

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LA MICROALGA MARINA *Chroomonas* sp. , EN FUNCIÓN DEL pH, INTENSIDAD LUMINOSA Y SALINIDAD

¹José Luis Bermúdez, ²César Lodeiros y ¹Ever Morales

RESUMEN

Se reporta la caracterización de la microalga marina *Chroomonas*, aislada de una laguna salina ubicada al norte de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. El crecimiento y producción de pigmentos en cultivos discontinuos, se evaluó en función de la salinidad (5, 10, 35, 50, 70 y 100 ppm), intensidad luminosa (39, 78, 117 y 156 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y pH (5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0). La mayor densidad celular de $117.99 \pm 2.62 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$, se alcanzó a 35 ppm, 156 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y a un pH entre 6.0 y 8.0. El contenido celular de clorofila total y carotenoides se incrementa con la salinidad hasta 100 ppm, con 246.55 ± 61.8 y $69.79 \pm 18.19 \text{ fg.cel}^{-1}$ respectivamente. *Chroomonas* sp. demostró alta capacidad de producción de biomasa y de pigmentos cuando se cultivó a un volumen de 2.0 l en régimen semicontinuo y a una tasa de renovación diaria del 30 %. La productividad celular fue de $4.31 \times 10^9 \text{ cel.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$; mientras que la de clorofila total y carotenoides de $1.4 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ y $0.48 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados indican que esta microalga planctónica podría ser utilizada diariamente como alimento vivo en acuicultura y para la producción de biomasa microalgal y/o pigmentos.

PALABRAS CLAVES: *Microalga, cultivo, Chroomonas, pH, salinidad, biomasa.*

ABSTRACT

We report the characterization of a marine microalga of the genus *Chroomonas*, isolated from a salt lagoon located to the north of Maracaibo, Zulia State, Venezuela. We evaluated the growth and the pigment production in discontinuous culture at different salinities (5, 10, 35, 50, 70 y 100 ppm), light intensities (39, 78, 117 and 156 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and pH (5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0). The highest cellular density, $117.99 \pm 2.62 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$, was reached at 35ppm, 156 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light intensity and a pH between 6.0 and 8.0. The cellular content of total chlorophyll and carotenoids increased with the salinity up to 100 ppm, with amounts of 246.55 ± 61.8 y $69.79 \pm 18.19 \text{ fg.cel}^{-1}$, respectively. The cellular productivity $4.31 \times 10^9 \text{ cel.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ was obtained when the microalga, was grown in semi-continuous culture, at a 2.0 l volume and at a daily renewal rate of 30 % (v/v). The total amount of chlorophyll and carotenoids was 1.4 and 0.48 $\text{mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectively. This results indicate that this planktonic microalga could be used as daily live food for larvae in aquaculture and for the production of microalgal biomass and/or pigments.

KEY WORDS: *Microalga, culture, Chroomonas, pH, salinity, biomass*

INTRODUCCIÓN

Las microalgas marinas constituyen la base de la cadena nutritiva en el cultivo de moluscos, peces y crustáceos. Además, sirven de alimento a especies intermediarias utilizadas como presas vivas en acuicultura.

La evaluación de microalgas de posible interés económico se realiza con la finalidad de obtener las condiciones óptimas que permitan alcanzar una mayor productividad de biomasa en cultivos discontinuos, mediante la evaluación de la luz, pH, nutrientes, salinidad, temperatura y otros factores sobre el crecimiento y composición bioquímica (Boeing, 1999). Sin embargo, es necesario aplicar metodologías que permitan incrementar la producción de biomasa microalgal mediante cosecha diaria de cultivos de microalgas de interés en acuicultura o con potencial biotecnológico. Los sistemas de cultivos semicontínuos, permiten mejorar la eficiencia en la productividad y modificación de la composición bioquímica a través del efecto de la tasa de renovación y de la concentración de nutrientes. Entre las especies estudiadas se indican *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella autrophica*, *Nannchloropsis* sp. y *Porphyridium* sp. (Otero y Fábregas, 1998; Otero, 1994).

En las microalgas marinas nativas se requiere caracterizar sus propiedades bioquímicas y fisiológicas en cultivos discontinuos. En este sentido, es importante evaluar la influencia de diversos parámetros ambientales sobre el crecimiento y composición bioquímica de pigmentos, con la finalidad de integrar conocimiento en relación a las condiciones que optimicen la producción de biomasa microalgal y la de productos de interés comercial. Tal es el caso de la microalga *Chroomonas* sp. de interés en acuicultura y caracterizada por presentar un tamaño relativamente pequeño, ausencia de pared celular, alta motilidad y por ser fuente de ácidos grasos poliinsaturados (Volkman *et al.*, 1989; Henderson y Mackinlay, 1989).

En Venezuela no existen reportes de identificación, aislamiento y cultivo de esta especie de microalga marina. Por esta razón, es de importancia caracterizar fisiológicamente esta microalga con la finalidad de introducirla en el cultivo de larvas de camarones, peces, *Artemia* y moluscos. Así mismo, esta cepa por ser autóctona y tropical resulta de interés por su adaptabilidad a estos ambientes, con lo cual se contribuirá a disminuir los costos de producción de biomasa para acuicultura.

En este trabajo se planteó como objetivo general, evaluar el crecimiento y la producción de pigmentos de la microalga *Chroomonas* sp. en función de la salinidad, intensidad luminosa y pH en cultivos discontinuos y semicontínuos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cultivos unialgales de la microalga *Chroomonas* sp., aislada en la laguna salina de Gato Negro, a 10°43'10" y 10°45'50" latitud Norte y 71°35'2" y 71°40'50" longitud Este, al Norte de Maracaibo. Esta microalga es mantenida en la colección de microalgas del Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, La Universidad del Zulia.

COLECTA DEL AGUA Y MEDIO DE CULTIVO

El agua de mar fue obtenida en las playas de Buchuaco, Península de Paraguaná, Estado Falcon y previa filtración fue ajustada la salinidad con agua destilada hasta obtener las concentraciones deseadas. Luego fue esterilizada a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos utilizando un autoclave. Después de haber esterilizado el agua se procedió al enriquecimiento de ésta con medio de cultivo ALGAL a una concentración equivalente a 4 mM de NaNO₃.

DETERMINACIONES DE LOS CULTIVOS Y PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Densidad celular

El crecimiento de la microalga se siguió mediante recuento celular cada dos días hasta alcanzar la fase estacionaria y utilizando cámara de NEUBAUER. En la fase exponencial se calculó la velocidad de crecimiento (μ), expresada en div.día⁻¹ y el tiempo de duplicación (td).

Pigmentos

La determinación del contenido de clorofilas y carotenoides se realizó directamente sobre cultivos frescos y por duplicado. La extracción se realizó con acetona:metanol 2:1. La concentración de Clorofila *a* y *c* determinada según Jeffrey y Humphrey (1975) y los carotenoides mediante la ecuación propuesta por Strikland y Parsons (1972).

BIOENSAYOS

Influencia de la Salinidad

El crecimiento y contenido de pigmentos se evaluó en función de la salinidad a 5, 10, 35, 50, 70 y 100 ppm. El agua de mar fue ajustada a las salinidades evaluadas y enriquecida con medio comercial ALGAL equivalente a una concentración de 4.0 mM de NaNO_3 . Los cultivos se realizaron por triplicado y mantenidos a una intensidad luminosa de $78 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, aireación constante, temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y durante 21 días.

Influencia de la intensidad luminosa

Para todos los bioensayos se utilizó iluminación lateral proporcionada por tubos fluorescentes de 40W. La intensidad luminosa fue determinada mediante un luxímetro Lutron Lx-101 y evaluada a 39, 78, 117, 156 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Los cultivos por tres réplicas fueron realizados a una salinidad de 35 ppm, a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y mantenidos durante 22 días. La salinidad indicada correspondió a la que produjo el mejor crecimiento en el experimento anterior.

Influencia del pH

Se evaluó el efecto del pH ajustado a 5, 5.5, 6, 7, 8 y 9 en los cultivos conteniendo buffer Tris-HCl 1 M. El agua de los cultivos fue preparada con 450 ml de agua de mar, luego se agregaron 2.7 g de buffer Tris-HCl 1M para obtener una solución 50 mM de concentración. Estas soluciones fueron luego ajustadas a los pH utilizados en este bioensayo con HCl y NaOH.

Para cada tratamiento se utilizaron tres replicas. Los cultivos se realizaron a una salinidad de 35 ppm y mantenidos a una temperatura de $27.8 \pm 2^\circ\text{C}$ y con una intensidad luminosa de $156 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ hasta alcanzar la fase estacionaria.

También se procedió a realizar un cultivo control sin buffer y sin ajustarle el pH. El inóculo inicial para todos los cultivos, incluyendo el control fue de $2 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$. Durante el ensayo, los pH de los cultivos fueron ajustados dos veces al día con soluciones de HCl o NaOH hasta el final del experimento.

Cultivo Semicontinuo

Los cultivos por triplicado se iniciaron con un inóculo de 2×10^6 cel.ml⁻¹ provenientes de cultivos discontinuos en fase exponencial. Una vez que los cultivos alcanzaron el final de la fase exponencial (día 12) se inició el régimen semicontinuo aplicando una tasa de renovación del 30 % diaria. Es decir, el 30% del cultivo extraído era renovado con este mismo volumen de agua de mar enriquecida con medio de cultivo fresco. Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 28.5 ± 2 e intensidad luminosa de $156 \mu\text{mol quanta.m}^2.\text{s}^{-1}$. La fase de estabilización celular se mantuvo durante 23 días y cada día era cosechado el cultivo para alimentar nauplios de *Artemia* (resultados no presentados). Para este cultivo se utilizaron frascos de 3.5 litros de capacidad con 2 litros de volumen de cultivo. Se utilizo iluminación lateral en periodos de luz:oscuridad de 12:12 horas e aireación constante.

Análisis estadísticos

En cada uno de los factores analizados (pH, intensidad luminosa y salinidad) y en las variables analizadas se compararon los datos mediante un ANOVA de una vía para la determinación de grupos significativamente diferentes. En todos los casos donde la prueba F resultó significativa, se empleo la prueba de rangos múltiples de Scheffé's a un nivel de significancia del 95 %, mediante el programa StatMost for Windows versión 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES

Salinidad

La microalga *Chroomonas* sp. carente de pared celular, creció a las diferentes salinidades evaluadas, entre 5.0 y 100 ppm. Los resultados indican que la microalga incrementa su crecimiento con la salinidad hasta 35 ppm; con la cual se alcanzó la densidad celular de $100.35 \pm 18.70 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ con diferencia significativa respecto a las demás salinidades. Sin embargo, el crecimiento disminuyó a mayores salinidades hasta 100 ppm con $52.95 \pm 8.07 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ (Figura 1).

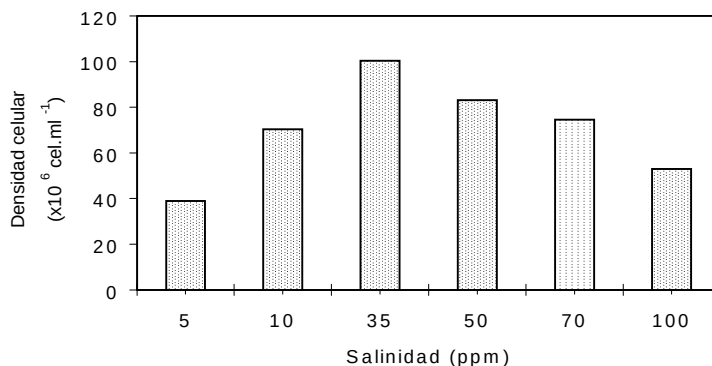


Figura 1. Influencia de la salinidad sobre la densidad celular en la microalga *Chroomonas* sp.

A todas las salinidades ensayadas, la microalga produjo concentraciones elevadas de clorofila total entre 166.33 ± 25.91 y 246.55 ± 61.82 fg.cel $^{-1}$ (Figura 2). El análisis de varianza no registró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las concentraciones de clorofila obtenidas con las salinidades estudiadas. Esto significa que para optimizar la producción de clorofila se puede seleccionar el rango de salinidad entre 5 y 100 ppm. El incremento del contenido pigmentos con la salinidad es conocido en microalgas halófilas. Se encontró un alto contenido de clorofila y carotenos a elevadas concentraciones de NaCl en la microalga *Dunaliella viridis* (Yépez y Morales, 1998). Sin embargo con la *Cryptomonas* sp., no hubo cambios significativos en la concentración celular de clorofila con salinidades entre 2.5 y 35 ppm. De igual manera se obtuvieron resultados similares con *Syracosphaera carterae*, *Cyclotella* sp. y *Thalassiosira decipiens* en el mismo rango de salinidad (McLachlan, 1961).

La relación clorofila/carotenoides, parece incrementarse con la salinidad hasta estabilizarse a partir de 50 ppm, con un valor de 3.50. Esto indica que la capacidad fotosintética posiblemente no varía con la salinidad, por cuanto no se produce un incremento de los carotenoides como indicativo de estrés salino.

Los estudios relacionados con los efectos de la salinidad sobre distintas especies de microalgas marinas indican que el rango óptimo para el crecimiento es variado. Por ejemplo, algunas especies sólo crecen entre 10 y 35 ppm como

D. tertiolecta. Mientras que otras no presentan diferencias en su crecimiento al hacerlas crecer en 0 y 35 ppm de salinidad (Fábregas *et al.*, 1986).

La lisis celular producida al inocular la microalga en agua dulce demuestra su incapacidad de adaptación a sistemas de aguas no salinas, debido a que no pueden regular los cambios osmóticos para mantener su integridad celular. Este efecto, también ha sido reportado en *Chroomonas salina* cuando se analizó la tolerancia del fitoplancton a la salinidad (Brand, 1984).

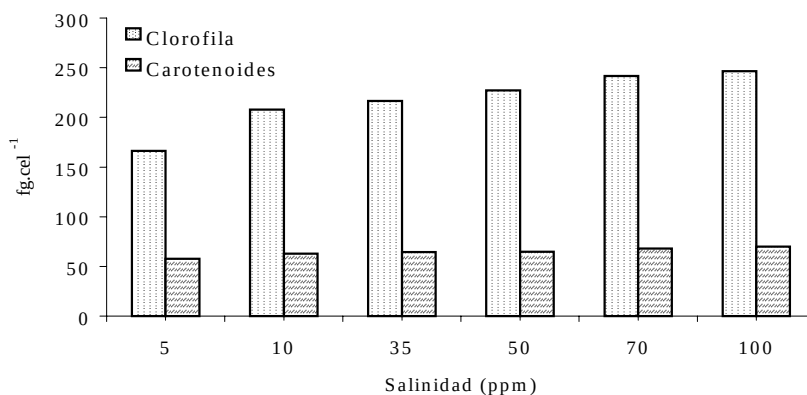


Figura 2. Influencia de la salinidad sobre el contenido de clorofila total y carotenoides en la microalga *Chroomonas* sp.

Intensidad Luminosa

Los análisis estadísticos indican que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.05$) entre las cuatro intensidades luminosas. El crecimiento de la microalga fue proporcional a la intensidad luminosa. Es decir, se alcanzó la menor densidad celular, de $54.01 \pm 8.76 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ a $39 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Mientras que la más elevada se produjo con $156 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a 164.55×10^6 cel.ml⁻¹ (Figura 3).

El tiempo de duplicación, resultó ser inversamente proporcional a la intensidad luminosa. El más bajo de 0.87 días se produjo en los cultivos expuestos a $156 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y el más alto de 2.41 días en los mantenidos a $39 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

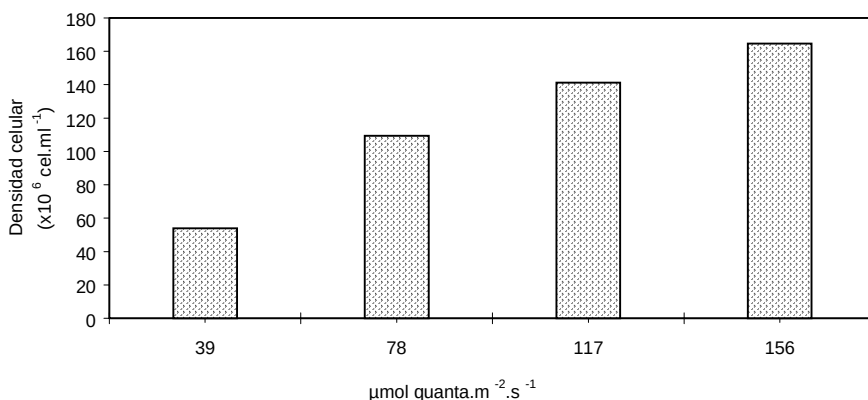


Figura 3. Densidad celular alcanzada durante la fase estacionaria de los cultivos de *Chroomonas* sp. bajo diferentes intensidades luminosas

En las microalgas se ha demostrado que el incremento de la densidad celular está en función de la intensidad luminosa. Tal es el caso de *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Tetraselmis suecica* (Kaplan *et al.*, 1986; López-Muños *et al.*, 1990).

Aunque cada microalga presenta un rango óptimo de intensidad luminosa para el crecimiento, en nuestro caso se evaluaron intensidades hasta $156 \text{ quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Es posible que *Chroomonas* sp. puede incrementar su crecimiento a intensidades luminosas más elevadas.

El incremento de la intensidad luminosa produjo una disminución del contenido de clorofila y carotenoides, con una diferencia significativa ($P < 0.05$). El contenido de estos pigmentos presenta una relación inversamente proporcional con la intensidad luminosa del cultivo. De esta manera la mayor producción de estos pigmentos de 266.77 ± 68.72 y $78.24 \pm 22.26 \text{ fg.cel}^{-1}$ para la clorofila total y carotenoides respectivamente se obtuvo en los cultivos con la menor intensidad luminosa de, $39 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Mientras que la concentración de clorofila y carotenoides disminuyó con la mayor intensidad luminosa utilizada (Figura 4).

La respuesta obtenida de *Chroomonas* sp. bajo las diferentes intensidades luminosas estudiadas es característica de muchas microalgas, las cuales aumentan su contenido de pigmentos al disminuir la intensidad luminosa optimizando su habilidad para captar la luz (Richardson *et al.*, 1983).

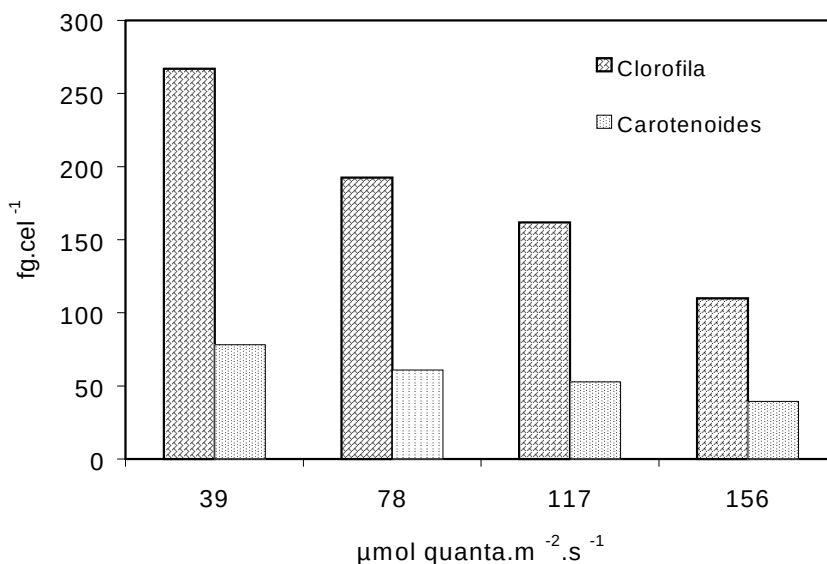


Figura 4. Influencia de la salinidad sobre el contenido de clorofila total y carotenoides en la microalga *Chroomonas* sp.

Estudios sobre la adaptación de las plantas a la luz y la sombra, indican que con la disminución en la intensidad de la luz, se observa el aumento en el contenido de pigmentos en las microalgas *Dunaliella tertiolecta* y *Skeletonema costatum* (Falkowski y Owens, 1980). En ambas especies la disminución en la intensidad de luz puso de manifiesto las diferencias adaptativas que poseen, por ejemplo, el aumento en el número de unidades fotosintéticas para *D. tertiolecta* y el aumento en el tamaño de las unidades fotosintéticas para *S. costatum*.

Las variaciones del contenido de pigmentos, se reflejan como cambios característicos en el tamaño y número de la unidad fotosintética por célula, la cual comprende los centros de reacción, en conjunto con las moléculas de clorofila-pigmento antena, los pigmentos accesorios y los transportadores de electrones. Para las especies del género *Dunaliella*, los reportes indican que a baja intensidad luminosa, la microalga experimenta un aumento en el número de unidades fotosintéticas por célula. Estudios de la intensidad luminosa en diferentes cepas de *Dunaliella* demostraron que existía un efecto aditivo de la intensidad luminosa sobre el crecimiento de la microalga (Ginzburg, 1987).

La relación clorofila/caroteno en las células expuestas a la menor intensidad luminosa obedece al mayor contenido de clorofila significativamente superior que la obtenida a las otras intensidades luminosas más elevadas, en las cuales parece estabilizarse esta relación.

pH

La microalga *Chroomonas* sp. creció en todos los cultivos tamponados entre 5.5 y 7.0, los cuales alcanzaron densidades celulares de $117.99 \pm 2.62 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ a pH 6.0, $108.21 \pm 11.32 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ a pH 7.0 y $96.56 \pm 10.23 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ a pH 5.5 (Tabla 1). Sin embargo, cuando la microalga procedente de un cultivo a pH 7.6, se inoculó a los medios de cultivo con Buffer Tris-HCl a pH 8.0 y 9.0, se produjo sedimentación del cultivo y lisis celular, lo que sugiere que tal efecto es letal a estos pH. Esto probablemente sea debido, a la incapacidad de la microalga de resistir cambios bruscos de pH y al tipo de solución amortiguadora empleada. Igualmente un ajuste de pH 5.0 a cultivos de la microalga también induce la muerte celular. A pesar de estos resultados, la microalga es capaz de mantener un crecimiento excelente en cultivos no tamponados y no ajustados a un pH determinado; tal es el caso del cultivo control.

El análisis de rangos múltiples indicó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los cultivos a pH 6.0 y 5.5. Estos resultados nos permiten sugerir que el rango de pH para el cultivo de la microalga *Chroomonas* sp. está entre 5.5 y 7.0, con una inhibición acusada del crecimiento y muerte celular en los cultivos tamponados inferiores y superiores a este intervalo. Aunque, no exista diferencia significativa de las densidades celulares en fase estacionaria, entre el control (pH $\approx$ 8.0), pH 7.0 y 6.0, los resultados obtenidos de μ y td, parecen indicar que el pH óptimo está entre 6.0 y 7.0 (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia del pH sobre los parámetros de crecimiento y la densidad celular de la microalga *Chroomonas* sp.

	pH	μ (div.día⁻¹)	td (día)	D.C. $\pm$ std ($\times 10^6$ cel.ml⁻¹)
Control	0.45		1.55	105.06 ± 15.92
	5.5	0.72	0.94	99.56 ± 10.21
	6.0	0.86	0.80	117.99 ± 2.62
	7.0	0.74	0.97	108.21 ± 11.32

td: Tiempo de duplicación. D.C.: Densidad celular. μ : Velocidad de crecimiento. std: Desviación estándar. Control: sin tampón.

El contenido celular de clorofila total fue proporcional al incremento del pH, observándose los valores más elevados en los tratamientos a pH neutro y control no tamponado (Figura 5).

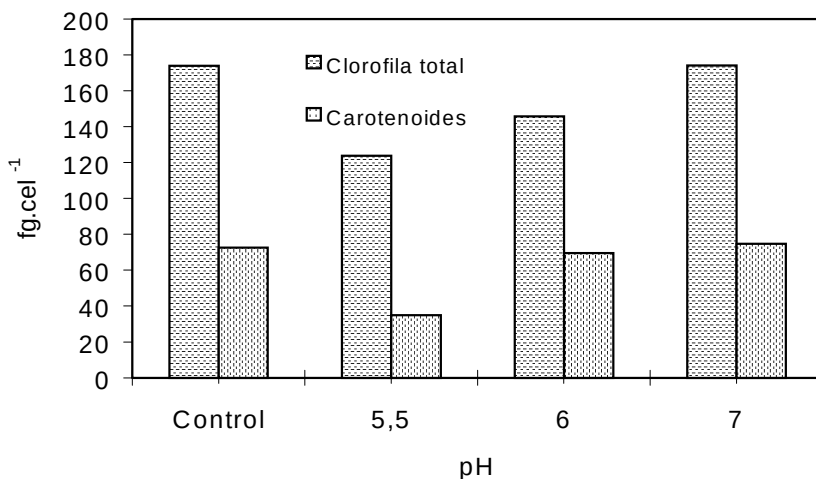


Figura 5. Influencia del pH sobre el contenido de clorofila total y carotenoides en la microalga *Chroomonas* sp.

El contenido celular de clorofila total fue significativamente inferior ($P < 0.05$) para los tratamientos a pH 5.5 con 123.19 ± 35.47 fg.cel⁻¹ al compararlos con el tratamiento control con 174.03 ± 37.45 fg.cel⁻¹ y los cultivos a pH 6.0 y 7.0, los cuales presentaron una concentración de clorofila de 145.87 ± 48.68 y 174.19 ± 51.97 fg.cel⁻¹ respectivamente. De acuerdo a los análisis estadísticos realizados, las concentraciones de clorofila total de los tratamientos control, pH 6.0 y 7.0, no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$).

El contenido celular de carotenoides, fue superior en los cultivos a pH 7.0 con 74.73 ± 8.56 fg.cel⁻¹, seguido de los tratamientos control y a pH 6.0 con 72.69 ± 8.87 y 69.57 ± 12.90 fg.cel⁻¹ respectivamente. Mientras que el valor más bajo de carotenoides fue de 34.89 ± 5.0 fg.cel⁻¹ para los cultivos a pH 5.5 (Figura 5), siendo este valor estadísticamente inferior ($P < 0.05$) a los restantes tratamientos.

Muchas microalgas presentan pH óptimos para su crecimiento y producción de pigmentos en rangos neutros a alcalinos (Dorling *et al.*, 1997). Este es el caso de la microalga utilizada en nuestro estudio. Mientras que otras especies se desarrollan a bajos pH (Albertano *et al.*, 1971; Raven, 1990). En *Chlorella* sp. se han detectado concentraciones elevadas de clorofila a pH 7.0 (Albertano *et al.*, 1971). En cultivos de *Dunaliella viridis* se reporta una mejor eficiencia fotosintética a valores de pH generalmente bajos (Morales, 1992; Borowitzka y Borowitzka, 1988; Wegmann y Metzner, 1971).

Para las especies carotenogénicas la producción del pigmento se incrementa con el aumento del pH aproximadamente hasta 9.5 (Borowitzka y Borowitzka, 1988). En *Dunaliella salina* a 3.0 M NaCl se registro un mayor contenido de carotenoides a pH 9.0. (Erazo *et al.*, 1989).

En cultivos discontinuos de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120, los mayores valores de clorofila-*a* se produjeron a pH 7.8 y 8.8, con un drástico descenso cuando la cianobacteria se hacía crecer a pH 9.8. De igual manera, los carotenoides también se acumularon en fase estacionaria a pH entre 7.8 y 8.8 (Morales *et al.*, 2002).

Dunaliella viridis en cambio, optimiza su crecimiento a pH entre 8.0 y 9.0; mientras que a pH entre 5.0 y 6.0 acusa un descenso de su densidad celular (Morales, 1992).

Estos resultados obtenidos en cultivos discontinuos de la microalga *Chroomonas* sp. indican que la salinidad, la intensidad luminosa y el pH, ejercen influencia en la producción de biomasa.

Los bioensayos establecidos en el presente trabajo permitieron conocer la influencia de los factores en la biomasa de la microalga por separado. No obstante, no permiten inferir sobre una posible influencia aditiva o sinérgica de los factores estudiados. En vista de ello se recomienda realizar estudios con diseños experimentales de interacción factorial en función de verificar la hipótesis de aditividad-sinergismo en la producción de biomasa microalgal.

CULTIVO SEMICONTÍNUO

El ensayo de escalamiento de 150 a 2000 ml permitió deducir que la microalga es capaz de crecer a un volumen de cultivo 13 veces superior al utilizado previamente. Además de resistir el régimen de cultivo a una tasa de renovación diaria del 30% hasta estabilizarse a una densidad celular de $21.53 \pm 4.16 \times 10^6$ cel.ml⁻¹.

El régimen semicontinuo comenzó al final de la fase exponencial, el día 12 cuando el cultivo presentaba una densidad celular de 42×10^6 cel.ml⁻¹. De acuerdo a la curva de crecimiento que se presenta en la figura 6, a partir del día 14 se logró una estabilización de la densidad celular con lo cual se confirma la capacidad de esta microalga para adaptarse a régimen de cultivo semicontinuo diario. Esto significa que esta microalga puede lograr una mayor eficiencia de producción diaria para fines de acuicultura, para alimentar larvas o producción de pigmentos y biomasa.

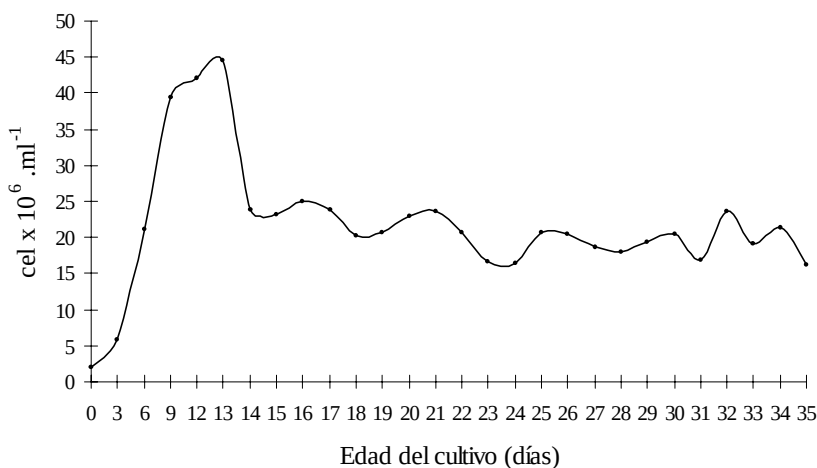


Figura 6. Influencia de la tasa de renovación (30 % v/v) sobre el crecimiento de la microalga *Chroomonas* sp. en cultivo semicontinuo

Estos resultados demuestran que los cultivos semicontinuos constituyen una herramienta óptima para la manipulación de la composición bioquímica de las microalgas y cuestionan la metodología utilizada comúnmente para el estudio del valor nutritivo de las distintas especies microalgales (Otero y Fábregas, 1998). Así mismo se ha demostrado la efectividad del sistema de cultivo semicontinuo para el estudio de los factores que controlan la síntesis de componentes celulares específicos de aplicación biotecnológica, como ácidos grasos insaturados de especies marinas, ficoeritrina y exopolisacáridos de *Porphyridium cruentum* (García, 1998).

La producción de clorofila en cultivos semicontinuos de la microalga, renovados diariamente al 30 %, se estabilizó a 177.78 ± 35.68 fg.cel⁻¹ y el de carotenos a 62.45 ± 13.11 fg.cel⁻¹ (Tabla 2). Por lo que la microalga es capaz de

estabilizar su densidad celular y la producción de pigmentos cuando es cultivada en régimen semicontinuo a una tasa de renovación del 30% diaria.

Tabla 2. Densidad celular de estabilización ($\times 10^6$ cel.ml⁻¹), contenido de pigmentos (fg.cel⁻¹), productividad celular ($\times 10^9$ cel.⁻¹l⁻¹d⁻¹), clorofila y carotenoides (mg.l⁻¹d⁻¹) de la microalga *Chroomonas* sp. en cultivos semicontinuo a una tasa de renovación diaria del 30 %.

	D.C.±std	Clorofila total±std	Carotenoides±std	Clo/Car
	21.53±4.16	177.78±35.68	62.45±13.11	2.85
Productividad	4.31	1.15	0.4	

D.C.±std = Densidad celular ± desviación estándar; Clo/Car: relación clorofila:carotenoides.

CONCLUSIONES

La microalga nativa, *Chroomonas* sp. demostró capacidad de crecimiento entre 5 y 100 ppm de salinidad, con una óptima a 35 ppm. Mientras que el contenido celular de clorofila y carotenoides se incrementa hasta un 100 ppm.

En cultivos tamponados, la microalga exhibe un crecimiento significativo entre 5.5 y 7.0. Sin embargo, cuando los cultivos se mantienen sin tampones, la microalga se adapta a incrementos lentos del pH hasta 8.8, produciendo también elevadas densidades celulares.

La intensidad luminosa influye sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga. Es decir, se obtiene un incremento de la densidad celular y una disminución del contenido de clorofila y carotenoides con la intensidad luminosa.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue financiada por Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA

- Albertano, P.; Pinto, G. y Santisi, S. 1971. *Spermatoxopsis acidophila* Kalina (Chlorophyta, Volvocales), a little-known alga from highly acidic environments. *G. Bot. Ital.* 115: 65-76.
- Boeing, P. 1999. Larval feed alternatives. <http://faq.thekrib.com/es/algas.html>. 20 pp.
- Borowitzka, M. y Borowitzka, L. 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press. New York. pp. 27-58.

- Brand, E. L. 1984. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 18: 543-556.
- Dorling, M.; McAuley, P. J. y Hodge, H. 1997. Effect of pH on growth and carbon metabolism of maltose-releasing *Chlorella* (Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 32: 19-24.
- Erazo, S.; Proust, P.; Viam, M. y Muller, K. 1989. Estudio de la biomasa y de los pigmentos carotenoides contenido en una especie nativa de la microalga *Dunaliella salina*. *Revista Agroquímica Tecnológica de Alimentos*. 29(4): 536-547.
- Fábregas, J.; Herrero, C.; Cabezas, B.; Liaño, R. y Abalde, J. 1986. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch culture. *J. Plant Physiol.* 125: 475-484.
- Falkowski, P. G. y Owens, T. G. 1980. Light-shape adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.* 66:592.
- García, D. 1998. Productos biotecnológicos de microalgas marinas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España, pp 181.
- Ginzburg, M. 1987. *Dunaliella*: A green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.* 14: 95-183.
- Henderson, R. J. y Mackinlay, E. E. 1989. Effect of temperature on lipid composition of the marine cryptomonad *Chroomonas salina*. *Phytochemistry*. 28(11): 2943-2948.
- Jeffrey, S. W. y Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural populations. *Biochem Physiol. Pflanz* 167: 191-194.
- Kaplan, D.; Cohen, Z. y Abeliovich, A. 1986. Optimal growth condition for *Isochrysis galbana*. *Biomass*. 9: 37-48.
- Lopez-Muñoz, I.; Fidalgo, A. y Herrero, C. 1990. Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes intensidades de luz. *Actas III Congreso Nac. Aquicult.* 657-662.
- McLachlan, J. 1961. The effect of salinity on growth and chlorophyll content in representative classes of unicellular marine algae. *Can. J. Microbiol.* 7: 399-406.
- Morales, E. 1992. Contribución al conocimiento de las condiciones óptimas de crecimiento de *Dunaliella viridis* (Chlorophyta: Volvocales) en cultivos de laboratorio. Trabajo de Ascenso. LUZ, Venezuela. pp. 9-11, 20-23.
- Morales, E., Rodríguez, M.; García, D.; Loreto C. y Marco, E. 2002. Crecimiento, Producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia* 27(7):1-6.
- Otero, A. 1994. Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España, pp 141.
- Otero, A. y Fábregas, J. 1998. Cultivos semicontinuos de microalgas marinas: La técnica y sus aplicaciones. En: Avances en el Cultivo de Microalgas y Cianobacterias. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.
- Raven, J. A. 1990. Sensing pH. *Plant Cell Environ.* 13: 721-729.
- Richardson, K.; Beardall, J. y Raven, J. A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: An analysis of strategies. *New Phytol.* 93:157-191.
- Strickland, J. y Parsons, T. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Canada. 167: 1-310.
- Volkman, J. K.; Jeffrey, S. W.; Nichols, P. D.; Rogers, G. I. y Garland, C. D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128(3): 219-240.
- Wegmann, K. y Metzner, H. 1971. Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Arch. Microbiol.* 78: 360-367.
- Yépez, M. y Morales, E. 1998. Efecto de la concentración de nitrato y cloruro de sodio sobre la densidad celular y contenido de pigmentos y proteínas de *Dunaliella viridis*. *Bol. Centro Invest. Biol.* 32(1): 1-12.

FECHA DE RECEPCIÓN: Feb. 26, 2001

FECHA DE ACEPTACIÓN: Ago. 15, 2002

DIRECCIÓN DE LOS AUTORES:

¹Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos, Dpto. Biología, Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela. Email: everm@iamnet.com

²Laboratorio de Acuicultura, Dpto. Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Venezuela.