

CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Skeletonema costatum* (GREVILLE, 1866) CLEVE, 1878 (HETEROKONTOPHYTA: BACILLARIOPHYCEAE) EN FUNCIÓN DE LA IRRADIANCIA Y DEL MEDIO DE CULTIVO

GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF *Skeletonema costatum* (GREVILLE, 1866) CLEVE, 1878 (HETEROKONTOPHYTA: BACILLARIOPHYCEAE) IN FUNCTION OF IRRADIANCE AND CULTURE MEDIUM

ALEIKAR VÁSQUEZ-SUÁREZ¹, MIGUEL GUEVARA², MAYELYS GONZÁLEZ³,
NATHALIE LEMUS⁴, BERTHA ARREDONDO-VEGA⁵

¹Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, estado Anzoátegui, Venezuela. ²Laboratorio de Acuicultura, Extensión Plancton, Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV), UDO-Sucre, estado Sucre, Venezuela. ³Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, estado Sucre, Venezuela. ⁴Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA), San Fernando de Apure, estado Apure, Venezuela. ⁵Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.

E-mail: valeikar@yahoo.es

RESUMEN

Con la finalidad de incrementar la producción de microalgas autóctonas que puedan ser utilizadas como alimento vivo, a menor costo en acuicultura, se estudió la influencia de dos medios de cultivo (Algal y Humus) y tres irradiancias (60, 120 y 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) sobre el crecimiento y composición bioquímica de la diatomea marina *Skeletonema costatum*, aislada de la costa nororiental venezolana. Se realizaron cultivos semicontinuos con tasas de renovación diaria de 30%, por triplicado, en matraces de 250 mL, salinidad de 37 UPS, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, aireación de 200 ml/min y fotoperiodo 12:12 h luz:oscuridad. Las densidades celulares ($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$), el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos totales (expresados en % de biomasa seca), así como los ácidos grasos (expresados en % con respecto a lípidos totales) de la microalga, presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos. Durante la fase de estabilización, las máximas densidades celulares (entre 11,73 y $12,66 \times 10^6$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) y los mayores porcentajes proteicos ($45,2 \pm 2,97\%$) se obtuvieron a 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en medio de cultivo Algal, mientras que las máximas proporciones de lípidos ($14,39 \pm 1,02\%$) y carbohidratos ($18,34 \pm 2,08\%$) se obtuvieron a esta misma irradiancia en medio con Humus. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) estuvieron mayoritariamente representados por el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3) observándose un incremento en su síntesis con el aumento de la irradiancia, fundamentalmente en medio de cultivo Algal. Estos resultados muestran las múltiples respuestas fisiológicas de *S. costatum* ante los cambios en las condiciones de cultivo, los cuales pueden ser aprovechados a fin de mejorar la composición bioquímica y su valor nutricional como alimento de organismos marinos cultivados, utilizando medios alternativos, disminuyendo costos en la producción microalgal.

PALABRAS CLAVE: *Skeletonema costatum*, acuicultura tropical, composición bioquímica, microalga autóctona

ABSTRACT

In order to increase autochthonous microalgae production that could be used as live food and to reduce costs in aquaculture, the influence of two culture media (Humus and Algal) and three irradiances (60, 120 and 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) were studied on the growth and biochemical composition of the marine diatom, *Skeletonema costatum*, isolated from the northeastern Venezuelan coast. Semicontinuous culture with 30% renewal daily rates was performed by triplicate, in flasks of 250 mL, salinity 37 PSU, temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), aeration 200 ml/min and 12:12 h light:dark photoperiod. Cell density ($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$), protein, lipids and total carbohydrates content (expressed as % dry weight), as well as fatty acids (expressed as % of total lipids) of the microalga evidenced significant differences between treatments ($p < 0.05$). During the steady state, the maximum cell density (between 11.73 and 12.66×10^6 $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) and the highest protein content ($45.2 \pm 2.97\%$) were obtained at 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in the Algal medium, whereas the highest lipid ($14.39 \pm 1.02\%$) and carbohydrates ($18.34 \pm 2.08\%$) contents were observed at the same irradiancia in the Humus medium. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were mostly represented by the Eicosapentaenoic acid 20:5 n-3 (EPA) whose synthesis increase with irradiancia, mainly in the Algal medium. The results demonstrate different physiological responses of *S. costatum* to changes in culture conditions, which can be taken in advantage in order to improve the biochemical composition and nutritional value as food source of cultivated marine organisms, using alternative culture media to diminish the cost of microalgal production.

KEY WORDS: *Skeletonema costatum*, tropical aquaculture, biochemical composition, autochthonous microalgae.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo variado de microorganismos fotosintéticos con características morfológicas y fisiológicas capaces de responder a variaciones ambientales particulares tales como pH, temperatura, intensidad lumínica y disponibilidad de nutrientes (Whotton 1992, Lebeau y Robert 2003). Éstas representan el tercer grupo de importancia en acuicultura, después de los peces y moluscos (Hanisak 1998), por ser la principal fuente de alimento vivo para las diferentes etapas de crecimiento de moluscos bivalvos de interés comercial (Pernet y Tremblay 2004, Ponis *et al.* 2006, Martínez-Fernández *et al.* 2006), así como en los primeros estadios larvales de crustáceos (Lora-Vilchis *et al.* 2004), gasterópodos (Patiño-Suárez *et al.* 2004) de algunas especies de peces y también en la nutrición de zooplancton (Li *et al.* 2006) que posteriormente son utilizados como alimento de otros organismos acuáticos cultivados (Spolaore *et al.* 2006).

Estos microorganismos proveen además de proteínas, diversidad de vitaminas y de compuestos lipídicos entre los que se mencionan los ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs (Tzovenis *et al.* 2003) y esteroides, que son transferidos a través de la cadena alimentaria y aprovechados por organismos superiores (Mansour *et al.* 2005).

Persoone y Claus (1980) y Müller-Feuga (2000), catalogaron algunas microalgas, entre las que se encuentra *Skeletonema costatum*, como alimento adecuado para el cultivo de bivalvos y crustáceos, debido a su alto contenido proteico y de ácido eicosapentaenoico (EPA). Esta especie, al igual que el resto de las microalgas, puede variar significativamente su composición bioquímica a consecuencia de las fluctuaciones de algunos parámetros físicos que condicionan sus cultivos (Brown *et al.* 1997, Tonon *et al.* 2002). La irradiancia representa uno de los factores que modifica el metabolismo microalgal, induciendo cambios en las proporciones de macromoléculas que constituyen las células (Brown *et al.* 1993, Tremblin *et al.* 2000).

Durante la última década, el creciente desarrollo de la acuicultura en el trópico, ha despertado gran interés por el cultivo de especies tropicales de microalgas (Renaud *et al.* 1999), por considerarse taxas capaces de tolerar las altas temperaturas en estas latitudes y porque posiblemente bajo esas condiciones, puedan presentar óptimas tasas de crecimiento y aceptable calidad nutricional, disminuyendo notablemente los costos de producción.

Sin embargo, a pesar de la mejora en la disponibilidad de cepas tropicales, se tiene poca información sobre su constitución bioquímica y su uso como fuente de alimento para organismos cultivados (Martínez-Fernández *et al.* 2006).

En Venezuela, la mayoría de las investigaciones relacionadas con microalgas han analizado la composición bioquímica de estos microorganismos con fines biotecnológicos, entre los que se pueden mencionar los de Guevara *et al.* (2005) y Rosales *et al.* (2005). Sin embargo, son pocos los trabajos publicados donde se haya estudiado la composición bioquímica y el valor nutricional de cepas autóctonas, con miras a ser utilizadas como alimentos en acuicultura tropical (Lemus *et al.* 2006, Vásquez-Suárez *et al.* 2007).

Bajo esta argumentación, se planteó el objetivo de caracterizar una cepa de *S. costatum*, aislada del nororiente venezolano, mediante cultivos en sistema semicontinuo con el fin de aumentar el número de estirpes autóctonas con potencial para la maricultura. Adicionalmente se evaluó su comportamiento, en función de tres irradiancias y dos medios de cultivo para la producción de biomasa microalgal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo seleccionado y condiciones de cultivo

Se realizaron cultivos unialgales de una cepa de *S. costatum* aislada de la costa oeste en la Península de Araya, estado Sucre (10° 37' N y 64° 07' W), Venezuela. Esta microalga forma parte de la colección de cultivos permanentes del Laboratorio de Acuicultura, extensión Plancton, Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente. Los cultivos se llevaron a cabo de forma semicontinua en ambiente controlado, con tasa de renovación diaria equivalente al 30% del cultivo. La temperatura promedio fue 25±1 °C. Se utilizaron matraces de 250 mL (equipados con mangueras plásticas y capilares para la aireación constante de 200 mL min⁻¹). El agua de mar (37 PSU) fue filtrada con papel Whatman GF/C de 1,2 µm en tamaño de poro y autoclavada a 120°C/15psi de presión por 15 min. Parte del diseño experimental consistió en probar dos medios de cultivo, uno denominado Medio Algal (Fábregas *et al.* 1984) y el otro, un fertilizante comercial de bajo costo (Humus), ambos a una concentración de 4 mmol.L⁻¹ de nitrato. Simultáneamente se aplicaron tres irradiancias (60, 120 y 180 µE.m⁻².s⁻¹) a cada medio.

Las concentraciones ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de los nutrientes presentes en cada medio fueron: para Algal: 136 de ZnCl_2 ; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 197,9; $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 242; CoCl_2 16,5; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 24,9; EDTA-Na 2387; $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 6,7; NaNO_3 24285,7; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2228,57; Tiamina 35; Biotina 5 y Cianocobalamina 3. En el caso de Humus, éste estuvo constituido por: Ácidos húmicos 330; Nitrógeno amoniacal 21; Nitrógeno en Nitrato 4; Nitrógeno Orgánico 20; Fósforo 34; Potasio 45; Carbonato orgánico 350; Calcio 40; Cobalto 15; Cobre 190; Zinc 125; Manganeso 650; Magnesio 50; Hierro 100 y Boro 40.

Los cultivos se iniciaron con inóculos de $2,0 \times 10^5$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ procedentes de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Luego del crecimiento durante dos semanas, para aclimatación a las diferentes condiciones, se realizaron los recambios, a partir de los cuales se determinó diariamente el crecimiento celular durante 16 días.

Crecimiento poblacional

Desde el inicio de los recambios, y cada 24 horas, se tomaron alícuotas de los cultivos para determinar la densidad celular con ayuda de un hematocitómetro (Neubauer). Estos datos se utilizaron para determinar las tasas instantáneas de crecimiento, siguiendo las recomendaciones de Madigan *et al.* (1999).

Determinación de la composición bioquímica

Cuando los cultivos alcanzaron la fase de estabilización, se tomaron muestras de 5 mL por triplicado, para analizar el contenido de proteínas (Lowry *et al.* 1951), lípidos (Marsh y Weinstein 1966, Bligh y Dyer 1959) y carbohidratos (Dubois *et al.* 1956) totales utilizando como estándares albúmina bovina, tripalmitina y D-glucosa respectivamente. Los ácidos grasos fueron derivatizados (Sato y Murata 1988) y analizados en un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS) Hewlett Packard Series G1800B, utilizando una columna Omegawax TM 250 de sílica fundida (Supelco) de 30 m x 0,25 mm de diámetro externo x 0,25 de diámetro interno. Los ácidos grasos presentes en las muestras se identificaron comparando sus espectros de masa con los contenidos en la biblioteca de espectros de masa NIST98, NBS75K y una biblioteca creada con 28 estándares de ácidos grasos metil esterificados (Sigma Chemical Company). Adicionalmente, se confirmó la identificación de los ácidos grasos comparando los tiempos de retención de las muestras con los registrados para una mezcla comercial de metil-ésteres de ácidos grasos poliinsaturados (Sigma®).

Análisis estadísticos

Se realizó el análisis de varianza de dos vías, considerando como factores, los niveles de irradiancia y los medios de cultivo. Previamente se comprobó la homogeneidad de las varianzas y distribución normal de los datos siguiendo recomendaciones de Sokal y Rohlf (1995). Para ajustar los datos de densidad celular a una curva normal, se realizaron transformaciones de Log10.

RESULTADOS

Crecimiento poblacional

S. costatum mostró su fase de estabilización en ambos medios de cultivo al décimo día de recambio a menores irradiancias (60 y 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y al décimo primer día con 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 1). La mayor densidad celular (entre 11,73 y 12,66 $\times 10^6$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$), se obtuvo con Algal a 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mientras que en Humus, con 60 y 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se observaron densidades celulares entre 2,38 y 3,14 $\times 10^6$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 3,31 y 3,34 $\times 10^6$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Las densidades celulares de esta diatomea, mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las irradiancias ($F = 191,76$) y entre los medios de cultivo empleados ($F = 95,41$). Adicionalmente, se observó que los factores analizados, interactuaron significativamente ($F = 54,86$) sobre la densidad celular microalgal (Figura 1). Sin embargo, las tasas instantáneas de crecimiento en los distintos tratamientos, variaron entre 0,56 y 0,61 $\text{div}\cdot\text{día}^{-1}$ sin hallarse diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$).

Composición bioquímica

Proteínas

La diatomea presentó valores máximos de proteínas (45,2 \pm 2,96%) en Algal a 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y el mínimo (34,52 \pm 0,93%) a menor irradiancia con Humus (Figura 2). Las pruebas estadísticas reflejan diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las proporciones totales de proteínas cuando la diatomea fue cultivada bajo irradiancias diferentes ($F=16,43$) en los dos medios de cultivo ($F=64,76$). Sin embargo, la prueba a *posteriori* de Scheffé, demostró que bajo irradiancias de 60 ó 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, esta cepa produce cantidades similares de proteínas ($p > 0,05$).

Lípidos

La concentración lipídica de esta diatomea (Figura 3) solo evidenció diferencias significativas ($p < 0,01$ $F=33,76$) cuando fue cultivada a diferentes intensidades

de luz, alcanzando sus máximas concentraciones con 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (11,89 \pm 1,99% y 14,39 \pm 1,02% en Algal y Humus, respectivamente).

Carbohidratos

La concentración de carbohidratos de *S. costatum*

(Figura 4) presentó diferencias significativas ($p < 0,05$ $F = 87,75$) en los cultivos sometidos a las distintas intensidades de luz. Irradiancias de 120 ó 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ejercen efectos similares en la acumulación de este metabolito, con valores máximos entre 15,67 \pm 2,16 y 18,34 \pm 2,08, respectivamente.

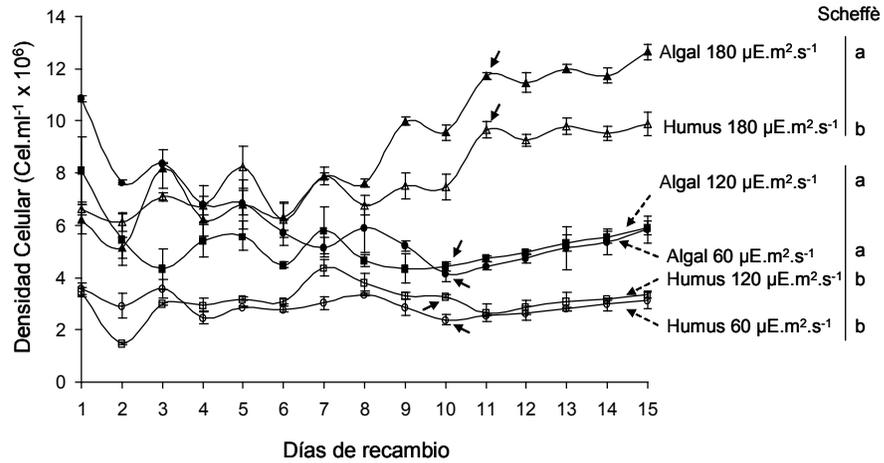


Figura 1. Crecimiento (promedio \pm DS) de *Skeletonema costatum* cultivada en medio Algal y Humus a tres irradiancias (60, 120 y 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bajo sistema semicontinuo. Las puntas de flechas sólidas indican el inicio de la fase de estabilización. Letras iguales (medio de cultivo) y línea continua (irradiancia) representan grupos estadísticamente iguales ($p > 0,05$).

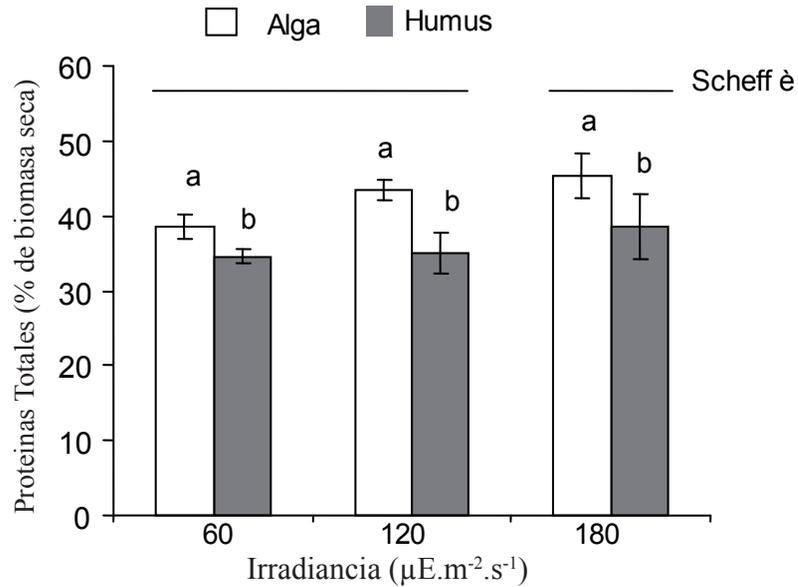


Figura 2. Contenido de proteínas totales (% con base a biomasa seca) de *Skeletonema costatum* cultivada en medio Algal y Humus a tres irradiancias (60, 120 y 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bajo sistema semicontinuo. Letras iguales (medio de cultivo) y línea continua (irradiancia), representan grupos estadísticamente iguales ($p > 0,05$).

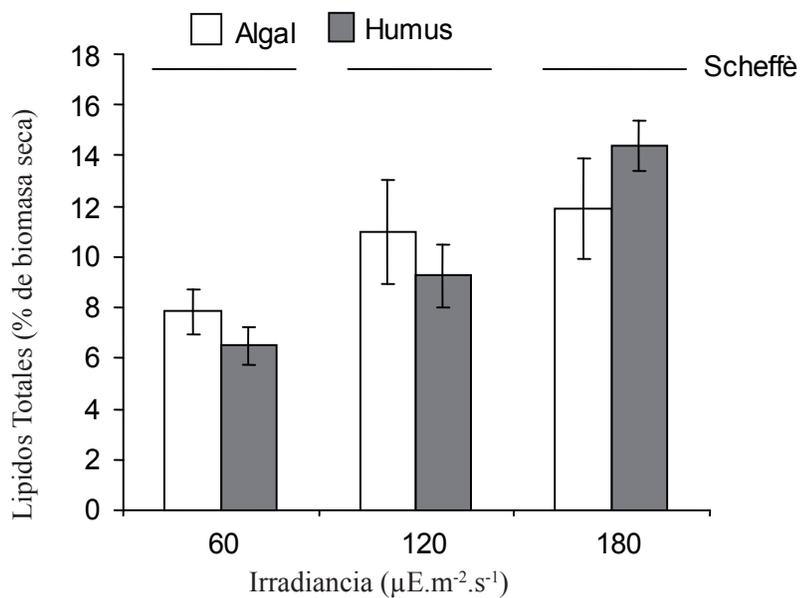


Figura 3. Contenido de lípidos totales (% con base a biomasa seca) de *Skeletonema costatum* cultivada en medio Algal y Humus a tres irradiancias (60, 120 y 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bajo sistema semicontinuo. Letras iguales (medio de cultivo) y línea continua (irradiancia), representan grupos estadísticamente iguales ($p > 0,05$).

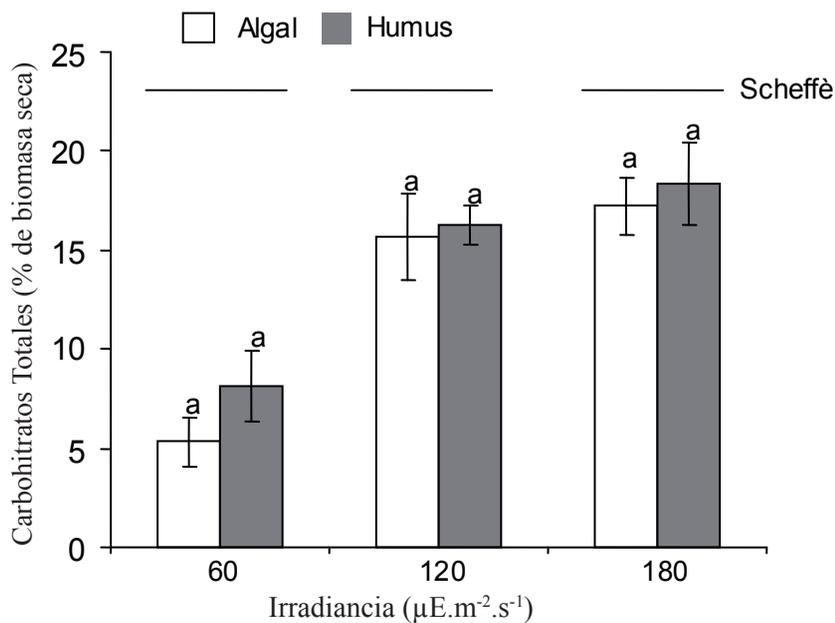


Figura 4. Contenido de carbohidratos totales (% con base a biomasa seca) de *Skeletonema costatum* cultivada en medio Algal y Humus a tres irradiancias (60, 120 y 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bajo sistema semicontinuo. Letras iguales (medio de cultivo) y línea continua (irradiancia), representan grupos estadísticamente iguales ($p > 0,05$).

Ácidos grasos

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las concentraciones de los distintos ácidos grasos producidos por *S. costatum* bajo las condiciones de cultivo probadas (Tabla 1). En el caso de los ácidos grasos saturados (SFAs), las cadenas carbonadas pares de menor tamaño fueron las más abundantes con porcentajes entre $15,60 \pm 0,98$ y $33,35 \pm 2,20\%$ para el ácido palmítico 16:0, seguida del mirístico 14:0 con valores entre $6,81 \pm 0,62$ y $18,36 \pm 1,81\%$. Los ácidos grasos con cadenas iguales o mayores a 20 carbonos estuvieron presentes en bajas proporciones al igual que los impares C15:0 y C17:0. En el caso de los ácidos grasos monoinsaturados (MSFAs), el más abundante fue el palmitoleico C16:1 n-7, el que presentó las mayores concentraciones cuando la diatomea se cultivó a baja irradiancia en medio Algal

($24,21 \pm 1,06\%$) y a irradiancia intermedia con Humus ($30,25 \pm 2,65\%$). De este grupo, el menos abundante fue el C16:1 n-5 con valores entre $0,09 \pm 0,00$ y $0,58 \pm 0,01\%$. Los PUFAs estuvieron mayoritariamente representados, en todos los tratamientos, por el ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3 (EPA), evidenciándose un incremento en las concentraciones de éste a medida que se incrementó la irradiancia en cultivos con medio Algal, mientras que en Humus, las concentraciones de EPA, fueron inversamente proporcionales al aumento de la intensidad lumínica de los cultivos. Los porcentajes más altos de esta variable ($4,9 \pm 0,31\%$) se apreciaron cuando *S. costatum* se cultivó en medio Algal a mayor irradiancia. Al analizar la suma de los PUFAs, se puede observar una tendencia a su disminución con el incremento de la irradiancia y por lo tanto, una correlación negativa entre ellos ($R = 0,74$).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de *Skeletonema costatum* (% del total de ácidos grasos) en medio Algal y Humus a tres irradiancias bajo sistema semicontinuo. Letras iguales en la misma fila indican grupos estadísticamente iguales ($p > 0,05$).

Ácido Graso	Medio Algal			Medio Humus		
	Irradiancia ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)			Irradiancia ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)		
	60	120	180	60	120	180
14:0	18,36±1,81	6,81±0,62	11,18±1,54	11,73±0,93	13,65±1,72	9,79±0,54
15:0	1,02±0,08	0,80±0,06	0,74±0,04	2,09±0,15	1,23±0,09	0,88±0,05
16:0	15,60±0,98	27,61±1,20	28,34±1,08	30,28±2,54	31,86±2,06	33,35±2,20
17:0	0,29±0,02	0,84±0,05	0,73±0,03	0,56±0,01	0,13±0,00	0,70±0,02
18:0	3,36±0,25	30,16±2,28	15,22±0,96	10,53±0,09	2,70±0,02	13,32±1,03
20:0	0,20±0,01	0,71±0,06	1,70±0,09	0,37±0,02	0,19±0,01	1,88±0,17
22:0	0,70±0,05	0,45±0,02	0,65±0,01	0,56±0,02	0,70±0,06	0,57±0,01
24:0	0,60±0,02	0,66±0,01	0,68±0,02	0,85±0,08	1,04±0,08	1,11±0,99
Σ Saturados	40,12±3,22	68,03±4,30	59,24±3,77	56,97±3,84	51,50±4,04	61,60±5,01
16:1 n-9	1,36±0,03	0,18±0,01	0,15±0,02	0,18±0,01	0,12±0,01	0,14±0,01
16:1 n-7	24,21±1,06	15,74±1,27	19,52±0,96	22,38±1,48	30,25±2,65	19,48±0,93
16:1 n-5	0,58±0,01	0,09±0,00	0,30±0,01	0,20±0,00	0,18±0,01	0,24±0,01
16:1	2,39±0,02	0,25±0,01	0,22±0,00	0,64±0,00	0,35±0,01	0,31±0,01
18:1 n-9	7,63±0,04	3,89±0,05	7,37±0,12	5,50±0,09	3,95±0,07	10,92±0,08
18:1 n-7	7,47±0,05	2,06±0,01	2,23±0,01	3,58±0,01	2,75±0,01	2,32±0,01
Σ Monoinsaturados	43,64±1,21	22,20±1,35	29,79±1,12	32,48±1,59	37,60±2,76	33,41±1,05
16:2 n-6	1,46±0,09	0,59±0,02	0,44±0,01	0,58±0,02	0,57±0,03	0,24±0,02
16:2 n-4	4,06±0,26	1,26±0,05	1,31±0,09	1,65±0,12	1,97±0,18	0,72±0,04
16:3	5,00±0,13	1,86±0,06	2,09±0,02	2,64±0,01	1,85±0,01	0,38±0,02
18:2 n-6	1,52±0,03	1,96±0,02	1,26±0,03	0,88±0,01	1,22±0,02	0,96±0,01
20:4 n-6	0,94±0,02	0,66±0,01	0,86±0,01	1,01±0,02	1,72±0,02	0,63±0,01
20:5 n-3	3,27b±0,21	3,43b±0,29	4,90a±0,31	3,80b±0,19	3,57b±0,24	1,37c±0,12
Σ Poliinsaturados	16,25a±0,74	9,77b±0,45	10,86b±0,47	10,55b±0,37	10,91b±0,50	4,30c±0,22

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que *S. costatum* puede mantener una producción diaria de biomasa, con una composición bioquímica estable, durante la fase de equilibrio del régimen semicontinuo, principalmente a $180 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en medio Algal. Esta estabilidad en las macromoléculas, y de densidad celular, puede atribuirse a la renovación de nutrientes, lo cual promueve en los cultivos una fisiología similar a la registrada durante la fase exponencial de cultivos discontinuos (Fábregas *et al.* 1995).

La densidad celular alcanzada por *S. costatum* durante la fase de estabilización, en ambos medios de cultivo a mayor irradiancia, superan los publicados por Mansour *et al.* (2005); mientras que las tasas específicas de crecimiento son similares a las reportadas por los mencionados investigadores. Estas variables, representan parámetros fundamentales para determinar la productividad de los cultivos y esta última, se ve influida por las condiciones ambientales, dentro de las que se incluyen la irradiancia y las variaciones en las concentraciones de los diferentes compuestos químicos que componen al medio de cultivo y que sirven como nutrientes.

En cuanto a la composición bioquímica, los porcentajes de proteínas encontrados en *S. costatum*, bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, son similares a los reportados por Lourenço *et al.* (2002) quienes hallaron entre 39,9% y 43,8% utilizando amonio y nitrato, respectivamente, como fuente nitrogenada. En ambos estudios, los mayores porcentajes de proteínas para estas diatomeas se obtuvieron al utilizar nitrato. Por otro lado, Martínez-Fernández y Southgate (2007) reportaron 49,3% de proteínas en *Skeletonema* sp. al ser cultivada en medio f/2.

En el caso del contenido lipídico y de carbohidratos, *S. costatum* mostró una fuerte correspondencia con el incremento de la irradiancia, principalmente con el medio Humus, en el cual se obtuvieron los mayores porcentajes de estas variables (Figuras 3 y 4). A pesar de esto, todos los valores obtenidos son relativamente bajos, debido posiblemente, a las concentraciones de nitrógeno presente en ambos medios ($4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) en comparación con las utilizadas por Lourenço *et al.* (2002). Elevadas concentraciones de nitrógeno biodisponible en los medios de cultivo, orientan al metabolismo de microalgas hacia la producción de proteínas, limitando la síntesis de otras macromoléculas que puedan aportar

energía como lípidos y carbohidratos. Los contenidos lipídicos presentados por *S. costatum* bajo las diferentes condiciones de cultivo, son inferiores a los reportados por Brown y Jeffrey (1995,) quienes encontraron entre 18 y 20% en *S. costatum* y *Skeletonema* sp. Sin embargo, Lourenço *et al.* (2002) reportan valores similares a los observados en esta investigación, con la diferencia que éstos obtuvieron mejores resultados (13,1%) cuando cultivaron la diatomea con nitrato como fuente nitrogenada, mientras que en el presente estudio, *S. costatum* mostró mejores resultados ($14,39 \pm 1,02\%$) cuando se cultivó en un medio que dispone de diferentes fuentes nitrogenadas, incluyendo la forma amoniaca. Está demostrado que independientemente del pH del medio, las células cultivadas con amonio muestran altas tasas fotosintéticas desde el inicio de la fase lumínica, mientras que en microalgas cultivadas con nitrato, la tasa de asimilación de carbono aumenta lentamente luego del inicio de la fase de luz. Estos comportamientos se han relacionado con la competencia entre la asimilación del carbono y nitrato por el poder reductor generado fotosintéticamente, mientras la asimilación del amonio no requiere gasto de poder reductor. Así, el amonio estimula la fijación de carbono, mientras la asimilación de nitrato produce una disminución en la fijación de CO_2 (Lara 1992), lo cual puede incidir negativamente sobre la síntesis lipídica y de carbohidratos.

Las concentraciones totales de carbohidratos presentes en células de *S. costatum* superan a las reportadas por Brown y Jeffrey (1995) y las de Martínez-Fernández y Southgate (2007) en una cepa de *Skeletonema* sp., mientras que Lourenço *et al.* (2002), presentaron porcentajes cercanos a 22,6 y 24,4 % en *S. costatum*, cultivada con nitrato y amonio, respectivamente.

Los perfiles de ácidos grasos presentados por *S. costatum* bajo las diferentes condiciones de cultivo (Tabla 1), son similares a los publicados por Li *et al.* (2006) para esta especie, mientras que los de ácidos grasos saturados totales, superan a los informados por Renaud *et al.* (1999) y Mansour *et al.* (2005). Ésta al igual que otras Bacillariofitas presenta cadenas carbonadas cortas (14:0 y 16:0) como componentes mayoritarios de SFAs. En el caso de los MSFAs, *S. costatum* mostró valores similares a los obtenidos por Renaud *et al.* (1999) y Mansour *et al.* (2005) quienes encontraron predominante al C16:1 n-7. Por otra parte, el grupo de los PUFA's disminuyó como consecuencia del incremento en la irradiancia de los dos medios de cultivo. Un comportamiento similar fue observado en *Parietochloris incisa* por Solovchenko *et al.* (2008), cuando se limitó el aporte de nitrógeno.

Esa disminución puede encontrar explicación en la tasa de asimilación de elementos necesarios para la síntesis de PUFAs, por ejemplo el fósforo. El incremento de la irradiancia puede limitar el contenido de fósforo de la biomasa microalgal con relación al carbono fijado por la fotosíntesis (Berger *et al.* 2006). La limitación del primer elemento puede repercutir sobre la síntesis del mencionado grupo lipídico e incrementar la síntesis de glicolípidos, los cuales reemplazan principalmente a los fosfolípidos bajo condiciones limitantes de fósforo, almacenando así fosfatos para otros procesos celulares (Dörmann 2006). No obstante, los valores de ácidos poliinsaturados sintetizados por la diatomea tanto en medio Algal como en Humus, son superiores a los presentados por Lourenço *et al.* (2002) para la misma especie.

Las diferencias en las concentraciones de PUFAs sintetizadas por *S. costatum*, entre ésta y otras investigaciones, pueden fundamentarse en las diferencias en condiciones de cultivo y también en la edad de las células. Zhukova (2004) menciona que la composición de ácidos grasos poliinsaturados incrementa a medida que los cultivos envejecen, pero en el sistema de cultivo empleado en esta investigación, las células utilizadas para los análisis, fueron células jóvenes, mantenidas así gracias al constante recambio de medio que permitió la disponibilidad continua de nutrientes para las microalgas y al mismo tiempo las condiciones idóneas para favorecer el proceso de división celular de forma ininterrumpida.

Otro factor que pudo marcar diferencia en los resultados entre de las distintas variables analizadas, pudiera ser la deficiencia de algún otro micro o macronutriente diferente al nitrógeno, o también, las proporciones de cada uno de los nutrientes presentes en los medios de cultivo. El índice nitrógeno:fósforo en Algal y Humus fue (11:1) y (1:1), respectivamente. Prieto *et al.* (2005) y Minh Khoi *et al.* (2006) señalan el efecto directo de las proporciones de nutrientes, principalmente nitrógeno:fósforo, sobre la tasa de crecimiento y la composición bioquímica microalgal. Por su parte, Cuvin-Aralar *et al.* (2004) encontraron que la tasa de crecimiento en diatomeas se incrementaba por disminución del mencionado índice, contrariando a lo observado en esta investigación, en la que sólo, la mayor irradiancia permitió evidenciar densidades celulares estadísticamente similares entre medios de cultivo (Figura 1).

El uso del régimen semicontinuo se convierte así en una herramienta útil para la producción de *S. costatum* con una calidad nutricional adecuada y estable, cuando es cultivada en medio Algal a $180 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiancia.

Es posible que esta diatomea pueda incrementar la producción de biomasa con intensidades de luz más elevadas.

El perfil bioquímico observado en *S. costatum* cuando se cultivó de forma semicontinua en medio Algal a $180 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, permite sugerir su utilización como alimento en larvas de bivalvos marinos, debido a que podría representar una alternativa para asegurar mayor sobrevivencia larvaria, tal como lo señalan Izquierdo (1996) y Koven *et al.* (2001), quienes indicaron que una dieta para larvas de peces que contenga los ácidos grasos C20:4n-6 y C20:5n-3 promueve el desarrollo del sistema inmune, disminuyendo las patologías relacionadas con el estrés ocasionado por las actividades de cultivo.

Es posible que, la composición bioquímica e incremento en la producción de biomasa microalgal obtenida cuando *S. costatum* se cultivó en medio Humus pudiera mejorarse realizando modificaciones a dicho medio.

CONCLUSIONES

La densidad celular de *S. costatum* se vio influenciada por el medio de cultivo y la irradiancia, evidenciándose una proporcionalidad directa entre esta última y la densidad celular, por lo que la mayor biomasa microalgal se puede obtener con irradiancias como las máximas empleadas en este estudio.

El medio Algal resultó el más adecuado para obtener células de *S. costatum* con altos contenidos proteicos, mientras que Humus fue el más idóneo para producir mayores porcentajes de lípidos y carbohidratos en la mencionada microalga.

S. costatum produjo las mayores concentraciones de AEP en medio Algal, incrementado su producción con el aumento de la irradiancia; mientras que en medio Humus, la síntesis de AEP disminuyó por efectos de este parámetro físico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento parcial, a través del proyecto CI.-2-030603-1282/06.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGER S.A., DIEHL S., KUNZ T.J., ALBRECHT D., OUCIBLE

- A.M., RITZER S. 2006. Light supply, plankton biomass, and seston stoichiometry in a gradient of lake mixing depths. *Limnol. Oceanogr.* 51: 1898-1905.
- BLIGH E., DYER W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- BROWN M., DUNSTAN G., JEFFREY S., VOLKMAN J., BARRETT S., LEROY J. 1993. The influence the irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (Clone T-ISO). *J. Phycol.* 29: 601-612.
- BROWN M., JEFFREY S., VOLKMAN J., DUNSTAN G. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture.* 151: 315-331.
- BROWN M., JEFFREY S. 1995. The amino acid and gross composition of marine diatoms potentially useful for mariculture. *J. Appl. Phycol.* 7 (6): 521-527.
- CUVIN-ARALAR M., FOCKEN U., BECKER K., ARALAR E. 2004. Effects of low nitrogen phosphorus ratios in the phytoplankton community in Laguna de Bay, a shallow eutrophic lake in the Philippines. *Aquatic Ecol.* 38: 387-401.
- DÖRMANN P. 2006. Lipid Synthesis, Metabolism and Transport. In: Wise R.R., Kenneth Hooper J. (eds), *The Structure and Funtion of Plastids* Netherlands. 335-353 p.
- DUBOIS M., GILLES K., HALMILTON J., REBERS P., SMITH F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related sustances. *Anal. Chem.* 2: 350-356
- FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B., VEIGA M. 1984. Growth of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture.* 42: 207-215.
- FÁBREGAS J., PATIÑO M., ARREDONDO-VEGA B., TOBAR J., OTERO A. 1995. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 287-292
- GUEVARA M., LODEIROS C., GÓMEZ O., LEMUS N., NÚÑEZ P., ROMERO L., VÁSQUEZ A., ROSALES N. 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53 (3 y 4): 331-337
- HANISAK M. 1998. Seaweed cultivation: global trends. *World Aquacult.* 29: 18-21.
- IZQUIERDO M. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aqua. Nutr.* 2: 183-191.
- KOVEN W., BARR Y., LUTZKY S., BEN-ATIA I., WEISS R., HAREL M., BEHRENS P., TANDLER A. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4 n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture.* 193: 107-122.
- LARA C. 1992. In, "Trends in Photosynthesis Research". Barber J, Guerrero MG, Medrano H. (eds.). Intercept Andover. pp. 195-208.
- LEBEAU T., ROBERT J.M. 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 612-623
- LEMUS N., URBANO T., ARREDONDO-VEGA B., GUEVARA M., VÁSQUEZ A., CARREÓN-PALAU L., VALLEJO N. 2006. Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuo y semicontinuo. *Ciencias Mar.* 32 (3): 597-603.
- LI J., SUN S., LI C., ZHANG Z., TÀO Z. 2006. Effects of single and mixed diatom diets on the reproduction of copepod *Calanus sinicus*. *Acta Hydrochem. Hydrobiol.* 34: 117-125
- LORA-VILCHIS M.C., CORDERO-ESQUIVEL B., VOLTOLINA D. 2004. Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros muelleri* during its early life stages. *Aquacult. Res.* 35: 1086-1091.
- LOURENÇO S., BARBARINO E., MANZINI-FILHO J., SCHINKE K., AIDAR E. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in bacht culture: an evaluation for aquaculture. *Phycology.* 41 (2): 158-168.

- LOWRY O., ROSEBROUGH H., FARR A., RANDALL R. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MADIGAN M., MARTINKO J., PARKER J. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8va edición revisada. Prentice May, Madrid. pp. 1064.
- MANSOUR M., FRAMPTON D., NICHOLS P., VOLKMAN J. 2005. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C₂₄-C₂₈ polyunsaturated fatty acids. *J. Appl. Phycol.* 17: 287-300.
- MARSH J., WEINSTEIN D. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipids Res.* 7: 574-592.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ E., ACOSTA-SALMÓN H., SOUTHGATE P. 2006. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquacult.* 257: 491-503.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ E., SOUTHGATE P.C. 2007. Use of tropical microalgae as food for larvae of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquacult.* 263: 220-226.
- MINH KHOI C., THI-GUONG V., MERCKX R. 2006. Growth of the diatom *Chaetoceros calcitrans* in sediment extracts from *Artemia franciscana* ponds at different concentrations of nitrogen and phosphorus. *Aquacult.* 259: 354-364
- MÜLLER-FEUGA A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* 12: 527-534
- PATIÑO-SUÁREZ V., ALDANA-ARANDA D., GEORGE-ZAMORA A. 2004. Food ingestion and digestibility of five unicellular algae by 1-day-old *Strombus gigas* larvae. *Aquacult. Res.* 35: 1149-1152
- PERNET F., TREMBLAY R. 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of sea scallop *Placopecten magallanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310: 73-86
- PERSOONE G., CLAUS C. 1980. Mass culture of algae: a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. En: *Algae Biomass*. Ed. Shoeder G., Elsevier, Amsterdam, 265-285
- PONIS E., PARISI G., LE COZ J.R., ROBERT R., ZITTELLI G., TREDICI M. 2006. Effect of the culture system and culture technique on biochemical characteristics of *Pavlova lutheri* and its nutritional value for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquacult. Nutr.* 12: 322-329
- PRIETO M., MOGOLLON M., CASTRO A., SIERRA L. 2005. Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. *MVZ-Córdoba* 10 (1): 544-554.
- RENAUD S.M., THINH L., PARRY D.L. 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.
- ROSALES N., ORTEGA E., MORA R., MORALES E. 2005. Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Ciencias Mar.* 31 (2): 349-355.
- SATO N., MURATA N. 1988. Membrane Lipids. *Method. Enzimol.* 167: 251-259.
- SOKAL R., ROHLF F. 1995. *Biometry*. 3rd. Edition. W. H. Freeman And Co. New York 887 pp.
- SOLOVCHENKO A., MERZLYAK M., CHIVKUNOVA O., RESHETNIKOVA I., KHOZINA-GOLDBERG I., DIDI-COHEN S., COHEN Z. 2008. Effects of illumination and nitrogen starvation on accumulation of arachidonic acid by the microalga *Parietochloris incisa*. *Moscow University Biological Sciences Bull.* 63: 44-48.
- SPOLAORE P., JOANNIS-CASSAN C., DURÁN E., ISAMBERT A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosecience Bioengineering* 101 (2): 87-96.
- TONON T., HARVEY D., LARSON T., GRAHAM I. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61: 15-24.
- TREMBLIN G., CANNUEL R., MOUGET J.L., RECH M., ROBERT J.M. 2000. Change in light quality due to a blue-

green pigment, marennine, released in oyster-ponds: effect on growth and photosynthesis in two diatoms, *Haslea ostrearia* and *Skeletonema costatum*. *J. Appl. Phycol.* 12: 557-566.

TZOVENIS I., DE PAUW N., SORGELOOS P. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: I. Effects of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture*. 216: 203-222.

VÁSQUEZ-SUÁREZ A., GUEVARA M., SALAZAR G.,

ARREDONDO-VEJA B., CIPRIANI R., LEMUS N., LODEIROS C. 2007. Crecimiento y composición bioquímica de cuatro cepas de *Dunaliella* para ser utilizadas en acuicultura. *Bol. Centr. Invest. Biol.* 41 (2): 181-194.

WHOTTON B. 1992. *Photosynthetic procariotes*. In: Man N., Carr N. (eds.), Plenum Press, New York (USA), pp.1-51.

ZHUKOVA N.V. 2004. Changes in the lipid composition of *Thalassiosira pseudonana* during its life cycle. *Russ. J. Plant. Physiol.* 51(5): 702-707.