing. *Mar Ecol Prog Ser* 259:59–66
- Helbling EW, Gao K, Ai H, Ma Z, Villafañe VE (2006) Differential responses of *Nostoc sphaeroides* and *Arthrospira platensis* to solar ultraviolet radiation exposure. *J Appl Phycol* 18:57–66
- Heraud P, Beardall J (2000) Changes in chlorophyll fluorescence during exposure of *Dunaliella tertiolecta* to UV radiation indicate a dynamic interaction between damage and repair processes. *Photosynth Res* 63:123–134
- Høiskar BAK, Haugen R, Danielsen T, Kylling A and others (2003) Multichannel moderate-bandwidth filter instrument for measurement of the ozone-column amount, cloud transmittance, and ultraviolet dose rates. *Appl Opt* 42:3472–3479
- Illman AM, Scragg AH, Shales SW (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol* 27:631–635
- Izard J, Limberger RJ (2003) Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *J Microbiol Methods* 55:411–418
- Jerez CG, Navarro E, Malpartida I, Rico RM, Masojídek J, Abdala R, Figueroa FL (2014) Hydrodynamics and photosynthesis performance of *Chlorella fusca* grown in a thin-layer cascade (TLC) system. *Aquat Biol* 22:111–122
- Karentz D, Cleaver JE, Mitchell DL (1991) Cell-survival characteristics and molecular responses of antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J Phycol* 27: 326–341
- Kasai F, Arts MT (1998) The interactive effects of UV-B radiation and a herbicide on uptake and allocation of carbon in two strains of the green alga *Scenedesmus*. *Aquat Ecol* 31:261–272
- Knight JA, Anderson S, Rawle JM (1972) Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin Chem* 18:199–202
- Kolber Z, Zehr J, Falkowski P (1988) Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiol* 88: 923–929
- Korbee N, Mata MT, Figueroa FL (2010) Photoprotection mechanisms against ultraviolet radiation in *Heterocapsa* sp. (Dinophyceae) are influenced by nitrogen availability: mycosporine-like amino acids vs. xanthophyll cycle. *Limnol Oceanogr* 55:899–908
- Kosourov S, Seibert M, Ghirardi ML (2003) Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Plant Cell Physiol* 44:146–155
- Krause GH, Jahns P (2004) Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In: Papageorgiou G, Govindjee (eds) *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Dordrecht, p 463–495
- Kromkamp JC, Forster RM (2003) The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring



- protocols and suggested terminology. *Eur J Phycol* 38: 103–112
- Lesser M (1996) Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Mar Ecol Prog Ser* 132:287–297
- Lesser MP, Cullen JJ, Neale PJ (1994) Carbon uptake in a marine diatom during acute exposure to ultraviolet B radiation: relative importance of damage and repair. *J Phycol* 30:183–192
- Leustek T, Saito K (1999) Update on biochemistry sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol* 120: 637–644
- Li Y, Horsman M, Wu N, Lan C, Dubois-Calero N (2008) Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog* 24:815–820
- Litchman E, Neale PJ, Banaszak AT (2002) Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: photoprotection and repair. *Limnol Oceanogr* 47:86–94
- Logan BA, Demmig-Adams B, Rosenstiel TN, Adams WW III (1999) Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics. *Planta* 209:213–220
- Malanga G, Puntarulo S (1995) Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiol Plant* 94:672–679
- Malanga G, Calmanovici G, Puntarulo S (1997) Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. *Physiol Plant* 101:455–462
- Mata TM, Almeida R, Caetano NS (2013) Effect of the culture nutrients on the biomass and lipid productivities of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Chem Eng Sci* 32:973–978
- McKenzie RL, Aucamp PJ, Bais AF, Björn LO, Ilyas M, Madronich S (2011) Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem Photobiol Sci* 10: 182–198
- Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 122:127–136
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy* 34:1–5
- Menon KR, Balan R, Suraishkumar GK (2013) Stress induced lipid production in *Chlorella vulgaris*: relationship with specific intracellular reactive species levels. *Biotechnol Bioeng* 110:1627–1636
- Mitchell D, Karentz D (1993) The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In: Young A, Moan J, Björn L, Nultsch W (eds) *Environmental UV photobiology*. Springer, New York, NY, p 345–377
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta* 1767:414–421
- Navarro E, Robinson CT, Wagner B, Behra R (2007) Influence of ultraviolet radiation on UVR-absorbing compounds in freshwater algal biofilms and *Scenedesmus vacuolatus* cultures. *J Toxicol Environ Health A* 70: 760–767
- Navarro E, Robinson CT, Behra R (2008) Increased tolerance to ultraviolet radiation (UVR) and cotolerance to cadmium in UVR-acclimatized freshwater periphyton. *Limnol Oceanogr* 53:1149–1158
- Navarro E, Muñiz S, Korkaric M, Wagner B, de Cáceres M, Behra R (2014) Ultraviolet radiation dose calculation for algal suspensions using UVA and UVB extinction coefficients. *J Photochem Photobiol B* 132:94–101
- Niyogi KK, Björkman O, Grossman R (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14162–14167
- Nilawati J, Greenberg BM, Smith REH (1997) Influence of ultraviolet radiation on growth and photosynthesis of two cold ocean diatoms. *J Phycol* 33:215–224
- Pessoa MF (2012) Harmful effects of UV radiation in algae and aquatic macrophytes—a review. *Emirates J Food Agric* 24:510–526
- Rijstenbil J (2001) Effects of periodic, low UVA radiation on cell characteristics and oxidative stress in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. *Eur J Phycol* 36: 1–8
- Rijstenbil J (2002) Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation. *J Plankton Res* 24:1277–1288
- Rosales-Loaiza N, Guevara M, Lodeiros C, Morales E (2008) Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Rev Biol Trop* 56:421–429
- Schenk H, Hanf J, Neumüller M (1983) The phycobiliproteins in *Cyanophora paradoxa* as accessory pigments and nitrogen storage. *Z Naturforsch C Biosci* 38:972–977
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1995) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM (eds) *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer Study Edition Vol 100, Springer-Verlag, Berlin, p 47–70
- Schultz HR (2000) Climate change and viticulture: a European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Aust J Grape Wine Res* 6:2–12
- Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5:1532–1553
- Shick JM, Dunlap WC (2002) Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu Rev Physiol* 64:223–262
- Smart CM (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol* 126:419–448
- Sobrinho C, Montero O, Lubián LM (2004) UV-B radiation increases cell permeability and damages nitrogen incorporation mechanisms in *Nannochloropsis gaditana*. *Aquat Sci* 66:421–429
- Sobrinho C, Neale PJ, Lubián LM (2005) Interaction of UV radiation and inorganic carbon supply in the inhibition of photosynthesis: spectral and temporal responses of two marine picoplankters. *Photochem Photobiol* 81: 384–393
- Sorokin C, Krauss RW (1958) The effects of light intensity on the growth rates of green algae. *Plant Physiol* 33: 109–113
- Stengel DB, Connan S, Popper ZA (2011) Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol Adv* 29:483–501
- Talarico L, Maranzana G (2000) Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. *J Photochem Photobiol B* 56:1–11
- Tandeau de Marsac N, Houmardd J (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps

- towards molecular mechanisms. FEMS Microbiol Rev 104:119–190
- Tredici MR (2010) Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. Biofuels 1:143–162
- Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt Int Ver Theor Angew Limnol 9:1–38
- Van De Poll W, Van Leeuwe M, Roggeveld J, Buma AGJ (2005) Nutrient limitation and high irradiance acclimation reduce PAR and UV-induced viability loss in Antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae). J Phycol 41:840–850
- Villafañe VE, Sundbäck K, Figueroa FL, Helbling EW (2003) Photosynthesis in the aquatic environment is affected by UVR. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Vincent WF, Neale PJ (2000) Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In: de Mora S, Demers S, Vernet M (eds) The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge University Press, New York, NY, p 149–176
- Watanabe S, Sudo K, Nagashima T, Takemura T, Kawase H, Nozawa T (2011) Future projections of surface UV-B in a changing climate. J Geophys Res 116:D16118, doi: 10.1029/2011JD015749
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J Plant Physiol 144:307–313
- Wilhelm C, Jakob T (2011) From photons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. Appl Microbiol Biotechnol 92:909–919
- Wu H, Gao K, Ma Z, Watanabe T (2005) Effects of solar ultraviolet radiation on biomass production and pigment contents of *Spirulina platensis* in commercial operations under sunny and cloudy weather conditions. Fish Sci 71: 454–456
- Wulff A, Sundba K, Nilsson C, Underwood GJC (2000) Effects of UVB radiation on a marine microphytobenthic community growing on a sand-substratum under different nutrient conditions. Limnol Oceanogr 45:1144–1152
- Yeh KL, Chang JS (2012) Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. Bioresour Technol 105:120–127
- Young EB, Beardall J (2003) Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. J Phycol 905:897–905
- Yu J, Tang X, Zhang P, Tian J, Cai H (2004) Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on photosynthesis, lipid peroxidation and activities of antioxidative enzymes of *Platymonas subcordiformis* subjected to UV-B radiation stress. Acta Bot Sin 46:682–690
- Zhang L, Happe T, Melis A (2002) Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). Planta 214:552–561

Submitted: December 13, 2013; Accepted: August 6, 2014

Proofs received from author(s): October 10, 2014

