



UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

**Variabilidad bioquímica de microalgas
marinas en cultivo en función de la fuente
de nitrógeno**

J. PABLO FIDALGO PAREDES

LA CORUÑA, 1995



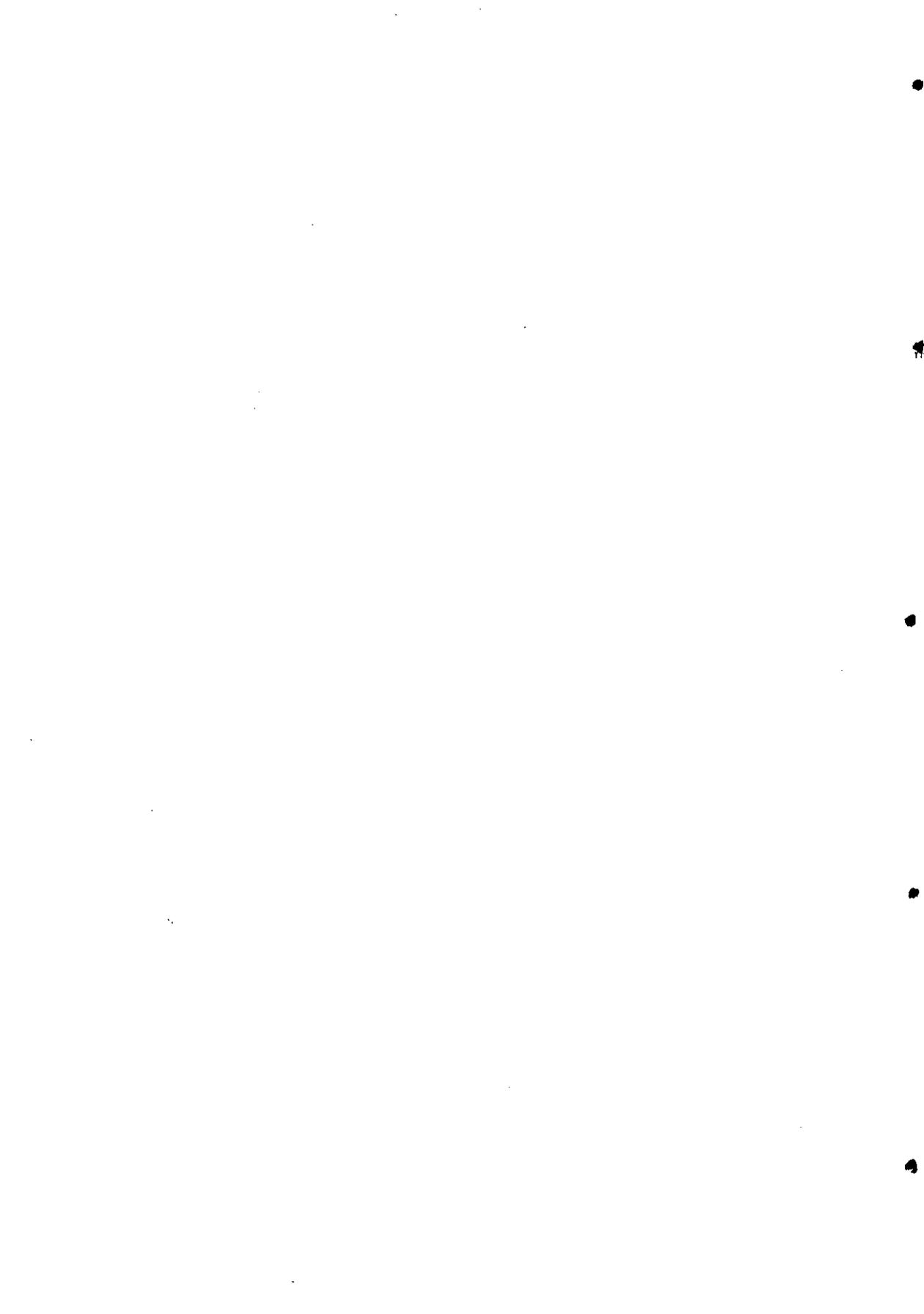
UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

**Variabilidad bioquímica de microalgas
marinas en cultivo en función de la fuente
de nitrógeno**

Memoria que para optar al
Grado de Doctor presenta
J. PABLO FIDALGO PAREDES

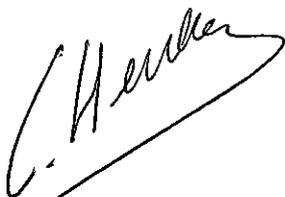
La Coruña, 1995



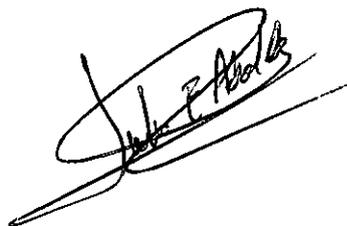
CONCEPCION HERRERO LOPEZ, Catedrática de Microbiología, y
JULIO ERNESTO ABALDE ALONSO, Profesor Titular de Microbiología,
del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de
Ciencias de la Universidad de La Coruña,

INFORMAN: que la presente Tesis Doctoral titulada "**Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno**", que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta **D. José Pablo Fidalgo Paredes**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Coruña y que, hallándose concluída, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

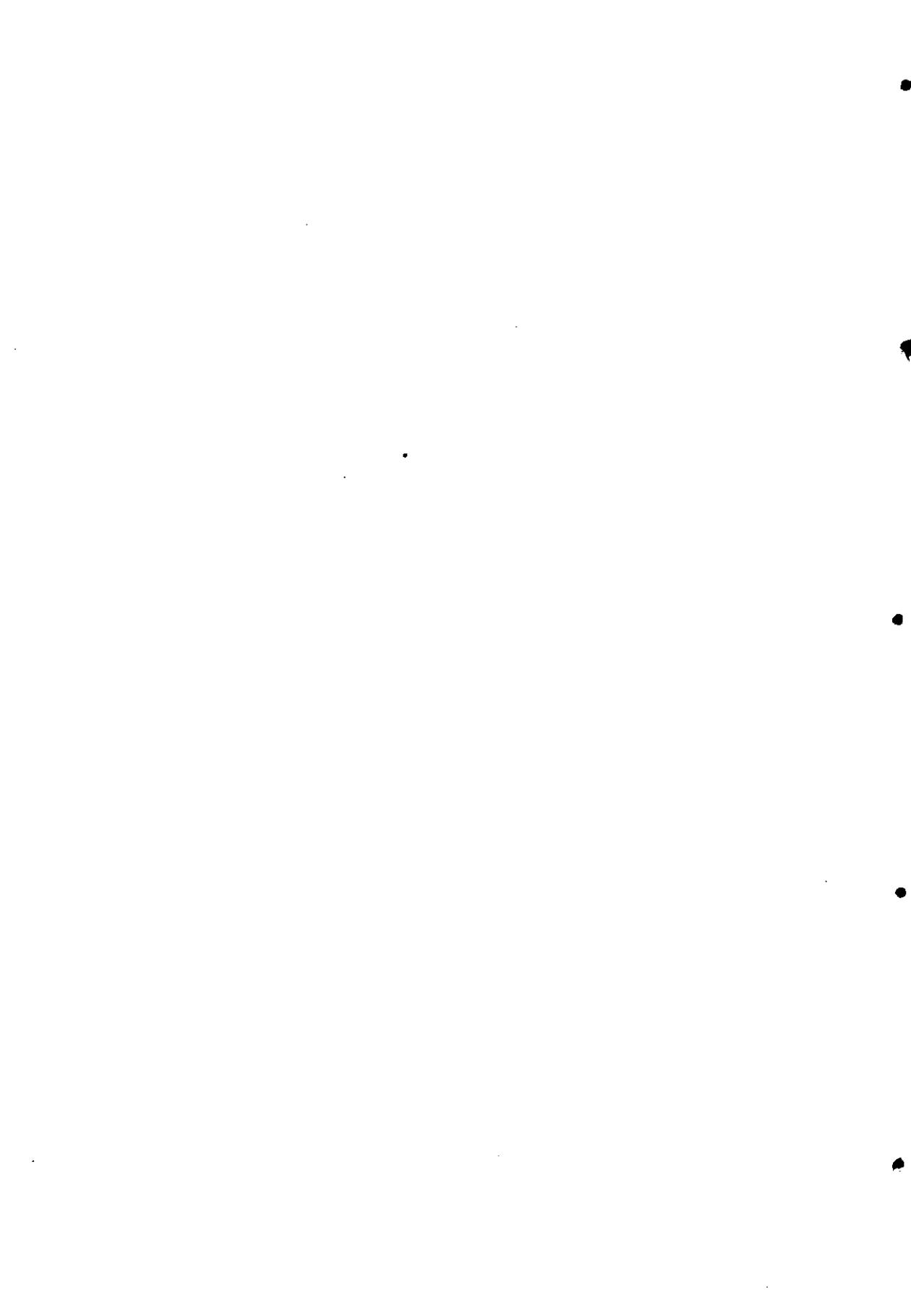
Y para que así conste, firmo el presente en La Coruña a
6 de febrero de 1995.



Fdo. Profa. Dra. Concepción
Herrero López

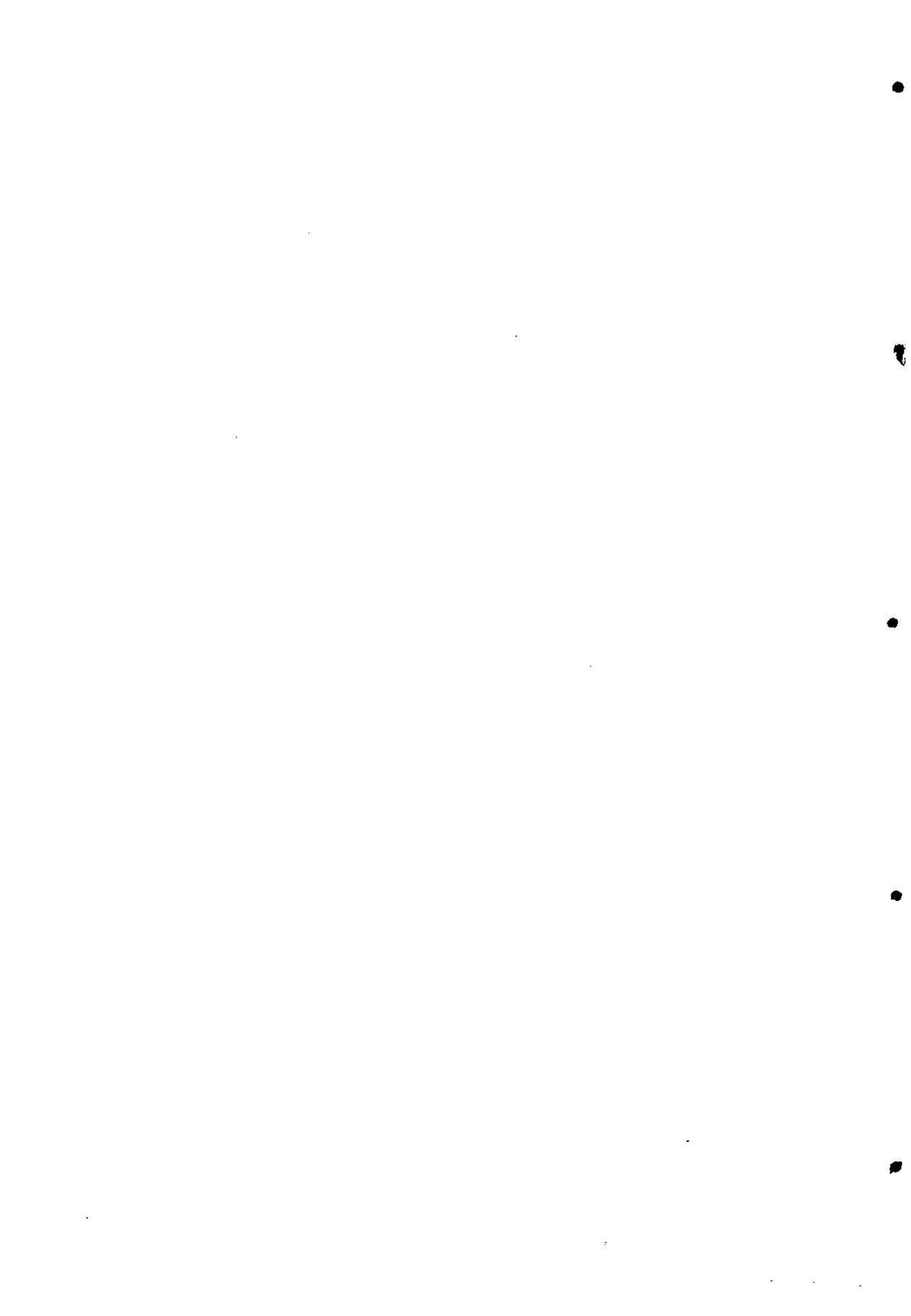


Fdo. Prof. Dr. Julio E.
Abalde Alonso



En memoria de Fidi

A mis padres



Agradecimientos

A los Drs. Concepción Herrero y Julio Abalde, gracias por la oportunidad de conocer este apasionante mundo, de viajar y conocer otras formas de vivir, pensar e investigar. Pero, sobre todo, por vuestro apoyo y paciencia en algunos momentos muy duros a lo largo de estos años. Aunque no os lo creáis, la necesidad de responder a ese callado ánimo fue muy importante en aquellos momentos.

A la Dra. Angeles Cid, mi "cytometry-girl" favorita, gracias por demostrar día a día que la amistad perdura por encima de los roces diarios. Y sobre todo, gracias por las horas dedicadas a diseñar y realizar los análisis por citometría de flujo.

A los Drs. Ian Laing y Susan Utting, del "Fisheries Laboratory", y a los Drs. Assaf Sukenik y Alex Livne, del IOLR, gracias por los muchos conocimientos adquiridos en mis breves estancias en vuestros Centros.

A María Ozores le agradezco muy especialmente su ayuda en la parte final de esta Tesis. A Quique y Susana, el estar siempre prestos a ayudar. A Gelucho, su ayuda en las tediosas horas invertidas en meter datos en el ordenador. A Ana Insua, gracias por la realización de las fotos.

A todos los compañeros que he tenido a lo largo de estos años, gracias por hacer la vida amena.

A mis padres, gracias por apoyar en todo momento mis decisiones, y desde luego por su ayuda económica, sin la cual nunca habría acabado esta Tesis. A mis hermanos Miguel y "Fidi", gracias por haber estado ahí para todo. A tí, Fidi, te dedico este trabajo, por haberme enseñado que la ilusión por la vida está por encima de todo.

No quiero acabar estos agradecimientos sin dar las gracias a mis amigos, que siempre han tenido un hueco para escuchar y animar.

A TODOS, gracias

Pablo

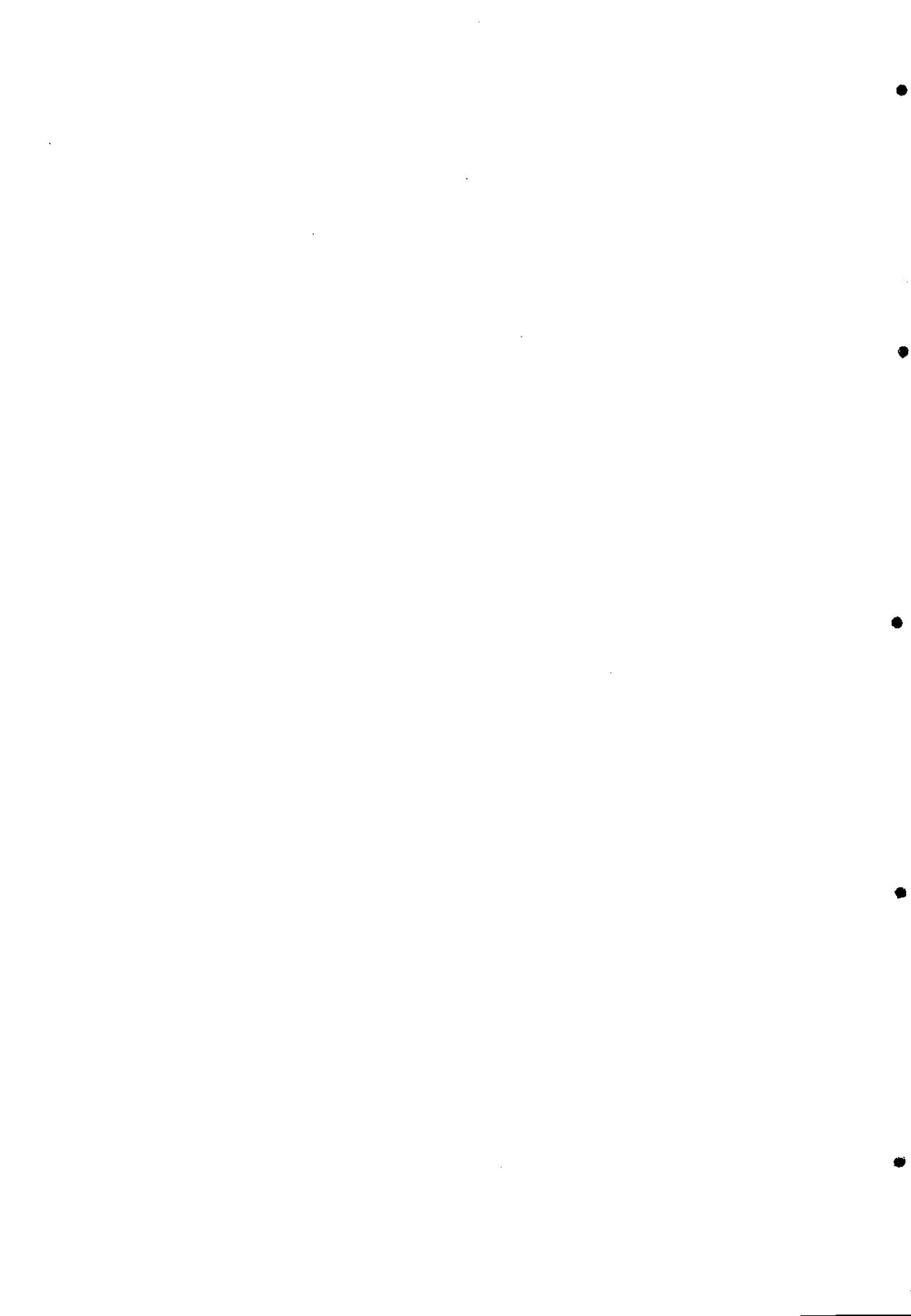
Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca Predoctoral de la Xunta de Galicia y subvencionada parcialmente a través del proyecto de investigación concedidos por el Plan Nacional de I+D de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (AGF92-0736).

INDICE

INTRODUCCIÓN	11
Cultivo masivo de microalgas	13
Luz	14
Temperatura	16
pH.....	17
Salinidad	18
Agitación	19
Nutrientes	19
Carbono	20
Nitrógeno	22
Fósforo	26
Silicio	27
Otros nutrientes	28
Usos y aplicaciones de las microalgas	28
Composición bioquímica de microalgas en cultivo. Las micro- algas como base nutritiva en acuicultura	30
Aspectos nutricionales del uso de microalgas en acuicultura	31
OBJETIVO	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Descripción de las especies microalgales	41
Cultivo	52
Determinaciones sobre las microalgas en cultivo	54
Densidad celular	54
Parámetros de crecimiento	54
pH.....	55
Materia seca y cenizas	55
Pigmentos	55
Proteínas.....	56
Carbohidratos	57
Lípidos.....	58
Acidos ribonucleicos	59
Análisis de la composición de ácidos grasos	60
Determinación de la tasa de fotosíntesis.....	62
Determinación de la autofluorescencia y pH intracelular	63

Análisis sobre la semilla de mejillón	64
Análisis estadístico	65
RESULTADOS	67
Cultivo masivo de microalgas marinas con diferentes fuentes de nitrógeno	69
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (Bacillariophyceae)	71
<i>Dunaliella tertiolecta</i> (Chlorophyceae)	85
<i>Isochrysis galbana</i> (Prymnesiophyceae)	93
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Bacillariophyceae)	107
<i>Tetraselmis suecica</i> (Prasinophyceae)	119
Ensayos sobre el efecto tóxico del amonio a elevadas concentraciones	131
Crecimiento y composición bioquímica de juveniles de mejillón gallego (<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lmk) alimentados con dietas de microalgas vivas	139
Diseño experimental	140
Crecimiento en longitud de la concha	141
Crecimiento en volumen	146
Crecimiento en peso	148
Índice de condición, eficiencia de crecimiento bruta y mortalidad	149
Composición bioquímica y conversión del alimento	151
Interrelaciones entre parámetros	152
DISCUSIÓN	155
Cultivo masivo de microalgas marinas con diferentes fuentes de nitrógeno	157
Cultivo de juveniles de <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lmk con dietas de microalgas vivas	186
CONCLUSIONES	193
BIBLIOGRAFÍA	197

Introducción



La comunidad del plancton (del griego *plangkτός*, errante) está constituida por el conjunto de organismos, en general de pequeño tamaño, que viven suspendidos en la columna de agua y a merced de los movimientos de ésta. Aunque muchos de estos organismos son capaces de movimientos locales, limitados, dentro de la masa de agua, son incapaces de llevar a cabo migraciones activas en contra de mareas y corrientes.

Integrantes de esta comunidad son microorganismos eucariotas autótrofos, que contienen clorofilas y son capaces de realizar la fotosíntesis: las microalgas, que comprenden decenas de miles de especies, y forman, junto con organismos procariotas, el fitoplancton. Representan la puerta de entrada de la energía solar en el ecosistema pelágico y llevan a cabo gran parte de la producción primaria oceánica. Constituyen los organismos productores, que sintetizan a partir de la energía solar y sustratos inorgánicos nueva materia orgánica y energía química, que en parte serán trasvasadas a los integrantes del segundo nivel trófico: moluscos, copépodos, peces fitófagos, etc.

Se estima que el fitoplancton aporta aproximadamente la mitad de la producción primaria de la biosfera, siendo su eficiencia fotosintética similar a la de las más productivas plantas superiores (Shelef y Soeder, 1980). Las microalgas se caracterizan por altas tasas de reproducción, brevedad del ciclo biológico, alta eficiencia fotosintética, adaptabilidad a distintas condiciones ambientales, etc.

No obstante, en un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término "microalga" se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila *a* y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules, con estructura celular procariota, se han considerado tradicionalmente dentro del grupo de las microalgas (Borowitzka y Borowitzka, 1988). Por tanto, el término microalga no tiene sentido taxonómico alguno y dentro del mismo se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos. Las microalgas eucariotas, a pesar de la enorme variedad en forma, organización y tamaño, se caracterizan por ser microorganismos unicelulares que poseen núcleo y todos los orgánulos propios de células eucariotas (Berner, 1993).

CULTIVO MASIVO DE MICROALGAS

Para obtener un cultivo de microalgas en crecimiento activo es necesario un inóculo viable de un tamaño mínimo, suministro de nutrientes, condiciones físico-

químicas adecuadas (pH, temperatura, salinidad, etc.), y luz como fuente de energía.

En el cultivo masivo, el rendimiento o cosecha alcanzado depende tanto de la concentración de células en el cultivo como del grado en que las células pueden desarrollar su potencial de crecimiento (Raven, 1988). La temperatura del cultivo, el suministro de recursos químicos, y el suministro de fotones para la fotosíntesis figuran entre las limitaciones del crecimiento del cultivo.

A la hora de realizar un cultivo masivo el **inóculo** inicial ha de ser viable y la **densidad celular inicial** o tamaño de inóculo óptima. Cultivos con densidades iniciales demasiado bajas pueden perderse por fotooxidación u otras causas, mientras que si la densidad inicial es demasiado alta se producen pérdidas provocadas por la respiración o una ineficiente utilización de la energía luminosa, debido al autoensombrecimiento (Becker y Venkataraman, 1982).

Luz

La luz representa la fuente de energía para la fotosíntesis. La radiación utilizable fotosintéticamente cae dentro del rango del espectro visible (400 - 700 nm). La fotosíntesis consiste esencialmente en la conversión endergónica - a expensas de la energía luminosa - de sustratos totalmente oxidados sin potencial químico útil (agua, CO₂, nitrato, sulfato, fosfato) en productos ricos en energía, es decir, carbohidratos, lípidos, proteínas, ác. nucleicos, así como O₂ (Losada *et al.*, 1987).

La intensidad luminosa, la longitud de onda y el fotoperíodo (que marca el mecanismo para muchos ritmos circadianos), afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (Darley, 1982; Richmond, 1986a,b).

La tasa de fotosíntesis aumenta con la intensidad luminosa siguiendo una cinética de Michaelis-Menten, alcanzándose el nivel de saturación a intensidades variables en función de la especie, después del cual la intensidad provoca la disminución de la tasa fotosintética y, por tanto, del crecimiento.

La adaptación a bajas intensidades implica un incremento de dos a diez veces el contenido de clorofila *a* por célula y una intensidad de saturación menor. Las células adaptadas a intensidades altas se caracterizan por un menor contenido de clorofila por célula (a veces correlacionada con una disminución del

tamaño del cloroplasto), mayor intensidad de saturación y con frecuencia mayor fotosíntesis máxima. Estas células son también menos sensibles a la fotoinhibición a altas intensidades de luz (Dubinsky *et al.*, 1986; Lips y Avissar, 1986). Un hecho importante en el cultivo masivo de microalgas es el tiempo requerido para adaptarse a una nueva intensidad de luz, de unas horas a varios días según la especie (Richmond, 1986a). Las especies con baja capacidad de adaptación a cambios en la intensidad luminosa son de escaso interés para el cultivo masivo.

La intensidad luminosa también influye sobre el esquema de síntesis macromolecular a partir del CO₂ fijado fotosintéticamente. Así, a intensidades altas, la fijación de CO₂ excede a la tasa de síntesis proteica (que es limitada por la asimilación de nitrógeno) y el exceso de carbono es almacenado en carbohidratos (Konopka y Schnur, 1980). A intensidades bajas disminuye la fijación total de CO₂ y el porcentaje del C fijado que es incorporado en carbohidratos, mientras aumenta el porcentaje que es incorporado en proteínas.

Cuando las células están creciendo en ciclos luz-oscuridad, la síntesis proteica y de otras macromoléculas continúa en la fase oscura a expensas del carbono y energía almacenados en los carbohidratos (Myklestad, 1988). La luz es el principal regulador del metabolismo de los carbohidratos en el cloroplasto. La absorción de energía luminosa con el comienzo de la iluminación genera diversas señales regulatorias que activan enzimas biosintéticos e inactivan enzimas degradativos sometidos a regulación metabólica (Macdonald y Buchanan, 1990). La asimilación del nitrógeno también está sometida a fotorregulación (Ninnemann, 1987).

La calidad (longitud de onda) de la luz puede afectar también a la composición bioquímica y metabolismo microalgales (Kowallik, 1987). Bajo la influencia de la luz azul, el nivel de proteína se mantiene más alto, y el de carbohidratos más bajo que en la oscuridad o bajo la luz roja. La luz azul estimula un aumento de la respiración acompañado por la síntesis *de novo* de enzimas y la producción de especies enzimáticas de mayor afinidad por el sustrato (Kowallik, 1987). La luz azul ejerce un efecto regulatorio a nivel postranscripcional de la biosíntesis de la anhidrasa carbónica en *Chlamydomonas reinhardtii* (Dionisio *et al.*, 1989), activa la nitrato-reductasa en la misma especie (Azua y Aparicio, 1983), y se ha sugerido que la luz azul es un factor regulador del consumo fotorespiratorio de nitrato y, posiblemente, de todo el metabolismo del N en las algas verdes.

Cuando los demás factores no son limitantes, la disponibilidad de luz es el principal factor que influye en la productividad de los cultivos microalgales masivos (Laing y Ayala, 1990). Las lámparas fluorescentes tubulares son la fuente de luz preferida para la iluminación de cultivos interiores. Éstas dan menos calor que otros tipos de luz artificial y son igualmente eficientes en promover tasas de división y crecimientos máximos. Los tipos usados comúnmente son "Daylight", "Cool-White" y "Gro-lux". Los sistemas de cultivo masivo deben ser diseñados para maximizar la eficiencia de utilización de la luz, habiéndose propuesto numerosos diseños (p. ej. Laing y Jones, 1983; Laing y Ayala, 1990).

Temperatura

El rango óptimo para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 y 25°C (Darley, 1982). En las microalgas existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica, aumentando la tasa de crecimiento con el aumento de temperatura, dentro de un rango óptimo, por encima del cual el crecimiento disminuye, a veces bruscamente, hasta llegar a cero si continúa el aumento de temperatura. Este fenómeno se ve acentuado a intensidades de luz altas (Richmond, 1986a). El descenso de crecimiento a temperaturas altas puede ser debido a la interrupción de la regulación metabólica o la muerte celular. La tolerancia varía según la especie; así, las formas delicadas como *Isochrysis galbana* no soportan temperaturas superiores a los 25°C, mientras las formas más resistentes como *Chlorella* crecen bien hasta los 36°C (Laing y Ayala, 1990). El nivel de temperatura afecta también a la solubilidad de los gases en el agua, que decrece con el aumento de la temperatura.

La biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura ambiental. La temperatura intracelular se iguala a la del medio de cultivo. Además de afectar a las reacciones celulares, la temperatura también afecta a la naturaleza del metabolismo y a la composición de la biomasa (Richmond, 1986a), si bien dentro de los rangos óptimos tiene poca influencia sobre la producción final de biomasa y la composición bioquímica de las microalgas (Goldman y Ryther, 1976; Witt *et al.*, 1981).

El efecto más marcado de la temperatura en el metabolismo celular es su influencia sobre la tasa de respiración, que aumenta exponencialmente con la temperatura (Collins y Boylen, 1982). Este hecho es de gran importancia en la producción de biomasa microalgal, ya que si la temperatura es alta, sobre todo en la fase de oscuridad, la pérdida de biomasa debida a una respiración intensiva es

considerable (Richmond, 1986a). Dentro del rango óptimo, el incremento de temperatura aumenta los problemas de desarrollo bacteriano.

La interacción entre la temperatura y la intensidad de luz es muy acusada (Collins y Boylen, 1982). La intensidad de luz saturante para la fotosíntesis aumenta con la temperatura, y la temperatura óptima para la fotosíntesis aumenta con la intensidad de luz. La tasa de fotosíntesis decrece fuertemente por encima de la temperatura óptima.

El mantenimiento de la temperatura de los cultivos dentro del rango adecuado puede ser un problema en los cultivos interiores intensivos debido a la producción de calor por las lámparas. Esto se resuelve normalmente mediante el control de la temperatura ambiental, utilizando unidades de aire acondicionado, pantallas aislantes transparentes entre los cultivos y las lámparas, o enfriamiento directo de los cultivos con agua.

pH

El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO_2 y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-}), e influye directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Becker, 1994). El pH tiene un marcado efecto sobre la solubilidad de varios compuestos metálicos, de modo que un aumento de pH puede llegar a ocasionar una deficiencia en algunos elementos traza. El pH del medio de cultivo, a causa de su efecto en la disociación de varias sales y complejos, puede potenciar la toxicidad o efecto inhibitorio de éstos (Richmond, 1986a).

La membrana plasmática de las células microalgales no es libremente permeable a los iones H^+ y OH^- . La célula mantiene un gradiente transmembrana de concentración de H^+ que determina la fuerza motora de protones que será utilizada para transportar moléculas a través de la membrana.

Cada microalga presenta un rango de pH óptimo para su cultivo. Un descenso de pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH (Richmond, 1986a). A su vez, el pH se ve afectado por la capacidad tampón y composición del medio de cultivo, cantidad de CO_2 disuelto, temperatura - que a su vez controla la solubilidad del CO_2 - y actividad metabólica de las células microalgales (Venkataraman, 1983); la fuente de N suministrada para el crecimiento juega un papel interactivo muy importante (Raven, 1988). El pH de un

cultivo varía con el desarrollo del mismo, aun en el caso de cultivos fuertemente tamponados.

El Tris es el tampón utilizado normalmente para el control del pH en el cultivo microalgal por su bajo coste relativo y por no ser utilizado como nutriente por las microalgas. Sin embargo, este tampón provoca un aumento del crecimiento bacteriano (Fábregas *et al.*, 1993), al menos en cultivos de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*. La utilización de tampones se evita con el burbujeo del cultivo con aire o con CO₂.

Salinidad

La salinidad puede afectar al metabolismo microalgal bien en función de su actividad osmótica, bien en función de su composición elemental. La célula microalgal, separada del medio por una membrana plasmática libremente permeable al agua pero no a los solutos, en respuesta a salinidades altas debe equilibrar su presión osmótica con el exterior, aumentando la síntesis de solutos o la incorporación de éstos del medio circundante. La tolerancia a la sal varía según las especies; algunas toleran sólo concentraciones milimolares de sal mientras que otras sobreviven en soluciones saturadas. En general, las microalgas marinas, particularmente de hábitats de estuario, toleran un amplio rango de salinidades (eurihalinas) (Boney, 1989).

Algunas microalgas son extremadamente eurihalinas, como la cloroficea *Dunaliella*, adaptándose a amplios márgenes de salinidad (Fábregas *et al.*, 1986c) e incluso aumentos o diluciones severas y repentinas (Avron, 1992), sintetizando glicerol en aguas altamente saladas, que actúa como un soluto compatible con los procesos metabólicos, permitiendo que la actividad enzimática continúe a pesar de las altas concentraciones de sal en el medio circundante (Boney, 1989). Otros solutos con función osmorregulatoria encontrados en microalgas son el manitol, sorbitol, prolina, manosa, sacarosa o isofloridósido, sin un patrón filogenético evidente (Greenway y Setter, 1979).

Aparte de la respuesta osmorregulatoria, la adaptación a altas salinidades implica cambios fisiológicos como una disminución en la actividad fotosintética acompañada de un aumento en la actividad respiratoria, la cual proporcionaría la energía necesaria para corregir el balance Na⁺-K⁺ y/o para la síntesis de solutos osmorregulatorios (Richmond, 1986a).

Agitación

Satisfechos los requerimientos nutritivos y en condiciones ambientales satisfactorias, la agitación constituye el requisito más importante para la obtención de altos rendimientos de biomasa microalgal (Becker, 1994). El movimiento del agua implica una serie de efectos positivos que se traducen en una estimulación general del metabolismo celular:

1. Asegurar una distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, evitando la formación de gradientes minerales alrededor de las células durante los períodos de metabolismo activo (Laing y Ayala, 1990).

2. Mejorar la distribución de la luz a las células asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas. En un cultivo bien agitado, las células individuales están expuestas a la misma intensidad de radiación (densidad de fotones) incidente (promediada sobre períodos de tiempo largos), aunque tienen grandes variaciones temporales en la densidad de fotones incidente (Raven, 1988). Tales organismos se adaptan fenotípicamente a la densidad de fotones media a la cual están expuestos. La agitación evita además los efectos fotoinhibitorios que se producirían en un cultivo no agitado sobre aquella parte de la población continuamente expuesta a la intensidad incidente completa (Harris, 1978).

- 3.- Disminuir la tensión de oxígeno del cultivo. Una alta densidad de células fotosintéticamente activas provoca concentraciones extremadamente altas de O_2 disuelto durante las horas de fotosíntesis máxima. Concentraciones de O_2 superiores a las del aire presentan un efecto inhibitorio de la fotosíntesis, especialmente si la concentración de CO_2 es baja (Kaplan *et al.*, 1986b).

- 4.- Evitar que las células sedimenten en el fondo del recipiente de cultivo y prevenir la estratificación termal.

La agitación puede realizarse mediante diferentes métodos tales como agitación mecánica, bombas o aireación (Becker, 1994). La aireación es el método más utilizado dado que el aire puede ser utilizado como gas portador si se necesita suministrar pulsos de CO_2 como medio de control del pH.

Nutrientes

El medio de cultivo suele realizarse por la enriquecimiento de aguas naturales filtradas y esterilizadas con sales inorgánicas u otras fuentes de

nutrientes. Las concentraciones de nutrientes aportadas para el cultivo microalgal han variado considerablemente (Mostert y Grobbelaar, 1987), principalmente a causa de que el crecimiento microalgal y la incorporación de nutrientes no siguen una relación simple, siendo dependientes de factores tales como las concentraciones internas y externas, tasas de difusión, especies, etc. (Goldman, 1976). Además, la concentración de nutrientes óptima para una especie microalgal dada varía en función de la densidad de población, luz, temperatura y pH (Kaplan *et al.*, 1986b).

La absorción de los nutrientes tiene lugar por difusión pasiva o a través de sistemas enzimáticos específicos, mediados por energía y limitados por la membrana, que generan concentraciones intracelulares elevadas de esos iones como sustratos para los diferentes procesos enzimáticos de asimilación. Bajo condiciones de crecimiento limitado por nutrientes, la absorción del nutriente (una función de la concentración externa del mismo) está en equilibrio con la cuota celular del nutriente en cuestión.

Los nutrientes necesarios para el crecimiento microalgal pueden clasificarse en macro- y micronutrientes, en función de la cantidad en que son requeridos para obtener un crecimiento óptimo. Los macronutrientes son los elementos que forman parte de las moléculas estructurales: C, O, H, N, P, S y, en función de la especie, también puede incluirse el Si, Mg, Ca, Na y K. Los micronutrientes se requieren en concentraciones en el medio de $\mu\text{g.l}^{-1}$ o menores y forman parte de moléculas esenciales como factores de crecimiento o enzimas, o bien son necesarios como cofactores de enzimas: Fe, B, Mn, Cu, Zn, Mo, Co y vitaminas (tiamina, biotina y B₁₂). Los principales macronutrientes a tener en cuenta en el cultivo masivo de microalgas marinas son: C, N y P, así como el Si en el caso de las diatomeas.

En la formulación de un medio de cultivo no sólo son importantes las cantidades totales de nutrientes, sino también las proporciones entre ellos, p. ej., N:P y N:Si (de la Noüe y de Pauw, 1988). Los nutrientes pueden suministrarse al medio de cultivo como sales inorgánicas de diverso grado de pureza, compuestos orgánicos o a partir de residuos líquidos de diverso origen (residuos fermentados, plantas de tratamiento de aguas residuales, etc.).

Carbono

El carbono constituye aproximadamente la mitad de la biomasa seca microalgal (Kaplan *et al.*, 1986b). El C puede suministrarse como un sustrato inorgánico, en la forma de CO₂ gaseoso o bicarbonato, o como C orgánico. El CO₂ es la fuente de C preferida por las microalgas, dado que difunde rápidamente del agua al interior de la célula y es utilizable directamente en los procesos de fijación. En el crecimiento fotoautotrófico obligado, el CO₂ es la única especie química que puede ser utilizada como fuente de carbono.

En el agua de mar, el dióxido de carbono está presente como gas disuelto (CO_{2(ac)}) y los iones bicarbonato (HCO₃⁻) y carbonato (CO₃²⁻). El conjunto de las tres formas constituye el carbono inorgánico disuelto (CID), y sus proporciones dependen del pH, de modo que según aumenta éste las proporciones de HCO₃⁻ y CO₃²⁻ aumentan en relación al CO₂ disuelto. En el agua de mar (pH aprox. 8.2) la concentración de CID es 2.8 mM, y está presente principalmente en la forma de HCO₃⁻; no obstante, no todas las microalgas son capaces de utilizar el HCO₃⁻ como una fuente de C (Boney, 1989). En poblaciones microalgales densas, la propia actividad fotosintética tenderá a reducir el nivel de CO₂ y aumentar la alcalinidad, pudiendo alcanzarse niveles 0 de CO₂ por encima de la termoclina, especialmente si la temperatura es templada, volviéndose limitante para las microalgas incapaces de utilizar bicarbonato (Boney, 1989).

La asimilación del HCO₃⁻ en cantidad suficiente para soportar la fotosíntesis requiere transporte activo y/o ser disociado por una anhidrasa carbónica (Kaplan *et al.*, 1986b). En algunas microalgas como *Chlorella vulgaris* 11h, *Porphyridium cruentum* R-1 (Miyachi *et al.*, 1987) o *Phaeodactylum tricornutum* (Dixon y Merrett, 1988), la anhidrasa carbónica es intracelular, probablemente cloroplástica, mientras en otras como *Chlamydomonas reinhardtii* (Tsuzuki, 1983) o *Dunaliella tertiolecta* (Miyachi *et al.*, 1987), está localizada también en la superficie celular.

La concentración de CO₂ del medio afecta a la estructura interna y fisiología de las células en cultivo (Miyachi *et al.*, 1987). Las células cultivadas en concentraciones altas de CID (>1 mM) poseen tasas de crecimiento y tasas de fotosíntesis más altas que aquellas cultivadas en [CID] bajas (<0.1 mM) (Canvin, 1990). Las células cultivadas en [CID] altas, presentan un K_{1/2} (CID) para la fotosíntesis 1-2 mM a pH 8.0, aumentando con el pH, y carecen de actividad anhidrasa carbónica externa. Para las células crecidas en [CID] bajas, K_{1/2} (CID) es menor de 15 µM y muestran una importante actividad anhidrasa carbónica externa. Las células microalgales cultivadas en [CID] bajas presentan también

sistemas de transporte activo tanto para el CO_2 como para el HCO_3^- (Miyachi *et al.*, 1987), localizados sobre la membrana plasmática, la del cloroplasto, o ambas. Mediante estos mecanismos, estas células aseguran concentraciones intracelulares de CID muy superiores a la extracelular, manteniendo una alta tasa de fotosíntesis y evitando la actividad oxigenasa de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa - RuBisCO - (Raven, 1988; Canvin, 1990). Intracelularmente la mayor parte del CID probablemente está presente como HCO_3^- , y la anhidrasa carbónica intracelular es esencial para el suministro de CO_2 a la Rubisco (Canvin, 1990).

Las microalgas también pueden utilizar compuestos orgánicos como fuentes de carbono, si bien los sustratos utilizados varían de una especie a otra e incluso entre cepas distintas. La falta de versatilidad en la utilización de sustratos orgánicos parece ser consecuencia de restricciones en la permeabilidad de la membrana celular (Becker, 1994). Los rendimientos obtenidos en cultivos mixotróficos con glucosa o acetato como fuente de C son 2 - 3 veces superiores a los de los cultivos fotoautotróficos (Cid *et al.*, 1992a, b).

Nitrógeno

Después del carbono, el nitrógeno es cuantitativamente el elemento más importante que contribuye a la biomasa seca de las células microalgales. En las microalgas no diatomeas en crecimiento exponencial, el nitrógeno supone el 7 - 10% de la materia seca (Kaplan *et al.*, 1986b).

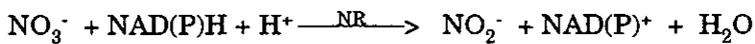
El nitrógeno es frecuentemente un nutriente limitante para el crecimiento de poblaciones microalgales en aguas oceánicas superficiales. La concentración de formas inorgánicas de N combinado en la aguas oceánicas, principalmente nitrato y amonio, es frecuentemente menor de $5 \mu\text{M}$ y puede ser indetectable (Syrett, 1987).

La mayoría de las microalgas pueden utilizar distintas especies químicas como fuente de nitrógeno, tanto inorgánicas como orgánicas. Entre las fuentes inorgánicas, la capacidad de utilizar nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) o amonio (NH_4^+) parece general entre las microalgas (Kaplan *et al.*, 1986b).

La incorporación del amonio es probablemente un uniporte antagonizado por la bomba de extrusión de protones del plasmalema, y no requiere el consumo de energía metabólica (Ullrich, 1987). En las microalgas están presentes varias enzimas implicadas en la asimilación del amonio: glutamina sintetasa (GS),

glutamato sintetasa (GOGAT) y glutamina deshidrogenasa (GDH). La principal ruta de incorporación del amonio en las microalgas es el sistema GS/GOGAT, dependiente de ATP. Los niveles de actividad de estas tres enzimas dependen de las condiciones de cultivo, particularmente de la fuente y concentración de N utilizada para el crecimiento (Tischner, 1987; Syrett, 1988).

Cuando el nitrógeno se incorpora en forma oxidada, como NO_3^- o NO_2^- , debe ser reducido a NH_4^+ antes de ser incorporado en moléculas orgánicas. La reducción completa del NO_3^- a NH_4^+ ocurre en dos etapas, catalizadas por dos enzimas distintas: la nitrato reductasa (NR), que cataliza la reducción del NO_3^- a NO_2^- , y la nitrito reductasa (NiR), que cataliza la reducción del NO_2^- a NH_4^+ :



siendo "Fd" la ferredoxina, "red" en estado reducido y "ox" en estado oxidado. Ambos pasos son suficientemente exergónicos a pH fisiológico, por lo que no requieren el aporte de energía de enlaces fosfato (Losada *et al.*, 1987). La incorporación del nitrato requiere energía metabólica, y es probablemente un cotransporte NO_3^-/H^+ con exceso de protones, con la acción de una bomba de extrusión de protones cuya actividad aumenta con el decrecimiento del potencial de membrana y del pH citosólico (Ullrich, 1987).

Gran número de especies microalgales son capaces de utilizar el nitrógeno en forma de nitrito, aunque no es tan abundante en la naturaleza como las otras formas de nitrógeno inorgánico. Además, el nitrito en altas concentraciones puede inhibir el crecimiento (Darley, 1982; Kaplan *et al.*, 1986b).

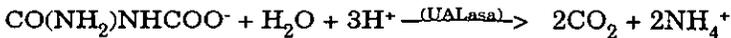
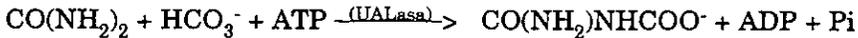
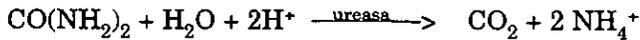
Este proceso de asimilación reductora del N inorgánico en aminoácidos puede ser considerado un proceso fotosintético (Losada *et al.*, 1987; Turpin y Weger, 1990), dado que utiliza, directa o indirectamente, una alta proporción del poder reductor fotogenerado en el cloroplasto (Maldonado y Aparicio, 1987). La reducción de NO_3^- a NH_4^+ y su asimilación en glutamato requiere 5 pares electrónicos. Consecuentemente, este proceso requiere la evolución fotosintética de 2 moles y medio de O_2 por mol de NO_3^- asimilado.

La asimilación de nitrato está sometida a fotorregulación. En oscuridad decrece la actividad NR *in vivo*, que es recuperada con la iluminación (Ninnemann, 1987). Tanto la intensidad de luz como la calidad de la luz pueden controlar la

asimilación del NO_3^- , mediante la modulación bien de la incorporación del NO_3^- , bien de la reducción del NO_3^- a través de la regulación de la síntesis y actividad de la NR (Maldonado y Aparicio, 1987). Mientras la luz roja absorbida por los fitocromos parece inducir la síntesis de NR, la luz azul absorbida por la flavina de la enzima actúa mediante la activación del enzima inactivo ya existente (Maldonado y Aparicio, 1987; Ninnemann, 1987).

Las microalgas pueden utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos nitrogenados como fuente de N: urea, numerosos aminoácidos e incluso otros compuestos tales como las purinas guanina, adenina, xantina o hipoxantina (Antia *et al.*, 1991). Entre los aminoácidos, glicina, triptófano, arginina, glutamina y asparagina son los más universalmente utilizados por las microalgas, soportando crecimientos similares a los obtenidos con fuentes de N inorgánicas

El papel de la urea como una fuente de nitrógeno para el crecimiento de las poblaciones de microalgas sólo se ha reconocido recientemente (Turley, 1985). En función de la concentración extracelular, la incorporación de la urea ocurre por difusión pasiva o transporte activo dependiente de ATP y Na (Antia *et al.*, 1991). La urea debe ser hidrolizada antes de que su nitrógeno se incorpore a las células microalgales, a través de reacciones catalizadas por la ureasa o la urea amidoliasa (UALasa), la última restringida a las Chlorophyceae (Syrett, 1988; Antia *et al.*, 1991):



Los resultados de algunos estudios, particularmente aquellos en los que están implicadas interacciones nitrato-amonio, sugieren que el amonio es la fuente de nitrógeno preferida por las microalgas. Así, si se adiciona amonio a cultivos que están asimilando nitrato, normalmente se observa un cese rápido de la incorporación del nitrato, y sólo cuando el amonio adicionado ha sido asimilado comienza de nuevo la incorporación de nitrato (Syrett, 1987). No obstante, algunas microalgas presentan la capacidad de asimilar nitrato aún en presencia de altas concentraciones de amonio (Collos, 1989), en las cuales la incorporación de nitrato es gobernada por la relación nitrato/amonio extracelular.

La principal forma de inhibición de la asimilación del NO_3^- por el amonio en microalgas es probablemente la inhibición del transportador, seguida más tardíamente por la inactivación reversible de la nitrato reductasa por el amonio o alguno de sus productos metabólicos (Ullrich, 1987; Syrett, 1988). En algunas microalgas esta inhibición sólo se da en la presencia de CO_2 , es decir, cuando la fotosíntesis suministra esqueletos carbonados para la asimilación del amonio. Otro mecanismo involucraría la inhibición física del mecanismo de incorporación de nitrato por una reducción severa del potencial de membrana, acompañada de una modificación del pH intracelular. Ambos procesos son casi instantáneos y pueden explicar por qué la inhibición finaliza cuando se consume o se retira el amonio (Ullrich, 1987).

Los resultados encontrados para diferentes microalgas, revisados por Antia *et al.* (1991), indican que la presencia de urea inhibe la incorporación de nitrato, aunque en un grado menor que el amonio. El amonio por su parte inhibe la incorporación de urea, aunque el grado de la inhibición depende de la especie, estatus nutritivo de las células, concentración de amonio, y luz o oscuridad (Molloy y Syrett, 1988).

En la naturaleza, las poblaciones microalgales se encuentran con frecuencia en situaciones en que están presentes varias fuentes de nitrógeno. Hay evidencias de que en tales situaciones las microalgas asimilan preferencialmente el amonio sobre las otras fuentes de nitrógeno (McCarthy, 1980). No obstante, hay casos en que nitrato, amonio y urea son asimilados simultáneamente (Collos, 1989). Se ha sugerido (McCarthy y Goldman, 1979) que el fitoplancton marino es oportunista en cuanto a la capacidad de asimilar rápidamente cualquier pulso de amonio que pueda surgir en su ambiente a partir de la excreción animal.

La asimilación del N interacciona fuertemente con la fotosíntesis y respiración (Turpin y Weger, 1990), interacciones que se producen básicamente a través de la oxidación de poder reductor fotogenerado, la fijación fotosintética de C, el suministro de esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos y la oxidación de poder reductor del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC).

En cuanto a las interacciones entre la fijación de CO_2 y la asimilación de nitrógeno, se pueden distinguir dos niveles: el papel regulador del CO_2 en la asimilación del nitrato, y los efectos de la asimilación de nitrato y amonio en la fijación de CO_2 .

La incorporación de nitrato o amonio es dependiente de la disponibilidad de CO_2 (Lara *et al.*, 1987; Syrett, 1988), pero mientras la asimilación de amonio alcanza tasas máximas a intensidades de luz subsaturantes para la fijación de C, la tasa de asimilación de nitrato muestra una fuerte dependencia de la tasa de fijación de C (Lara *et al.*, 1987). CO_2 y NH_4^+ se comportan como antagonistas en cuanto a la modulación de la incorporación de nitrato. Por otra parte, la asimilación de nitrato o urea produce una disminución en la fijación de CO_2 a intensidades de luz subsaturantes (Romero y Lara, 1987; Antia *et al.*, 1991). Sin embargo, el amonio estimula la fijación de C tanto en la luz (Lara *et al.*, 1987) como en la oscuridad (Syrett, 1987). La asimilación de amonio en oscuridad es acompañada además por la movilización de las reservas celulares de polisacáridos en *Chlorella* y *Amphidinium*, las cuales no son disponibles en estas microalgas para la asimilación de nitrato (Syrett, 1988).

Fósforo

El fósforo juega un papel trascendental en los procesos celulares implicados en la transferencia de energía y en la biosíntesis de ácidos nucleicos. Las células microalgales utilizan únicamente como fuente de fósforo el fosfato inorgánico (Pi): $\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{HPO}_4^{2-}$. Para la utilización de fosfatos orgánicos se hace necesaria una hidrólisis previa por enzimas exocelulares (fosfoesterasas o fosfatasa), y el Pi resultante es asimilado (Nalewajko y Lean, 1980).

Los requerimientos de fósforo para un crecimiento óptimo difieren considerablemente según la especie, incluso cuando no existe ningún factor limitante para el crecimiento (Becker, 1994). Además, las células microalgales parecen capaces de acumular reservas de fosfato en exceso de los requerimientos inmediatos cuando los niveles de nutrientes son altos, y de utilizar estas reservas durante los períodos de niveles bajos de fosfato en el ambiente (Boney, 1989).

La incorporación de fosfato es una reacción dependiente de energía, y es estimulada por la luz, aunque la saturación se alcanza a intensidades bastante bajas (Nalewajko y Lean, 1980). La energía necesaria para la incorporación del fosfato puede ser suministrada por la fotosíntesis o la respiración. La tasa de incorporación también está influenciada por la concentración de fosfato en el medio, el pH y, en algunos casos, por la disponibilidad de Na^+ , K^+ ó Mg^{+2} (Kuhl, 1974). En las células, el fosfato es incorporado en varios compuestos orgánicos e inorgánicos. Los compuestos de fósforo inorgánicos más frecuentes en las microalgas son los polifosfatos, y, en algunos casos, metafosfatos. Las microalgas también

pueden incorporar los ortofosfatos en compuestos orgánicos de "alta energía", siguiendo tres procesos principales: fotofosforilación, fosforilación del sustrato y fosforilación oxidativa.

Los polifosfatos constituyen la principal forma de reserva de P en las microalgas. La síntesis de polifosfatos es una reacción energía-dependiente. Los polifosfatos inorgánicos son sintetizados en el período de luz a expensas del ATP generado durante la fotofosforilación (Kuhl, 1974). La formación de polifosfatos en el período de luz está influenciada por otras condiciones, tales como la presencia de O_2 ó CO_2 y el pH del medio.

Los polifosfatos, además de servir como reserva de P, regulan el nivel celular de ATP, ADP, otros polifosfatos de nucleósidos y, principalmente, Pi. Durante los períodos de crecimiento rápido las microalgas pueden mantener una relación ATP/ADP óptima, independientemente del aporte de P externo, mediante la fosforilación del ADP a partir de los polifosfatos (Nalewajko y Lean, 1980). Suministran además el P necesario para la síntesis de ácidos nucleicos o reacciones asociadas con la división celular (Kaplan *et al.*, 1986b).

Silicio

El silicio está presente en la pared celular de miembros de diferentes divisiones de algas (Leadbeater y Green, 1993), pero su metabolismo sólo se ha estudiado ampliamente en las diatomeas, donde constituye el principal componente de la pared celular. En las diatomeas el silicio puede representar entre el 26-63 % del peso seco celular (Boney, 1989). No obstante, algunas especies son capaces de crecer con paredes silíceas muy delgadas. La única forma de silicio que puede ser incorporada por las diatomeas es el ácido ortosilícico (H_4SiO_4); los restantes compuestos de silicio deben ser hidrolizados a silicato soluble (Kaplan *et al.*, 1986b).

La incorporación de silicio es dependiente de energía, y está básicamente confinada a la parte del ciclo celular que precede inmediatamente a la separación celular, durante la cual se forma la pared celular (Kaplan *et al.*, 1986b). La rapidez con que la incorporación de silicio comienza y finaliza durante este período sugiere que el proceso de transporte está acoplado estrechamente con la deposición de la pared. La incorporación del silicio está estrechamente relacionado con el metabolismo del azufre (Boney, 1989).

Otros nutrientes

El azufre forma parte de aminoácidos esenciales, sulfolípidos, vitaminas, etc. El sulfato inorgánico es incorporado por un proceso de transporte activo dependiente de energía (Kaplan *et al.*, 1986b), y éste es incorporado como sulfuro en cisteína por un proceso de reducción fotosintética dependiente de ATP y poder reductor (Losada *et al.*, 1987).

El sodio es un activador de varias enzimas y es necesario para todas las microalgas halofílicas y marinas. El potasio es universalmente requerido por las microalgas e interviene en el metabolismo como cofactor enzimático, en la síntesis proteica y regulación osmótica (Kaplan *et al.*, 1986b). El magnesio forma parte de la molécula de clorofila, determina la agregación de ribosomas, interviene en las reacciones de transferencia de grupos fosfato (Kaplan *et al.*, 1986b) y es necesario para la activación de la RuBisCO (Jensen, 1990). El calcio forma parte de la pared celular de diversas clases de microalgas (Leadbeater y Green, 1993) y se han descrito ATPasas y otras enzimas microalgales dependientes de calcio (Kaplan *et al.*, 1986b)

Los micronutrientes son requeridos en bajas concentraciones y en exceso resultan tóxicos. El hierro forma parte de la molécula de ferredoxina, proteínas Fe-S y citocromos, siendo por tanto imprescindible para la fotosíntesis y asimilación del nitrato. Manganeso y cobre forman parte de los sistemas de transporte electrónico y son cofactores de varias enzimas. El molibdeno es uno de los grupos prostéticos de la nitrato reductasa y es por tanto necesario para la asimilación del nitrato. El níquel resulta tóxico a muy bajas concentraciones pero es necesario para las microalgas que metabolizan la urea por la enzima ureasa. El cobalto es necesario en aquellas microalgas que sintetizan la vitamina B₁₂; las que no la sintetizan no necesitan el cobalto pero sí la vitamina. A veces, se requieren bajas concentraciones de tiamina y biotina.

USOS Y APLICACIONES DE LAS MICROALGAS

En general, las ventajas del cultivo de microalgas se pueden resumir en tres puntos (Cohen, 1986):

1. El cultivo de microalgas es un sistema biológico eficiente de utilización de la energía solar para producir materia orgánica. Las microalgas crecen más

rápidamente que las plantas terrestres y es posible obtener mayores rendimientos anuales de biomasa.

2. La composición bioquímica de las microalgas puede modificarse fácilmente variando las condiciones ambientales y/o la composición del medio de cultivo.

3. Bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular en altas concentraciones compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros.

Se han propuesto y desarrollado numerosas aplicaciones de las cianobacterias y microalgas en diversos campos tecnológicos, en cultivo masivo o continuo, libres o inmovilizadas, vivas o procesadas, algunas de las cuales se encuentran en plena explotación comercial. Hay numerosas revisiones recientes, compiladas en libros tales como *Microalgal Biotechnology* (Borowitzka y Borowitzka, 1988), *Algal and Cyanobacterial Biotechnology* (Cresswell *et al.*, 1989), *Introduction to Applied Phycology* (Akatsuka, 1990), o *Microalgae. Biotechnology and Microbiology* (Becker, 1994), destacando las siguientes aplicaciones:

- **Acuicultura:** actualmente constituyen la principal fuente de alimento utilizada en la nutrición de moluscos, rotíferos y fases larvarias de crustáceos, siendo además utilizadas como complemento en la dieta de peces o como medio para mantener la calidad del agua.

- **Tratamiento de aguas:** tratamiento de aguas residuales; detoxificación biológica y control de metales pesados en aguas naturales o en aguas polucionadas industrialmente.

- **Agricultura:** utilización de la biomasa microalgal como biofertilizante.

- **Alimentación humana y pienso animal:** las microalgas representan una fuente de proteína - *Single Cell Protein* - con posibles aplicaciones en nutrición humana, pero principalmente como complemento de piensos animales.

- **Biomedicina y farmacología:** utilización en dietas de adelgazamiento, tratamiento de heridas. Algunas microalgas presentan actividades antibacterianas, antifúngicas y antitumorales. Por otra parte, la incorporación de ciertas microalgas en la dieta ejerce efectos hipocolesterolémicos.

- **Industria química y alimenticia:** producción de sustancias de interés comercial, tales como vitaminas, pigmentos, fitol, aminoácidos, polisacáridos, glicerol, enzimas, promotores del crecimiento en industrias de fermentación; ceras, biosurfactantes, fosfolípidos y lecitinas, ácidos grasos esenciales y prostaglandinas, o la utilización de los lípidos algales para la producción de combustibles líquidos.

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE MICROALGAS EN CULTIVO. LAS MICROALGAS COMO BASE NUTRITIVA EN ACUICULTURA

Microalgas y acuicultura

La diversificación de las aplicaciones de la biomasa microalgal ha provocado un incremento de los estudios sobre composición bioquímica y producción de microalgas cultivadas.

El desarrollo de la acuicultura de moluscos y crustáceos ha motivado la intensificación de las investigaciones sobre la producción masiva de microalgas marinas de cara a su utilización como alimento en los sistemas de acuicultura (Ukeles, 1980). El cultivo controlado de larvas y semilla de moluscos de interés comercial, así como de rotíferos y larvas de crustáceos y peces, implica la producción diaria de sustanciales volúmenes de determinadas especies de microalgas marinas. De hecho, en 1980 Persoone y Claus definieron el cultivo de microalgas como el principal cuello de botella para el desarrollo de los sistemas de acuicultura, y todavía hoy los acuicultores siguen dependiendo de la producción y uso de microalgas como alimento vivo para moluscos, peces y crustáceos durante al menos parte de su ciclo vital, a pesar de los esfuerzos por reemplazar las microalgas por piensos inertes (De Pauw y Persoone, 1988). Las microalgas no sólo son importantes como fuente de alimento, sino que, junto con las bacterias, tienen un papel importante en el balance de oxígeno y dióxido de carbono en los cultivos (Pruder, 1983).

La estrategia más ampliamente utilizada consiste en el cultivo de cepas puras de microalgas seleccionadas. Se han elegido, en general, especies que presentan un buen desarrollo en cultivo. Actualmente, se están utilizando más de 40 especies diferentes en procedimientos de cultivo intensivo. Las especies más frecuentemente utilizadas son *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*,

Monochrysis lutheri, *Teraselmis suecica*, *Dunaliella* spp. y *Chlorella* spp. (De Pauw y Persoone, 1988). Un segundo paso ha sido la optimización de los sistemas y parámetros de cultivo, estudiando los efectos de los distintos parámetros para obtener una máxima producción de biomasa (Laing y Utting, 1980; Laing y Helm, 1981; Fábregas *et al.*, 1984, 1985a, 1986c). A nivel industrial, los cultivos puros de algas se utilizan sólo para aplicaciones que requieren volúmenes relativamente pequeños de microalgas: larvas de bivalvos, camarones y el rotífero *Brachionus plicatilis*.

Aspectos nutricionales del uso de microalgas en acuicultura

El principal problema asociado con el uso de microalgas en acuicultura es la falta de conocimiento tanto sobre el valor nutricional de las microalgas como de los requerimientos nutricionales de los consumidores de éstas (De Pauw y Persoone, 1988). Las microalgas son la fuente de materia, energía y factores de crecimiento para estos organismos. Su crecimiento y desarrollo están influenciados por la disponibilidad y accesibilidad algal (tamaño, forma y densidad), así como por su composición bioquímica, la cual determina el contenido calórico y la presencia o ausencia de compuestos esenciales o tóxicos (Yúfera y Lubián, 1990).

La razón exacta por la que unas especies son buenas fuentes de alimento y otras no, o no tanto, no ha sido todavía bien definida, encontrándose muchas explicaciones contradictorias en la literatura. No obstante, se ha establecido algunos criterios nutricionales. Las microalgas no deben de ser tóxicas, deben tener una talla apropiada para ser ingeridas, una pared celular digerible, y aportar los constituyentes bioquímicos esenciales. Así, los moluscos bivalvos no pueden digerir células con paredes celulares demasiado gruesas, mientras sí los rotíferos. El tamaño celular afecta a las eficiencias de filtración e ingestión. La mayoría de las especies de bivalvos retienen eficientemente partículas de 2 a 12 μm , aún cuando las larvas utilizan también eficientemente partículas de 1 a 2 μm (Yúfera y Lubián, 1990). La actividad filtradora depende del tamaño celular y densidad de células en el sistema de cultivo (Yúfera y Lubián, 1990), siendo además afectada por la calidad de la biomasa algal (Laing y Millican, 1986).

Si una microalga es ingerible y digerible, su valor nutricional dependerá de su composición bioquímica (Webb y Chu, 1983). Brown *et al.* (1989) han realizado una revisión bastante actualizada sobre composición bioquímica microalgal y los requerimientos nutricionales de los animales. En este contexto, la composición y concentración de aminoácidos, así como la composición de los lípidos, son de

primordial importancia en el valor nutricional de las microalgas. Así, moluscos bivalvos, camarones y peces marinos requieren un aporte en la dieta de ciertos ácidos grasos poliinsaturados, principalmente de la serie $\omega 3$ (Webb y Chu, 1983; Enright *et al.*, 1986a), los cuales sí son sintetizados por algunas microalgas. De aquí surge también la probable explicación para las interacciones sinérgicas observadas para las dietas mixtas en moluscos bivalvos (Epifanio, 1979; Strömngren y Cary, 1984). Bacterias y productos extracelulares juegan también un papel importante en la nutrición.

El cultivo masivo, "batch" o semicontinuo, en instalaciones interiores es el principal método utilizado actualmente en las unidades de producción de biomasa microalgal de las empresas relacionadas con la acuicultura. La producción se basa, en general, en el cultivo en condiciones ambientales óptimas de especies microalgales que han sido seleccionadas por su valor alimenticio a partir de ensayos de crecimiento y supervivencia de larvas y semilla de especies con interés comercial. No obstante, esta biomasa es utilizada generalmente con desconocimiento de su composición bioquímica, principal parámetro del que depende su valor nutricional.

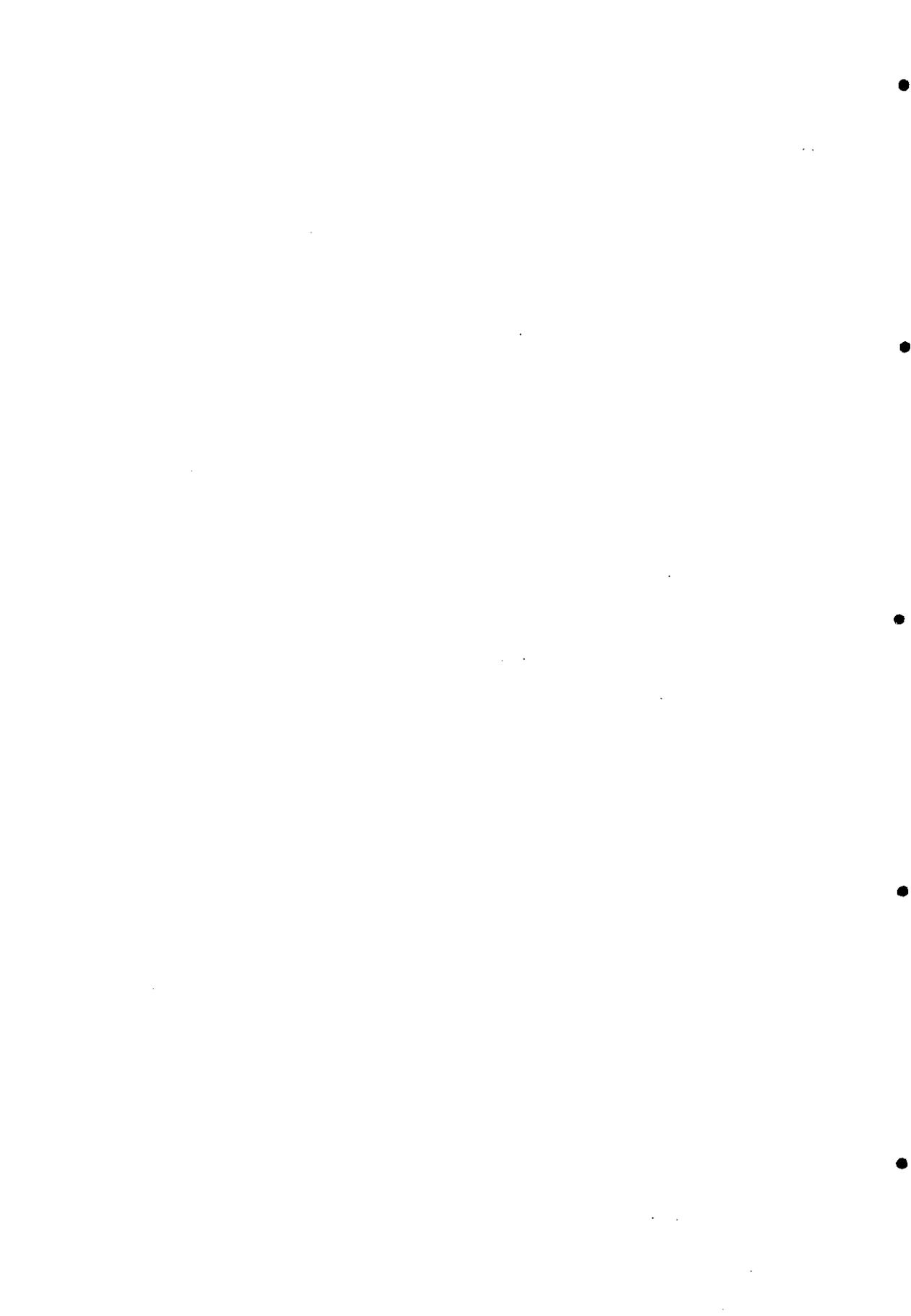
La composición bioquímica bruta de una especie microalgal, la composición de aminoácidos, el grado de insaturación de los ácidos grasos o el contenido en vitaminas, depende de las condiciones de cultivo y del momento del ciclo de crecimiento en que se cosecha la biomasa (De Pauw y Persoone, 1988; Becker, 1994). No obstante, no pueden realizarse generalizaciones sobre las respuestas de las microalgas a las alteraciones ambientales dado que tales respuestas difieren según la especie (Brown *et al.*, 1989).

Algunas de las variaciones en la composición bioquímica publicadas para diferentes microalgas bajo el efecto de diferentes condiciones ambientales han sido revisadas por Brown *et al.* (1989). En general, bajo limitación o deficiencia de N ó P, los niveles de carbohidratos y/o lípidos tienden a aumentar, mientras los niveles de proteína decrecen. El contenido de $20:5\omega 3$ de *Isochrysis galbana* o el de $22:6\omega 3$ de *Chaetoceros gracilis* disminuyen bajo condiciones de limitación de N o silicatos. Altas intensidades luminosas o el crecimiento fotoheterotrófico aumentan el grado de insaturación de los ácidos grasos de *Scenedesmus* sp., mientras altas temperaturas producen el efecto contrario. El perfil de ácidos grasos de *Cyclotella meneghiniana* varía a lo largo del fotoperíodo, siendo los ácidos grasos saturados la fracción predominante al comienzo de la fase de luz. Altas salinidades

aumentan el contenido de β -caroteno de *Dunaliella salina* y de los aminoácidos esenciales metionina y fenilalanina de la cianobacteria *Aphonethece halophytica*.

Entre los distintos componentes del medio de cultivo, la fuente y/o concentración de nitrógeno pueden afectar al crecimiento y composición bioquímica de las microalgas en cultivo. La concentración de N del medio afecta a la productividad y composición bioquímica de la biomasa obtenida (Utting, 1985; Wikfors, 1986; Molina *et al.*, 1991). La fuente de N usada para el crecimiento puede afectar a la tasa de crecimiento (Tadros y Johansen, 1988; Levasseur *et al.*, 1993), cuotas celulares de C y N (Levasseur *et al.*, 1993), composición bioquímica bruta (Fábregas *et al.*, 1989a, b) y composición de ácidos grasos (Yongmanitchai y Ward, 1991), aminoácidos (Flynn *et al.*, 1992) y vitaminas (Abalde *et al.*, 1991).

Objetivo



Las microalgas marinas elegidas para este estudio son *Chaetoceros calcitrans*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Tetraselmis suecica*. Estas especies representan microalgas de gran importancia en la actualidad por la extensión de su cultivo para diferentes aplicaciones.

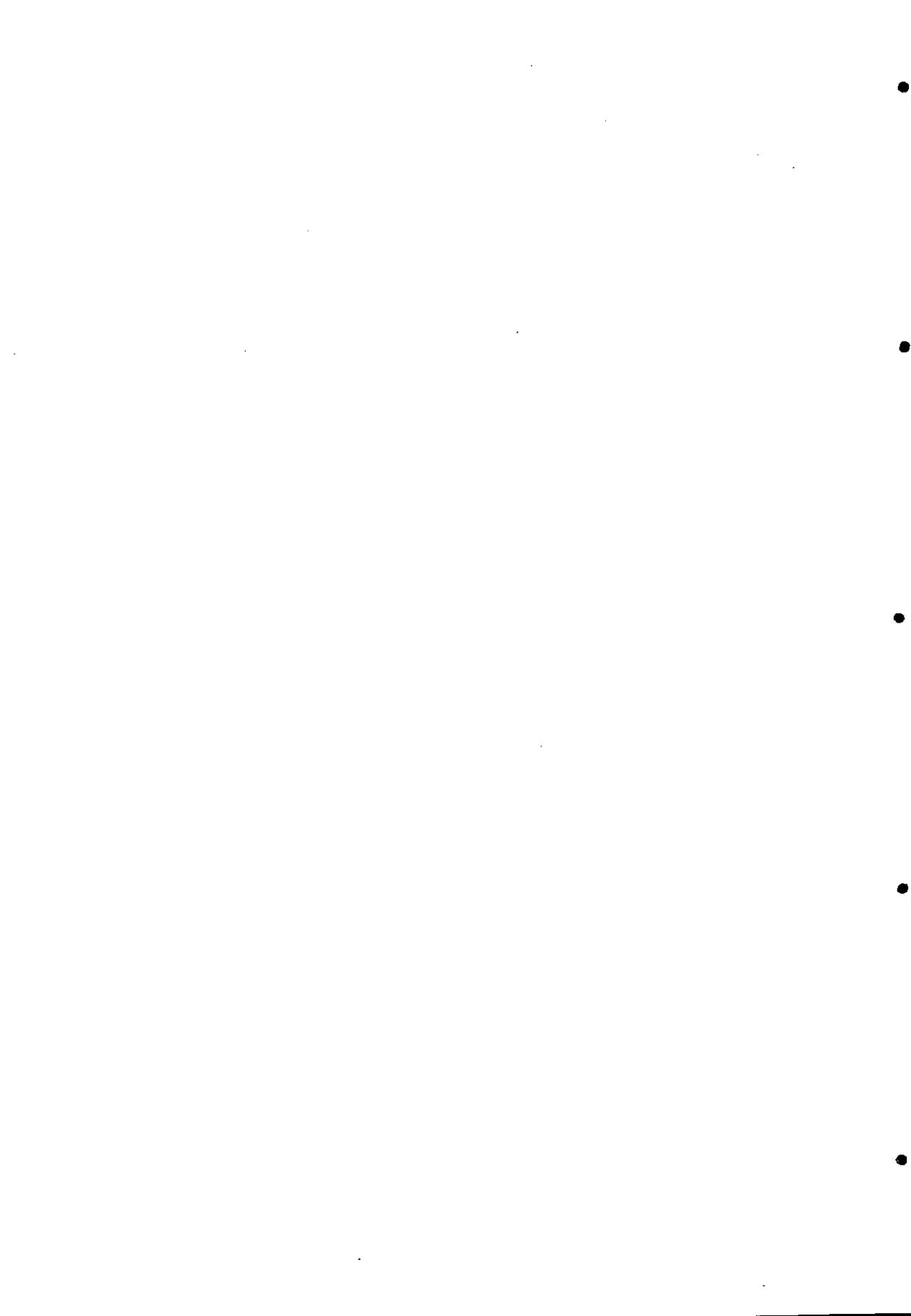
La fuente de N por sí misma puede ser otro factor causante de variaciones en el crecimiento y composición bioquímica de una especie microalgal. La capacidad de utilizar diferentes fuentes de N (nitrato, nitrito, amonio y urea) a altas concentraciones es también ensayada para cada especie microalgal, con especial interés en el uso de la urea, fuente de N más barata que el nitrato y que aporta C en la misma molécula.

En organismos fotoautótrofos, la transición de fase del ciclo de crecimiento es determinada por el agotamiento de los nutrientes (minerales y/o luz), y suele ir acompañada por variaciones del metabolismo celular que se reflejan en una diferente composición bioquímica de la biomasa. De este modo, la recolección en diferentes fases es un método sencillo de modificar la composición de la biomasa, y será determinante de su valor nutricional.

Debido a la inhibición del crecimiento observada para algunas microalgas marinas a elevadas concentraciones de amonio, nos planteamos analizar si este efecto inhibitorio es debido a la toxicidad del amonio, o al decrecimiento en el pH extracelular observado en estos medios.

Finalmente, nos planteamos evaluar el valor como alimento de diferentes dietas microalgales para semilla de mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk, medido en términos de tasa de crecimiento, composición bioquímica y eficiencia de conversión del alimento suministrado.

Materiales y métodos



DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES MICROALGALES

Las especies utilizadas, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano, *Dunaliella tertiolecta* Butcher, *Isochrysis galbana* Parke, *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin y *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch se eligieron en función de su utilización como fuente de alimento en sistemas de acuicultura (De Pauw y Persoone, 1988) y obtención de diversos productos de interés comercial (Regan, 1988).

C. calcitrans (cepa CCMP1315) se obtuvo del "Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton", Maine, U.S.A. *Dunaliella tertiolecta* (cepa DUN) e *Isochrysis galbana* (cepa LB-927/1) se obtuvieron del "Culture Center for Algae and Protozoa", Cambridge, U.K. *Tetraselmis suecica* y *Phaeodactylum tricornerutum* han sido aisladas por el Dr. Fábregas (Universidad de Santiago) de las aguas de la Ría de Arousa (NO de España) (Fábregas, 1982; Herrero *et al.*, 1985) y se han mantenido desde entonces en el Laboratorio de Microbiología Marina de la Universidad de Santiago.

Chaetoceros calcitrans (Paulsen) Takano

El género *Chaetoceros* se clasifica en la clase *Bacillariophyceae* (= *Diatomophyceae*), orden *Centrales*, suborden *Biddulphiineae*, familia *Chaetoceraceae* (Ricard, 1987).

Las diatomeas se caracterizan por la presencia de una cápsula protectora silíceas, el frústulo, constituido por dos partes encajadas la una en la otra, las tecas (epi- e hipoteca). Cada teca se compone de una placa más o menos aplanada, abombada o deprimida, la valva, rodeada por una banda conectiva lateral, el *cingulum*. Los dos grandes grupos de diatomeas, pennales y centrales, se diferencian por la forma general del frústulo y la naturaleza y localización de sus principales estructuras. Básicamente, las diatomeas centrales poseen frústulos de elípticos a circulares, con las ornamentaciones dispuestas con respecto a un punto central. Presentan reproducción sexual oogámica. Cloroplastos en número variable. Las diatomeas producen como principal producto de reserva crisolaminarina, β -1,3-glucopiranosido (Myklestad, 1988).

El género *Chaetoceros* es extremadamente polimorfo y taxonómicamente muy diversificado. Es típicamente planctónico, siendo el género más representado en todos los mares del planeta, con sólo dos especies dulceacuícolas. Comprende formas unicelulares o coloniales, reunidas en cadenas más o menos largas por el

entrecruzamiento de las sedas, y a veces engobladas por un gel mucilaginoso. Las valvas son elípticas en visión valvar y rectangulares en visión conectiva, con simetría bilateral. Las valvas son planas, ligeramente cóncavas o ligeramente convexas, con un manto vertical más o menos desarrollado. El *cingulum* es corto, con una banda conectiva y numerosas bandas intercalares; a veces presentan un *sulcus*. Las sedas, más o menos largas, están situadas en el ápice de cada valva: 2 sedas por valva. Las sedas terminales de las formas coloniales son a menudo diferentes de las intermedias, más robustas y/o diferentemente orientadas. Las sedas aumentan el área superficial, proporcionando una mayor relación superficie/volumen, lo que aumenta a su vez la capacidad de flotación de estas diatomeas planctónicas. El *processus labial*, generalmente central (a veces marginal), presenta una estructura que va del simple túbulo externo, de longitud variable, con una hendidura simple interna, al *processus labial* típico sobre la cara interna pero desprovisto de túbulo externo. La cara valvar suele portar una red de costillas radiales, divergentes a partir de un campo central hialino. El frústulo, sin ornamentación aparente, está poco silicificado. Generalmente presentan hipnosporas y quistes con paredes muy fuertemente silicificadas. En las microalgas los quistes pueden formarse por procesos sexuales o asexuales y pueden formarse, como en el caso de *Chaetoceros*, más de un tipo de ellos durante el ciclo vital (Hollibaugh *et al.*, 1981).

Existe una enorme complejidad en las descripciones y taxonomía de los diferentes aislamientos identificados como formas de *C. calcitrans*. Se consideran formas relacionadas, y se agrupan bajo el mismo tipo aún dudándose de si son la misma especie, *C. tenuissimus* Meunier, *C. galvestonensis* Collier & Murphy, *C. calcitrans* fo. *pumilus* Takano, y *C. simplex* var. *calcitrans* Paulsen (renombrado por Takano como *C. calcitrans*).

C. tenuissimus, *C. galvestonensis* y *C. calcitrans* fo. *pumilus* presentan características morfológicas y ecológicas similares (Rines y Hargraves, 1989). Se presentan como formas unicelulares o cadenas de dos células. Son diatomeas de pequeña talla, con un eje apical de 3-8 μm y un eje perivalvar aproximadamente igual. Presentan sedas rectas y de corta longitud (1-2 veces el eje apical), con una orientación de 45° con respecto a los ejes apical y perivalvar. La dimensión máxima de la célula entera, incluidas sedas, es frecuentemente menor de 10 μm . Según las descripciones tendrían 1 ó 2 cloroplastos. Suelen aislarse en los meses de primavera-verano y en hábitats de estuario. Según Rines y Hargraves (1989), *C. simplex* var. *calcitrans* Paulsen es probablemente una mezcla de diferentes, y no necesariamen-

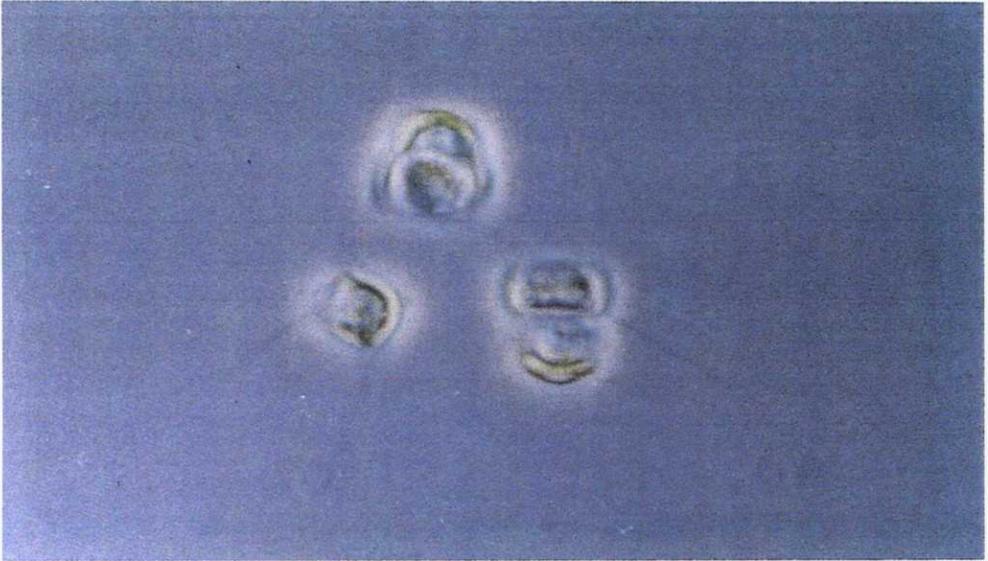


Foto 1.- *Chaetoceros calcitrans* (Microscopio contraste de fases, 1400x)

te relacionadas, diatomeas, cuyas características primarias serían presentarse como formas unicelulares, pequeñas y delicadas.

Los pigmentos descritos para *C. calcitrans* son (Stauber y Jeffrey, 1988): clorofilas a , c_1 y c_2 , caroteno, fucoxantina, neofucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina, y, a diferencia de otras diatomeas, no contiene carotenoides menores ni clorofila c_3 .

C. calcitrans es considerada como una microalga de valor alimenticio en acuicultura (Enright *et al.*, 1986a,b; Utting, 1986), siendo el principal obstáculo la dificultad de su cultivo (Regan, 1988). *Chaetoceros* se ha propuesto también como una fuente de ácido eicosapentaenoico (Regan, 1988).

Dunaliella tertiolecta Butcher

Este flagelado monadoide tradicionalmente se incluía en la clase *Chlorophyceae*, orden *Volvocales*, familia *Polyblepharidaceae* (Bold y Winne, 1985); sin embargo, Ettl (1983) propuso la creación del orden *Dunaliellales*, donde se incluye la familia *Dunaliellaceae* con el único género *Dunaliella* (Chrétiennot-Dinet, 1990).

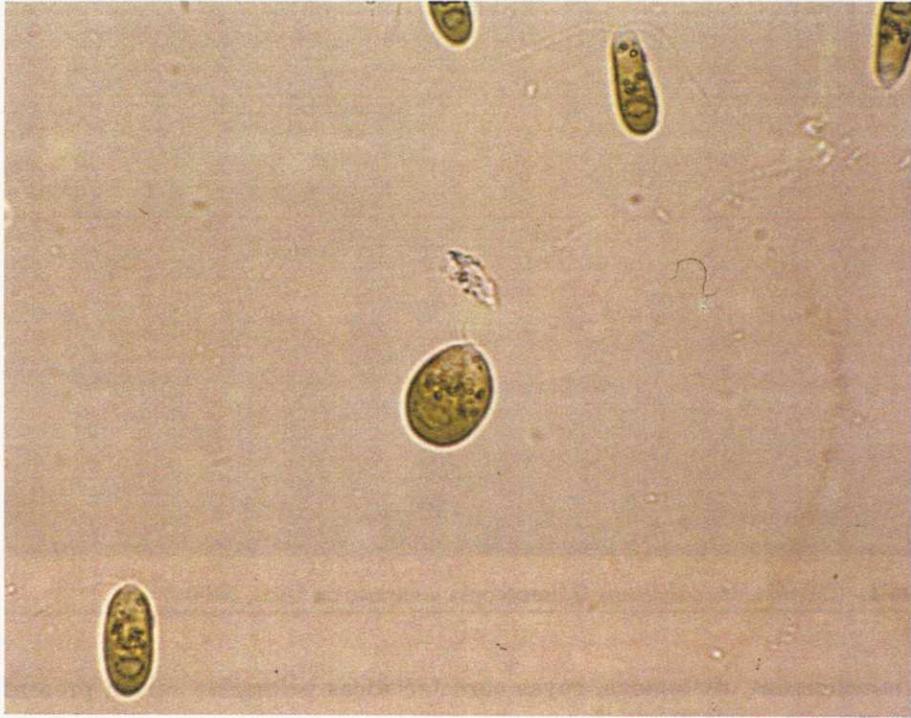


Foto 2.- *Dunaliella tertiolecta* (Microscopio campo claro, 1100x)

El género *Dunaliella* comprende formas unicelulares móviles de forma variable: ovoide, elipsoidal, piriforme, con sección circular. Las células de una especie dada pueden cambiar de forma y tamaño con las condiciones de crecimiento, y frecuentemente se vuelven esféricas bajo condiciones desfavorables (Preisig, 1992). A diferencia de las restantes clorofíceas, *Dunaliella* no presenta una pared celular celulósica, sino una envoltura mucilaginoso externa al plasmalema formada por fibrillas de 25-200 nm de longitud y de naturaleza glucoproteica (Oliveira *et al.*, 1980; Preisig, 1992). Su papel biológico parece estar relacionado con la osmorregulación, dada la ausencia de pared rígida y la capacidad de las especies de este género para soportar grandes cambios en el potencial osmótico. En el ápice, se insertan 2 flagelos iguales y asociados a un sistema de raíces flagelares cruciforme. La membrana celular es fina y elástica. El cloroplasto, en forma de copa, ocupa la mayor parte de la célula. El núcleo se localiza en la mitad anterior de la célula y generalmente entre los lóbulos anteriores del cloroplasto. No hay vacuola contráctil en las formas marinas.

La reproducción es bien por división longitudinal de la célula móvil, bien por fusión de 2 células vegetativas para formar un cigoto. La meiosis tiene lugar durante la germinación del cigoto. Bajo condiciones extremas se ha descrito la

formación asexual de quistes, inmóviles y esféricos, de 12 μm (Chrétiennot-Dinet, 1990; Preisig, 1992). Bajo determinadas condiciones pueden adquirir el estado palmeloide, en el cual las células están encerradas en un mucílago.

D. tertiolecta presenta forma elipsoidal (6-18 x 4.5-14 μm , largo x ancho) y, a diferencia de otras especies, es siempre de color verde. La membrana plasmática tiene 7-8 nm de espesor. La célula es móvil, debido a la presencia de dos flagelos acronemáticos, iguales y homodinámicos, en posición anterior. El pirenoide se encuentra en el cloroplasto en posición central, generalmente penetrado por láminas formadas por pares de tilacoides, pero que nunca atraviesan la matriz del pirenoide (Preisig, 1992). La matriz del pirenoide está rodeada por una capa de almidón, aunque también se acumulan gránulos de almidón en otras partes del cloroplasto, especialmente en cultivos envejecidos. La matriz del pirenoide está compuesta de material granular denso. Dentro del cloroplasto presenta una mancha ocular o estigma, localizada en una posición periférica anterior. Es una estructura compuesta de glóbulos lipídicos que contienen carotenoides y que, en esta especie, parecen estar libres en la matriz del cloroplasto (Preisig, 1992).

El núcleo está rodeado por una envoltura porosa que entra en conexión con el retículo endoplasmático. En el citoplasma existen vacuolas de diferentes tipos. En diferentes partes de la célula se observan vacuolas con contenidos lipídicos. Junto a las mitocondrias se sitúan microcuerpos o peroxisomas que consisten en una matriz granular rodeada de una membrana simple. Hay de 2 a 4 cuerpos de Golgi situados entre los corpúsculos basales y el núcleo. El retículo endoplasmático, asociado con el núcleo, aparato flagelar y dictiosomas, se extiende bajo el plasmalema por la mayor parte de la célula (Preisig, 1992). *D. tertiolecta* presenta como principales pigmentos: clorofilas *a* y *b*, β -caroteno, luteína, neoxantina y violaxantina (Wright *et al*, 1991).

Se encuadra dentro de la fracción planctónica denominada nanoplancton. Es fácil de cultivar, resiste amplios márgenes de temperatura y salinidad, y posee un tamaño que permite su ingestión por las fases larvarias y juveniles de moluscos bivalvos. Constituye además un alimento adecuado para los microherbívoros adultos. Es, además, una posible fuente de ácidos grasos esenciales (Regan, 1988), minerales (Fábregas y Herrero, 1986) y vitaminas (Fábregas y Herrero, 1990).

Isochrysis galbana Parke

Este flagelado móvil se incluye en la clase *Prymnesiophyceae* (o *Haptophyceae*), debido a la presencia de un apéndice llamado "haptonema", además de dos flagelos.

Dentro de esta clase se incluye en el orden *Isochrysidales*, el cual incluye únicamente la familia *Isochrysidaceae*, con 4 géneros (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1993).

El haptonema consiste en tres membranas concéntricas que rodean a 6 ó 7 microtúbulos. La membrana externa está en continuidad con la membrana celular. Las membranas internas rodean una cavidad cilíndrica que conecta con una capa del retículo endoplasmático superficial. No hay raíces ni otras estructuras asociadas a los túbulos.

La familia *Isochrydaceae* comprende formas monadoides, libres o coloniales, móviles mediante dos flagelos lisos. El haptonema no es visible al microscopio óptico, observándose un haptonema rudimentario al microscopio electrónico. El género *Isochrysis*, con dos especies descritas, comprende células móviles solitarias, de forma alargada, con dos flagelos acronemáticos, iguales, con inserción apical o subapical, y un haptonema vestigial. La célula está recubierta por una o varias capas de escamas orgánicas circulares estriadas no mineralizadas. Poseen uno o dos cloroplastos, amarillo-oro, con pirenoide, y un estigma o pseudoestigma. El tamaño es de 3 - 6 μm . Presentan un aparato de Golgi, en el cual se forman las escamas de la cubierta celular, localizado entre el núcleo y las bases de los flagelos (Bold y Winne, 1985). Presentan reproducción vegetativa por división longitudinal en el estado móvil o inmóvil. En el estado palmeloide no presentan capas mucilaginosas. Forman quistes silíceos. Los pigmentos principales son: clorofilas *a*, *c*₁, *c*₂, diadinoxantina, diatoxantina, fucoxantina y β -caroteno (Brown *et al.*, 1993a; Flynn *et al.*, 1993).

I. galbana (5-6 x 2-4 μm , largo x ancho) contiene dos cloroplastos, un núcleo simple, un único cuerpo de Golgi y mitocondrias. Los cloroplastos tienen tres tilacoides por lámina, con interconexiones entre las láminas. A su alrededor hay 4 membranas con conexiones con el retículo endoplasmático. La división nuclear es precedida por la duplicación de los flagelos, cloroplastos y aparato de Golgi. Es muy abundante en el protoplancton oceánico. Las primnesiofíceas acumulan crisolaminarina (β -1,3-glucano) y aceites como sustancias de reserva (Bold y Winne, 1985).

I. galbana tiene un elevado valor como alimento en acuicultura, y es considerada de gran valor para el crecimiento de los estadios larvarios de los moluscos bivalvos. Se considera también una posible fuente para la producción de ácidos grasos esenciales (Regan, 1988) y vitaminas (Fábregas y Herrero, 1990). Se

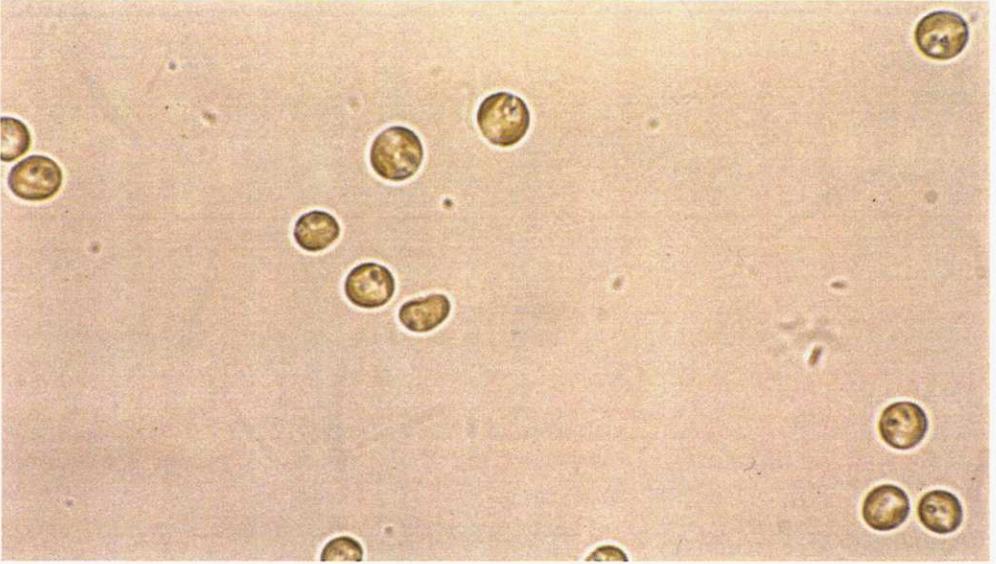


Foto 3.- *Isochrysis galbana* (Microscopio campo claro, 1100x)

han descrito formas de esta especie adaptadas a las aguas calientes, igualmente utilizadas en acuicultura, y conocidas como los clones T-ISO y C-ISO (Wikfors y Patterson, 1994).

Phaeodactylum tricornutum Bohlin

Pertenece al grupo de las *Chromophyta* dado que las células poseen cromatóforos pardo-amarillentos, no producen almidón y desarrollan una pared mineralizada. Por su división vegetativa longitudinal, valvas silíceas del tipo diatomea pennada, movimiento de deslizamiento, etc., se debe incluir en la clase *Bacillariophyceae*. Dentro de esta clase se clasifica en el orden *Pennales*, suborden *Naviculiineae*, familia *Cymbelaceae* (Ricard, 1987).

Los frústulos de las diatomeas pennales presentan un eje valvar apical dominante, una superficie valvar lanceolada o elíptica, y una hendidura longitudinal (*rafe*) o un área hialina longitudinal (*área axial*) de las que carecen las centrales. Presentan una ornamentación bilateral simétrica siguiendo el eje longitudinal marcado por el rafe. El *cingulum* presenta un desarrollo escaso. Los cloroplastos, en número reducido, son generalmente de un gran tamaño. Ciertas especies tienen una movilidad relativa ligada a la presencia del rafe. La reproducción sexual es anisogámica o isogámica, sin gametos flagelados. Abundantes en las aguas marinas

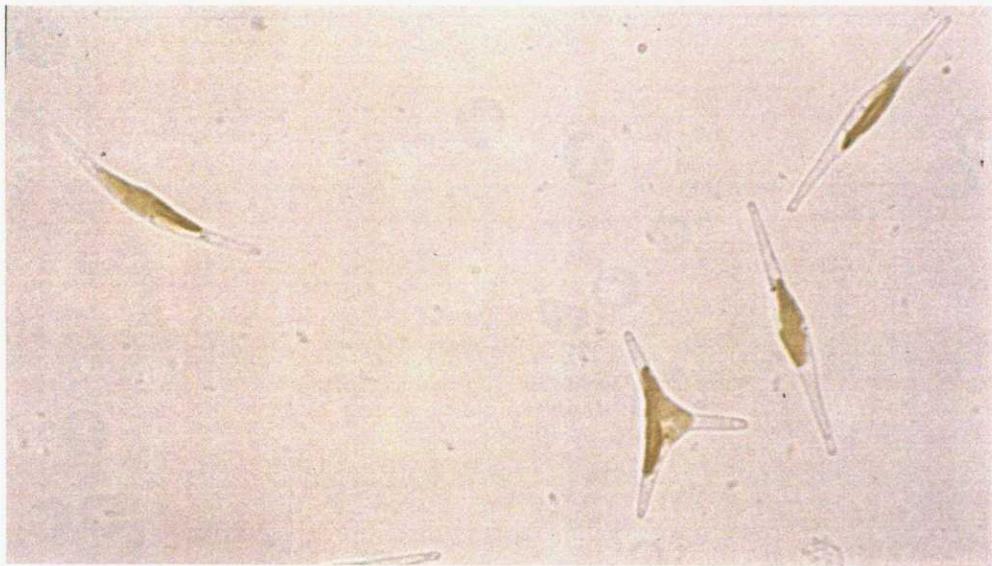


Foto 4.- *Phaeodactylum tricornutum* (Microscopio campo claro, 1100x)

y salobres, las diatomeas pennales constituyen la gran mayoría de las microalgas de la flora dulce y terrestre.

Las *Naviculiineae* presentan una rafe sobre cada valva, con un nódulo central, y carecen de *processus labial*. Este suborden es numéricamente el más importante de las diatomeas e incluye ocho familias. Comprende diatomeas habitualmente poco extendidas en el plancton. Las diatomeas de la familia *Cymbellaceae* presentan valvas asimétricas con respecto al eje apical, al transapical, o a ambos. Esta es la única diferencia con las *Naviculaceae*, y algunos autores las integran en una única familia.

El género *Phaeodactylum* comprende una única especie, *P. tricornutum*. Son células solitarias o coloniales, reunidas en cadenas. *P. tricornutum* es una especie muy polimorfa, que presenta tres formas bien diferenciadas, diversamente silicificadas: una forma trirradiada, una fusiforme y una forma oval, móvil. Las tres formas de *P. tricornutum* corresponden a una célula típica con una membrana orgánica, no silicificada, formada por una envoltura compuesta de dos partes, cuyos bordes se recubren parcialmente (Borowitzka *et al.*, 1977; Ricard, 1987). Sólo la forma oval presenta una valva rudimentaria, silicificada, presente sólo sobre un lado de la célula; las otras dos formas carecen de valvas. La valva de la forma móvil es arqueada, de elíptica a oval, con el eje axial ligeramente curvado; su estructura es visible únicamente al microscopio electrónico. Presenta un rafe subapical,

rectilíneo, con las terminaciones centrales en gancho y un área central elíptica. La valva, incompletamente desprovista de manto y *cingulum*, porta sobre la superficie finas puntuaciones distribuidas en estrías transapicales, ligeramente radiales en la parte central. Las células fusiformes y las células trirradiadas pueden formar colonias en forma de cinta unidas por la parte central de la cara valvar (Borowitzka *et al.*, 1977). Las formas trirradiadas aparecen normalmente en cultivo, mientras que las formas ovales y fusiformes se encuentran en la naturaleza en el plancton litoral de las aguas marinas y salobres de las zonas templadas.

El tamaño celular es de 8-12 μm de longitud por 2 μm de ancho. La célula contiene dos cloroplastos, un núcleo simple, mitocondrias y cuerpo de Golgi, retículo endoplasmático y ribosomas. Posee cuatro membranas alrededor del cloroplasto. La membrana de éste presenta tres tilacoides por lámina, con interconexiones entre las láminas y conexiones con el retículo endoplasmático. Las sustancias de reserva son crisolaminarina y aceite (Richmond, 1986b; Myklestad, 1988). Los pigmentos presentes en esta microalga son: clorofila *a*, clorofila *c*₁, clorofila *c*₂, caroteno, fucoxantina, neofucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina (Roy, 1988; Stauber y Jeffrey, 1988).

P. tricorutum se cultiva como fuente de alimento en acuicultura (De Pauw y Persoone, 1988), siendo además interesante su potencial como una fuente de ácido eicosapentaenoico. Es fácil de cultivar y valores extremos de pH alcalino y baja intensidad de luz no afectan a su crecimiento (Regan, 1988).

Tetraselmis suecica (Kylin) Butch

Tetraselmis suecica es un alga marina unicelular y móvil, que se clasificó en un principio dentro de la clase *Chlorophyceae*, pero actualmente se la sitúa dentro de la clase *Prasinophyceae*, orden *Chlorodendrales*, familia *Chlorodendraceae* (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1993).

Las *Prasinophyceae* son algas verdes primitivas consideradas descendientes directos del antecesor común de todas las algas verdes (Inouye, 1993). Las prasinofíceas presentan, a diferencia de las clorofíceas, pequeñas escamas orgánicas (de naturaleza polisacáridica) sobre los flagelos y el cuerpo celular, dispuestas en una o varias capas, formadas cada una por escamas de forma, tamaño y complejidad diferentes. Existe una considerable variación en la disposición de las escamas sobre las células de las prasinofíceas (Leadbeater y Green, 1993). Una característica particular de esta clase es la presencia de un tipo de escamas



Foto 5.- *Tetraselmis suecica* (Microscopio campo claro, 2000x)

flagelares particulares, en forma de seda y parcialmente tubulares, dispuestas a lo largo del flagelo en dos hileras prácticamente opuestas y agregadas a los dobletes 4 y 8 del axonema (Chrétiennot-Dinet, 1990). Otra característica son los corpúsculos basales de los flagelos, especialmente largos (600 a 900 nm).

En las *Chlorodendrales*, incluida *Tetraselmis*, los flagelos están recubiertos por capas de escamas, pero la célula está recubierta por una teca (células tunicadas). Escamas y teca se originan a partir de material ensamblado en el dictiosoma, siendo la teca probablemente el resultado de la fusión de escamas. La composición química de escamas y teca incluye ácidos 2-ceto azúcar (principalmente 2-ceto-3-desoxioctónico y galacturónico), probablemente entrelazados por iones Ca^{+2} (Leadbeater y Green, 1993). Las escamas del cuerpo celular se originan en las cisternas del dictiosoma durante la división celular y son transportadas a la membrana celular por pequeñas vesículas que se fusionan con ella cerca de las bases de los flagelos (Leadbeater y Green, 1993). Pueden ser almacenadas en un reservorio único, y antes de ser depositadas en el exterior del plasmalema se reagrupan por tipos similares (Chrétiennot-Dinet, 1990). El mecanismo por el cual las escamas dan lugar a la teca no es conocido. Característica de la familia *Chlorodendraceae* es que las escamas flagelares de la capa interna están recubiertas por pequeñas escamas bacilariformes dispuestas aparentemente en 24 hileras.

Las raíces flagelares son complejas formando un *rizoplasto* característico de esta clase. Además de los microtúbulos que unen la base de los flagelos a la superficie, una red denominada *sinistosoma* reúne las bases de los flagelos y hay a veces un grueso corpúsculo rodeado por el rizoplasto. Este orgánulo es contráctil y responde a la presencia de iones Ca^{+2} y ATP. Está unido a los corpúsculos basales de los flagelos en el polo anterior, y a la membrana plasmática o a otros orgánulos en el polo posterior. El núcleo está situado entre las ramas del rizoplasto y los lóbulos del cloroplasto (Chrétiennot-Dinet, 1990).

El cloroplasto es parietal y contiene generalmente un pirenoide. Los pigmentos principales son las clorofilas *a* y *b*. Las prasinofíceas contienen almidón, pero no sacarosa, y frecuentemente acumulan manitol. Las *Prasinophyceae* poseen típicamente una mancha ocular en el interior del cloroplasto constituida por una o varias capas de glóbulos pigmentados que no está asociada a los flagelos. El cloroplasto contiene gránulos de almidón generalmente envolviendo al pirenoide.

El género *Tetraselmis* comprende células verdes solitarias, libres, móviles, de forma ovoide o elipsoidal y aplanadas en sección transversal. Presentan 4 flagelos iguales e isodinámicos insertados en una depresión anterior, un núcleo central, un cloroplasto en copa, lobulado en la parte anterior, con un pirenoide basal rodeado de almidón, y generalmente un estigma. La reproducción ocurre por fisión longitudinal de las células, que adoptan el estado inmóvil; las células hijas pueden observarse completamente flageladas antes de su liberación de la teca parental. Aún cuando la reproducción sexual no está demostrada en las prasinofíceas, según estudios recientes hay indicios de una reproducción sexual en el género *Tetraselmis* (Huber y Lewin, 1986). A partir de los estudios de células en cultivo, además del estado móvil, se consideran dos estados inmóviles: un estado vegetativo, considerado como un "falso quiste" (frecuentemente obtenido en cultivos envejecidos) y el estado de "quiste verdadero", mucho menos común (Boldy Winne, 1985; Chrétiennot-Dinet, 1990). Los quistes verdaderos contienen 4 células y la pared es ornamentada. La formación de quistes ocurre bajo condiciones desfavorables, como deficiencia prolongada en nutrientes o pH extremos (Regan, 1988). Es común en aguas costeras y de estuarios, y soportan amplios márgenes de salinidad y temperatura.

Las células de *T. suecica* presentan un tamaño de 10-16 x 4-8 μm . La estructura de los flagelos es pancronemática, y los mastigonemas recubren el flagelo en toda su longitud, salvo en su parte terminal (Droop, 1969). En el cloroplasto, típico del género, aparece un pirenoide penetrado por invaginaciones citoplasmáticas constituidas por un brazo simple que se ramifica. El estigma, de

color rojizo y localizado a un lado de la célula, está constituido por dos capas de gránulos osmiofílicos separados por tilacoides simples hinchados, los cuales parecen carecer de contenido.

T. suecica es fácil de cultivar a gran escala en cultivo interior y actualmente es una microalga fundamental en la alimentación de rotíferos, *Artemia*, bivalvos y peces herbívoros (Flassch, 1977; De Pawn y Persoone, 1988), así como una posible fuente de minerales (Fábregas y Herrero, 1986) y vitaminas (Fábregas y Herrero, 1990).

CULTIVO

Diversos estudios han identificado los requerimientos nutritivos específicos de algunas microalgas, particularmente de minerales y vitaminas. Consecuentemente, se han desarrollado numerosos medios de cultivo, descritos en la bibliografía especializada (McLachlan, 1973; Vonshak, 1986; Becker, 1994), aunque su composición cualitativa suele ser similar. La relación N:P oscila entre 5:1 y 20:1 en peso. La mayoría de los medios descritos se preparan en soluciones "stock" concentradas de los nutrientes químicos y después se añaden al agua volúmenes determinados para dar la concentración adecuada en el medio de cultivo.

La composición del medio de cultivo que hemos utilizado es la siguiente (Fábregas *et al.*, 1984):

NaNO ₃	4.0 mM
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.2 mM
NaSiO ₃ ^(*)	0.5 mM
Citrato férrico	40.0 µM
ZnCl ₂	2.0 µM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2.0 µM
Na ₂ MoO ₄ ·5H ₂ O	2.0 µM
CoCl ₃	0.2 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.2 µM
Tiamina	70.0 µg l ⁻¹
Biotina	10.0 µg l ⁻¹
Vitamina B ₁₂	6.0 µg l ⁻¹
EDTA	92.8 µM
Tris - HCl (pH 7.4)	5.0 mM
agua de mar ^(**)	1000 ml

(*) adicionado sólo para el cultivo de *Chaetoceros*

(**) agua de mar natural filtrada a $0.45 \mu\text{m}$ y esterilizada a 120°C , 20 min.

Se esterilizan a 120°C durante 20 minutos, y se almacenan a 4°C en oscuridad.

Las condiciones de temperatura, iluminación, y salinidad, junto con la concentración de nutrientes, son factores fundamentales en la eficiencia del cultivo. Tras pruebas preliminares, se ha adoptado una temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ y una iluminación de $115 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (medida a la altura media del recipiente y en ambas direcciones), proporcionada por tubos fluorescentes Mazda Fluor C7-TF40, aplicada con ritmo nictimeral 12:12 h en una cámara de cultivo. Se mantiene la salinidad del agua de mar a partir de la cual se prepara el medio de cultivo (36‰), óptima para estas especies microalgales (Fábregas *et al.*, 1984, 1985a, 1986c).

Las cepas se mantienen en condiciones axénicas en tubos de cultivo de $25 \times 150 \text{ mm}$ con 40 ml de cultivo, no aireados. Los cultivos "stock" se realizan en botellas de 1 litro con 800 ml de medio de cultivo, en los que se inyecta aire filtrado a $0.20 \mu\text{m}$ mediante filtros Millipore FG. El diseño del tapón, de goma y atravesado por tres varillas de vidrio de 6 mm de diámetro, permite la entrada/salida de aire y toma de muestras sin necesidad de la apertura del recipiente de cultivo. Recipientes, tapones, filtros de aire y conducciones de silicona son esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El inóculo para cada experiencia se toma a partir de los cultivos "stock".

La agitación de los cultivos se realiza mediante burbujeo de aire, inyectado con un turbosoplante y filtrado a $0.20 \mu\text{m}$ mediante filtros Millipore FG antes de la entrada en el cultivo. Esta agitación constante impide que las células sedimenten y permite que las células estén expuestas a la misma intensidad lumínica media, evitando asimismo la formación de gradientes de nutrientes minerales o gaseosos, obteniéndose un crecimiento más uniforme (Raven, 1988; Laing y Ayala, 1990). La aireación proporciona, además, un aporte de CO_2 (0.033% en aire) el cual actúa como fuente de carbono y colabora en el tamponamiento del medio de cultivo.

DETERMINACIONES SOBRE LAS MICROALGAS EN CULTIVO

DENSIDAD CELULAR

La densidad celular se determina por recuento de una alícuota del cultivo convenientemente diluida en un contador de partículas Coulter Counter mod. DN, posteriormente sustituido por un modelo ZM, o en una cámara de recuento hematológica Neubauer.

En cultivos discontinuos ("batch"), la cinética de crecimiento de las poblaciones microalgales se ajusta a una curva logística, que puede ser ajustada óptimamente mediante regresión polinómica (Schanz y Zahler, 1981). Así, los datos diarios de densidad celular presentados en gráficas se ajustan a una regresión polinómica por el método de mínimos cuadrados, utilizando el programa informático Sigma-Plot 3.10 (Jandel Corporation). Las ecuaciones resultantes son del tipo:

$$f(t) = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_5 t^5$$

donde $f(t)$ es la densidad celular (células/ml $\times 10^6$), t es el tiempo en días, y $a_0, a_1, a_2, \dots, a_5$ son los coeficientes de la ecuación.

Parámetros de crecimiento

El *período de crecimiento máximo* (PCM) se corresponde con la duración en días de la fase exponencial del ciclo de crecimiento.

La *tasa de crecimiento* (k) (doblajes celulares por día) se corresponde con el inverso del tiempo de duplicación (td), tiempo necesario para que N células se transformen en $2N$ células durante la fase de crecimiento exponencial. k se calcula mediante la expresión:

$$k = (\log_2 (N_t) - \log_2 (N_o)) / (t_t - t_o)$$

donde N_t y N_o son las densidades celulares (células. ml^{-1}) a los tiempos t_o y t_t , respectivamente. Para el cálculo de la tasa de crecimiento media (k_{med}), t_o y t_t son el primer y último día de la fase logarítmica, respectivamente.

pH

Para la determinación del pH se toma una muestra del cultivo y se mide el pH con un pH-metro Orion con compensación automática de temperatura, previamente calibrado frente a tampones pH 4.00 y pH 7.00.

MATERIA SECA Y CENIZAS

Para la determinación del peso seco, se ha seguido el protocolo de Vonshak (1986) modificado. Se recogen volúmenes conocidos de las suspensiones celulares en tubos previamente tarados. Las células se recogen por centrifugación a 2500 g y 4°C durante 10 min.; posteriormente, el sedimento celular se resuspende en amonio formiato 0.9 % (P/V) para retirar las sales, centrifugando de nuevo. Las muestras se secan a 60°C, 24 h, y se dejan enfriar a temperatura ambiente en un desecador antes de la pesada.

Para la determinación de las cenizas, se toma una cantidad conocida de biomasa seca en pocillos de porcelana previamente tarados, sometiéndose posteriormente a incineración en horno Mufla a 550°C durante 5 horas. Posteriormente, se deja enfriar el horno hasta 110°C, se retiran los pocillos y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador, procediendo a su pesada. Este procedimiento permite determinar el porcentaje de cenizas en la materia seca.

Todas las determinaciones de peso se realizan por duplicado, utilizando balanzas Bosh y AND con límite de precisión de ± 0.1 mg.

PIGMENTOS

Las células se recogen por filtración de alícuotas conocidas a través de filtros Whatman GF/C. Los pigmentos se extraen en acetona 90%, durante 24 horas a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, manteniendo la oscuridad se dejan calentar a temperatura ambiente, y tras una filtración del extracto por un filtro de fluoroporo Millipore de 0.20 μm , se realizan lecturas a las longitudes de onda 664, 647, 630 y 480 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A frente a un blanco de acetona 90%. Todas las determinaciones se realizan por triplicado. También se ha empleado la recogida de células por centrifugación, seguida de la resuspensión en el solvente, enfriado a 4°C y ruptura por ultrasonidos (30 seg) en baño de hielo y oscuridad. Este último método permite una extracción más rápida, alcanzando niveles equivalentes

de extracción en 4 h. El extracto debe ser igualmente clarificado, bien por centrifugación o por filtración, y su volumen recalibrado.

El valor de los coeficientes y la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción varían en función del solvente empleado (Parsons y Strickland, 1965; Goodwin y Britton, 1988). De los propuestos hasta ahora, hemos adoptado los de Jeffrey y Humphrey (1975) para clorofilas, y los de Strickland y Parsons (1972) para carotenos totales, ambos usando acetona 90% como solvente. Las ecuaciones empleadas para el cálculo de las concentraciones de pigmentos en el extracto son:

Clorofilas (Jeffrey y Humphrey, 1975; solvente: acetona 90%):

microalgas con clorofilas *a* y *b*:

$$\text{clorofila } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{clorofila } b = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

microalgas con clorofilas *a* y *c* ($c_1 + c_2$):

$$\text{clorofila } a = 11.47 A_{664} - 0.40 A_{630}$$

$$\text{clorofila } c = 24.36 A_{630} - 3.73 A_{664}$$

Carotenos (Strickland y Parsons, 1972; solvente: acetona 90%):

$$\text{clorofíceas: carotenos} = 4.0 A_{480}$$

$$\text{crisofíceas y diatomeas: carotenos} = 10.0 A_{480}$$

donde las clorofilas *a*, *b* y *c*, y carotenos representan concentraciones en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de extracto, y A_{664} , A_{647} , A_{630} y A_{480} representan las absorbancias ($\text{DO} = \log I_0 / I$) medidas a 664, 647, 630 y 480 nm, respectivamente. Si los valores se multiplican por el volumen de extracto y se dividen por el número total de células presentes en dicho volumen, se obtiene el contenido celular (pg) de pigmentos.

PROTEÍNAS

Para la cuantificación de la proteína total, se ha elegido el método de Bradford (1976) de unión al colorante. El ensayo se basa en el cambio de color diferencial del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. El máximo de absorbancia para una solución ácida de azul brillante de Coomassie G-250 cambia de 465 nm a 595 nm cuando se produce el enlace a la proteína. Cuando el colorante se une a la proteína, la forma roja se

transforma en azul. El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción, lo cual proporciona sensibilidad al ensayo.

El reactivo se prepara disolviendo 100 µg de azul brillante Coomassie en 50 ml de etanol al 95%; a esta solución se le adiciona 100 ml de H_2PO_4 al 85% (P/V), llevando a un volumen final de un litro con agua destilada. También puede utilizarse el reactivo preparado comercialmente por Bio-Rad.

La técnica general utilizada consiste en recoger un número suficiente y conocido de células por centrifugación. Las células se resuspenden en agua destilada y se rompen mediante ultrasonidos, preparándose distintas diluciones del extracto así obtenido. Para la cuantificación de la proteína se sigue el micrométodo descrito en el "Bio-Rad Protein Assay Instruction Manual". Se preparan diluciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) y un blanco de agua destilada. A continuación se reparten por triplicado 0.8 ml de cada una de las diluciones de BSA, blanco y muestra problema; se añade 0.2 ml del reactivo comercial azul Coomassie (BIO-RAD), mezclando inmediatamente por agitación suave. Las medidas se realizan en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A a 595 nm.

El desarrollo de color se completa a los 2 min. Después de 60 min., la agregación de complejos proteína-colorante da lugar a la precipitación de proteína y colorante, decreciendo la densidad óptica de la solución. Para determinaciones muy precisas, se recomienda leer las muestras entre los 5 y 20 min. después de adicionar el reactivo.

CARBOHIDRATOS

Todos los métodos propuestos para la determinación de carbohidratos totales son colorimétricos y derivan del test de Molisch para carbohidratos; implican el calentamiento del material con ácido sulfúrico concentrado y un desarrollante de color que es usualmente una amina aromática o un fenol (Herbert *et al.*, 1971).

El método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) continúa siendo el más utilizado y apenas ha sido modificado. El fenol es un alcohol muy reactivo, que reacciona con los glúcidos dando lugar a un complejo coloreado (de amarillo a marrón según la concentración de glúcidos). Esta reacción coloreada es lineal a la longitud de onda 485 nm. Dicha reacción consume una elevada cantidad de energía, la cual es proporcionada por la reacción entre el ácido sulfúrico y el agua.

El extracto obtenido por centrifugación de células, resuspensión en agua destilada y rotura por ultrasonidos, se diluye convenientemente y se reparte 1 ml (por triplicado) en tubos de cristal reforzado. Al mismo tiempo se prepara un blanco con 1 ml de agua destilada y una serie de patrones de glucosa. A los tubos se les añade 0.5 ml de fenol al 4%, agitándose a continuación. Inmediatamente se adicionan 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado ($P_e = 1.84$), dirigiendo la caída del ácido hacia la superficie del líquido. Se deja enfriar 30 minutos a temperatura ambiente, agitando las muestras dentro de este intervalo, y se lee la absorbancia a 485 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.

Mediante este ensayo se cuantifican las hexosas, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y derivados metilados que posean un grupo reductor libre o potencialmente libre. Las pentosas y metilpentosas también reaccionan, pero la glucosamina y galactosamina son inertes (Kochert, 1978a).

LÍPIDOS

Para su posterior determinación, los lípidos se extraen por el procedimiento de Bligh y Dyer (1959), según Holland y Gabbot (1971). Las células microalgales se recogen por centrifugación y se resuspenden en metanol:cloroformo 2:1 V/V. Se sonica durante 60 seg, y tras agitar 30 seg, se protegen de la luz los extractos dejándolos reposar 20 min. a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se centrifuga 5 min a 800 g, recogiendo el sobrenadante. A éste se adicionan cloroformo y agua destilada para una relación final de solventes metanol:cloroformo:agua 2:2:1 (V/V), se agita hasta obtener una solución homogénea y se centrifuga nuevamente. Con este segundo fraccionamiento se eliminan los contaminantes no lipídicos no eliminados en la primera extracción. Se retira la fase acuosa superior y a la fase orgánica inferior se le añade acetona para ayudar a eliminar las trazas de agua. Los solventes se retiran de las muestras de lípidos por evaporación a 40-50°C bajo vacío o en atmósfera de N_2 .

Los extractos se almacenan a -20°C en 300 μ l de cloroformo conteniendo butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, en el caso de no ser analizados inmediatamente.

Para la determinación de lípidos se ha seguido un ensayo de carbonización cuantitativo (Marsh y Weinstein, 1966). La conversión de los lípidos a carbón se realiza mediante el efecto combinado de altas temperaturas y ácido sulfúrico. Como estándar suele usarse la tripalmitina (Holland y Gabbot, 1971; Kochert, 1978b), de

la cual se preparan patrones conocidos, y un blanco (cloroformo), que se tratan de la misma forma que los problemas. Al residuo lipídico evaporado se le adiciona 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, pasándose las muestras a 200°C durante 15 min (la temperatura dentro de los tubos no debe variar más de $\pm 2^\circ\text{C}$ durante el período de carbonización). A continuación se colocan las muestras en agua a temperatura ambiente 15 seg y luego en un baño de hielo durante 5 min. Se añaden 3 ml de agua destilada a cada tubo y se mezcla, pasándose de nuevo a baño de hielo. Cuando han enfriado, se sacan del hielo y se espera 10 min o el tiempo necesario hasta que desaparezcan las burbujas. La D.O. se lee a 375 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

Una vez completada la carbonización, las medidas de densidad óptica pueden efectuarse en cualquier momento en las dos horas siguientes, ya que en este tiempo hay sólo una disminución del 2.3% de la absorbancia. Después de 2-3 horas, los tubos con más de 120 μg de lípidos muestran frecuentemente floculación de partículas de carbono (Marsh y Weinstein, 1966).

La estimación de la concentración lipídica tiene una reproductibilidad de $\pm 1\%$, ya que existe una relación entre la densidad óptica de los lípidos carbonizados y la concentración inicial de lípidos entre 30 y 150 μg de lípidos.

ACIDOS RIBONUCLEICOS

Extracción de compuestos de bajo peso molecular

El método usual consiste en la precipitación de los ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas de alto peso molecular con ácido, en general tricloroacético o perclórico, en frío (Kochert, 1978b). El tricloroacético tiene la desventaja de que absorbe la luz ultravioleta y puede interferir en las determinaciones por este método.

La técnica utilizada consiste en recoger un número suficiente de células por centrifugación. Los tubos con las células se colocan en hielo y se le añaden 10 ml de perclórico 0.2 N frío, resuspendiéndolas. Después de 15 minutos a 4°C, se centrifugan las muestras en una centrífuga refrigerada, se desecha el sobrenadante y se repite la extracción. Los sobrenadantes contienen fosfato inorgánico, nucleótidos, aminoácidos, azúcares y una gran variedad de otros compuestos de bajo peso molecular. El sedimento contiene los compuestos macromoleculares.

Determinación de ARN por estimación de la ribosa

Entre los procedimientos colorimétricos apropiados para la determinación de pentosas para la cuantificación de ARN se incluye la reacción con orcinol (Lin y Schjeide, 1969; Kochert, 1978b). Este método se basa en la conversión de la pentosa en presencia de ácido caliente en furfural, que reacciona con el orcinol dando color verde. Como catalizador se utiliza FeCl_3 ó CuCl_2 . El desarrollo del color se completa después de 30 minutos a 100°C .

El extracto libre de compuestos de bajo peso molecular se trata con 2 ml de KOH 0.3 N y se incuba 18 - 24 horas a 30°C . Después de este período de hidrólisis alcalina, se enfría la muestra en hielo y se acidifica la solución a pH 1 con perclórico concentrado. Se centrifuga y se toma el sobrenadante. El precipitado se lava con 1 ml de perclórico 0.2 N frío, se centrifuga de nuevo y se juntan los sobrenadantes.

Se pipetea 0.1, 0.2 y 0.5 ml de la solución de ARN problema en tubos de ensayo y se completa a 2 ml con agua destilada. Se incluye un blanco de agua destilada y una serie de standards de ARN de levadura. A cada uno de los tubos se le adiciona 2 ml del reactivo orcinol. El reactivo se prepara disolviendo 0.15 gr de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de HCl concentrado (solución A) y 12.5 gr de orcinol en 25 ml de etanol al 95% (solución B); antes de cada determinación se toman 2 ml de B por cada 100 ml de A, con lo que se obtiene la solución de trabajo.

Los tubos se tapan y se colocan en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. A continuación se enfrían y se lee la absorbancia a 665 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Obtención y conservación de la biomasa

Un volumen de cultivo se centrifuga a 8000 g a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente el sedimento se resuspende en amonio formiato 0.9 % (P/V) y es nuevamente centrifugado. El sedimento se congela a -20°C y se liofiliza. El proceso de liofilización se lleva a cabo en un liofilizador Labcondo Lyph-Lock 6 durante 36 h. La biomasa obtenida se mantiene en un desecador hasta el momento de los análisis.

Análisis de ácidos grasos

El análisis de ácidos grasos se realiza mediante cromatografía de gases capilar. Para la preparación de los derivados metil-éster de los ácidos grasos se sigue la técnica de Lepagey Roy (1984), que incluye 4 fases fundamentales: saponificación de la muestra, metilación de los ácidos grasos, extracción a partir de la fase acuosa y lavado final.

La primera fase consiste en la saponificación de los lípidos de la muestra, hidrolizando los ácidos grasos de los ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos, convirtiéndolos en jabones solubles en agua. Una cantidad conocida de muestra liofilizada es saponificada con 2 ml de una solución 1.2 N de NaOH en metanol acuoso al 50%, en tubo de tapón de rosca, calentando a 90-100°C durante 30 min. Tras enfriar a temperatura ambiente, el saponificado se acidifica con HCl 6N a pH inferior a 2. Para facilitar el análisis por cromatografía de gases es necesario derivatizar las fracciones lipídicas. A esta solución se añade 1 ml de BF₃ al 14% en metanol para catalizar la metilación, y se calienta durante 5 min. a 85°C. La siguiente fase consiste en la extracción de los ésteres metílicos a partir de la solución acuosa con 1ml de hexano:dietiléter (1:1). Tras una agitación suave durante 3 min., se permite la separación de las fases, descartándose la fase inferior acuosa. Por último, el extracto orgánico se lava con NaOH 0.3 N (3 ml). Tras mezclar suavemente 1 min., se permite de nuevo la separación de las fases. El extracto orgánico (fase superior) se transfiere posteriormente a un vial de muestras.

El análisis se realiza en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 8310 con detector de ionización de llama (FID), acoplado a una impresora de gráficos Perkin Elmer GP-100. Como gas portador se utiliza nitrógeno a una velocidad lineal de 17 cm.s⁻¹, con la válvula del "split" abierta a una proporción de 90:1. La columna capilar empleada, SP-2330 de Supelco, contiene como fase estacionaria cianosilicona.

A la muestra problema se adiciona como estándar interno C17:0 a una concentración conocida, lo que permitirá deducir la concentración de ácidos grasos en la muestra problema, así como identificar los metil ésteres de ácidos grasos por comparación de los tiempos de retención relativos con aquellos de patrones cuantitativos y cualitativos. Como patrones cuantitativos se emplean la mezcla de la A.O.C.S. LERO (Low Erucic Rapessed Oil) así como mezclas fabricadas por nosotros a partir de metil ésteres de ácidos grasos individuales, obtenidos de SIGMA Química. Como patrón cualitativo se emplea la mezcla de metil ésteres de ácidos

grasos PUFA-3 de Matreya Inc., completada con el éster metílico del ácido margárico.

A partir de los patrones cuantitativos se obtuvieron los factores de respuesta del detector para cada compuesto, empleados posteriormente junto con los datos del estándar interno para el cálculo normalizado del porcentaje y cantidad absoluta de cada compuesto.

La composición del patrón cualitativo PUFA-3 y de una muestra de cada especie fue verificada mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-EM) en el Servicio de Espectrometría de la Univ. de Santiago, empleando un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890A acoplado a un espectrómetro de masas HP5972. Las condiciones cromatográficas son las mismas descritas anteriormente, empleándose helio como gas portador a 80 kPa, velocidad lineal de 34.7 cm.s⁻¹. Las condiciones de operación del espectrómetro de masas son: multiplicador electrónico 1500 V, rango de masas 50 - 500 Da.

DETERMINACIÓN DE LA TASA DE FOTOSÍNTESIS

La tasa de fotosíntesis se determinó utilizando la técnica de asimilación de ¹⁴C-bicarbonato como medida indirecta del proceso de fotosíntesis. Se toma una alícuota del cultivo de 50 ml y se le adiciona 10 µl de ¹⁴CO₃HNa (54 mCi.mmol⁻¹, 2.0 mCi.ml⁻¹, Amersham International). El ¹⁴C-bicarbonato se adiciona en fase de oscuridad, 30 min antes de iniciarse la fase de luz, comenzándose la recogida de muestras a tiempo 0 de la fase de luz. Los cultivos se incuban durante 10 horas, y, para determinar la cinética de incorporación, se recoge muestra de cada uno de ellos a intervalos de tiempo predeterminados, durante la fase de luz. Para ello 1-2 ml de cultivo se filtran a través de filtros de fibra de vidrio tipo C utilizando un sistema multifiltro Millipore, acoplado a una bomba de vacío. Los filtros se lavan con 10 ml de agua de mar acidulada con HCl (0.01 N), con el fin de parar la reacción de incorporación del bicarbonato a la célula y eliminar el isótopo que pudiera quedar retenido en los filtros. Los filtros se transfieren a viales de centelleo plásticos de 20 ml de capacidad, añadiéndose 10 ml de líquido de centelleo Insta-gel II de Packard. En el momento de añadir el isótopo, al inicio de la fase de luz y cada dos horas se toman 50 µl de cultivo para un recuento de la radioactividad total. Las muestras se cuentan durante 60 segundos en un contador de centelleo líquido LKB Pharmacia.

A partir de las desintegraciones por minuto (dpm) se calcula la fijación de C por volumen de cultivo ($\mu\text{g C}\cdot\text{ml}^{-1}$), y la tasa de asimilación de C específica de clorofila α (moles de C asimilado por mol de clorofila α y hora).

DETERMINACIÓN DE LA AUTOFLUORESCENCIA Y pH INTRACELULAR

La citometría de flujo (CMF) permite determinar un elevado número de funciones celulares a gran velocidad, utilizando una amplia variedad de moléculas bioquímicamente específicas, no tóxicas y fluorescentes, en condiciones muy cercanas al estado *in vivo*, en exposiciones cortas a niveles de luz muy elevados. Se analizan dos parámetros mediante citometría de flujo: la fluorescencia de la clorofila α y el pH intracelular. El equipo de citometría utilizado ha sido un FACScan (Becton Dickinson Instruments), con el programa de análisis LYSIS II (Becton Dickinson). La fuente de luz que utiliza este citómetro es un láser de ion argón, que emite luz azul (488 nm).

Los microorganismos marinos unicelulares presentan generalmente una fluorescencia natural muy fuerte procedente de la clorofila y sus derivados o de otros pigmentos como las ficobiliproteínas o xantofilas. De este modo, la determinación de los parámetros funcionales de estos microorganismos consiste en la determinación de la fluorescencia de la clorofila α (aproximadamente a 645 nm), simultáneamente con las fluorescencias de las tinciones funcionales por debajo de 600 nm.

Xu *et al.* (1990) han observado que la fluorescencia de la clorofila α detectada en un citómetro de flujo con un solo láser de excitación a 488 nm se corresponde con la fluorescencia máxima cuando los centros de reacción del fotosistema II (PS II) están cerrados en el estado Q_A^- ; este estado se alcanza en condiciones de elevada intensidad de luz. Por tanto, la fluorescencia de la clorofila α se estudia directamente a partir de las células en suspensión, sin utilizar ningún fluorocromo.

Las medidas del pH intracelular pueden llevarse a cabo mediante a) la utilización de sondas químicas, b) con microelectrodos H^+ -selectivos, o bien c) por espectroscopía de resonancia magnética nuclear con ^{31}P , dado que la frecuencia relativa de los compuestos de ^{31}P es pH-dependiente (Kurkdjian y Guern, 1989).

La utilización de sondas químicas para la medida del pH intracelular se basa en la difusión diferencial a través de las membranas de las moléculas-sonda

fluorescentes o marcadas radiactivamente. Estas sondas se disocian fuera y dentro de la célula de acuerdo con el pH del compartimento y se establece un equilibrio de difusión entre las células y el medio. La concentración intra- y extracelular de la sonda se mide una vez alcanzado el equilibrio.

En los últimos años, han aparecido sondas fluorescentes cuya emisión fluorescente varía según el pH intracelular. La mayoría de las sondas fluorescentes o fluorocromos más utilizados para la medida del pH intracelular son derivados de la fluoresceína. El espectro de la fluoresceína es pH-dependiente; los picos de emisión y absorción disminuyen considerablemente con los pH ácidos. Sin embargo, la longitud de onda y la forma de los picos de emisión de todos los derivados de la fluoresceína son relativamente independientes del pH (Haugland, 1992).

Para la determinación del pH intracelular se ha utilizado una técnica de citometría de flujo basada en la diferente intensidad de emisión fluorescente de la fluoresceína (Vissier *et al.*, 1979), modificada para las células microalgales (Cid *et al.*, 1995). El fluorocromo utilizado es la diclorofluoresceína (DCF), cuya emisión fluorescente se recoge en el espectro de la fluorescencia verde (entre 510 y 540 nm).

El protocolo utilizado es el siguiente:

- 1) Se filtra una alícuota de cultivo a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C).
- 2) A partir del cultivo inicial, se prepara una suspensión celular a 10^6 células. ml^{-1} , utilizándose el filtrado obtenido en la paso 1 para realizar la dilución.
- 2) A 1 ml de esta suspensión celular se le añaden 10 μl de DCF $0.487 \mu\text{g ml}^{-1}$.
- 3) Se incuba la muestra durante 15 min, en oscuridad y a temperatura ambiente.
- 4) Se analiza la muestra en el citómetro de flujo, seleccionando para el análisis del pHi aquellas células que presentan emisión roja (clorofila *a*).

Para el análisis de la autofluorescencia celular se realizan los pasos 1, 2 y 4.

ANÁLISIS SOBRE SEMILLA DE MEJILLÓN

Crecimiento

El crecimiento en longitud de la concha se midió mediante un calibre (± 0.1 mm). El volumen de cada mejillón entero se determinó a partir del peso del volumen de agua destilada desplazado, mediante una balanza BOSH (± 0.1 mg).

Análisis bioquímico

La vianda de los mejillones fue separada de la concha y liofilizada en las condiciones descritas anteriormente. El peso seco de la vianda se estima a partir del peso del material liofilizado. El peso seco libre de cenizas (PSLC) se calcula a partir del porcentaje de cenizas determinado por incineración a 540°C en un horno Mufla durante 5 h (A.O.A.C., 1965), tal como se describe para las muestras de microalgas.

El análisis bioquímico de proteína, carbohidratos y lípidos se realiza a partir del material liofilado. Los carbohidratos se analizan mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) tal como se describe para la biomasa microalgal, tras resuspender la biomasa en NaOH 1N y calentar a 100°C durante 30 min (Kochert, 1978a). Los lípidos se extraen y cuantifican según el método descrito para las muestras de microalgas.

El contenido en proteína de la biomasa seca se determinó como el contenido en N de la biomasa liofilizada multiplicado por 6.25. El análisis se realiza en los Servicios Centrales de la Universidad de A Coruña, en un analizador elemental Carlo Erba CHNS-O EA 1108 acoplado a un detector de conductividad térmica (DCT), un introductor de muestras automático Autosampler AS 200, y con una unidad de procesado EAGER 200. El método analítico se basa en la oxidación completa de la muestra mediante combustión instantánea. Los gases resultantes de la combustión son transportados mediante un gas portador (He) a través de un horno de reducción y de una columna cromatográfica. El aparato se calibra previamente mediante el análisis de compuestos estándar (sulfanilamida) utilizando el método de factores K.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cuando se utilizan diseños experimentales bifactoriales, p. ej. fuente de N x tamponamiento del medio, o cuando son aplicables, p. ej. fuente de N x fase de crecimiento, los datos de densidades celulares en el momento de cosecha, tasas de crecimiento y contenidos celulares de cada fracción bioquímica, se examinan mediante un análisis de varianza de n-vías (ANOVA) para el análisis de efectos principales e interacción, una vez comprobado que se cumplen las condiciones del análisis de varianza.

Cuando no existe interacción significativa entre ambos factores y existen diferencias significativas entre las medias de los niveles de los factores A o B, se emplea el test de Duncan de rango múltiple para la comparación de los niveles de cada uno de los factores (Milton y Tsokos, 1983).

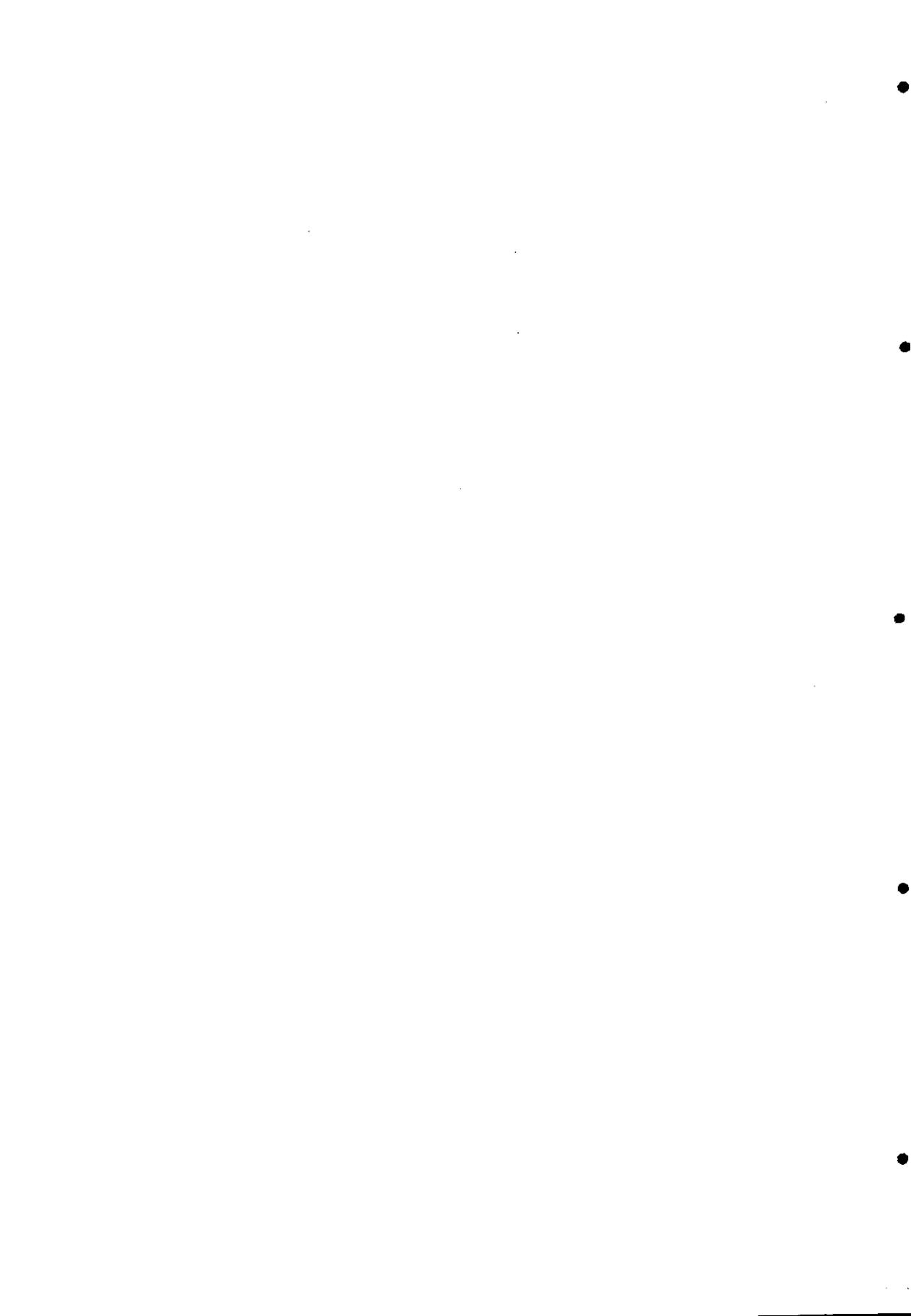
Cuando existe interacción significativa y además se rechaza la hipótesis nula de no diferencia entre medias de combinaciones de tratamientos (fuente de N - fase de crecimiento), cada combinación particular de ambos factores se debe comparar con las demás mediante el test de Duncan de rango múltiple (Milton y Tsokos, 1983).

El efecto de la fuente de N sobre la tasa de crecimiento y rendimientos por volumen de cultivo se analiza mediante un ANOVA unifactorial, aplicándose el test de rango múltiple de Duncan cuando se detectan diferencias significativas entre las medias.

El test de Duncan se aplica en todos los casos al nivel de significación $\alpha = 0.05$. Para el tratamiento estadístico de los datos analíticos (ANOVAs, test de Duncan, correlación y regresión) se utilizó la aplicación estadística SPSS/PC+ ver. 4.10 (SPSS Inc.).

En las experiencias con semilla de mejillón, las rectas obtenidas mediante regresión lineal para el crecimiento en longitud o volumen para cada dieta se comparan mediante el análisis de la covarianza (ANCOVA) para la comparación de rectas de regresión descrito por Snedecor y Cochran (1989).

Resultados



CULTIVO MASIVO DE MICROALGAS MARINAS CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

Diseño experimental

Se ensayó la utilización de diferentes fuentes de N en cinco especies de microalgas marinas, manteniendo las condiciones experimentales citadas en "Materiales y Métodos", y variando la especie química aportada al medio de cultivo.

Con cada especie microalgal se establecen 4 series de cultivos, cada una con una fuente de nitrógeno diferente. Las experiencias se realizan por duplicado. Las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron: nitrato, en forma de sal sódica, NaNO_3 ; nitrito, en forma de sal sódica NaNO_2 ; amonio, en forma de sulfato $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y urea $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, como fuente de nitrógeno orgánico. En *Chaetoceros calcitrans* se ensayó además el carbonato amónico, NH_4HCO_3 . La concentración utilizada de cada uno de estos compuestos es $4 \text{ mg átomo N}^{-1}$, concentración que proporciona la producción más rentable de biomasa (Fábregas et al., 1985b, 1986a,b). Los restantes nutrientes que componen el medio de cultivo corresponden a los que se citan en el apartado de "Cultivo", con una concentración de Tris-HCl pH 7.4 2 mM .

Las condiciones de iluminación, temperatura y salinidad corresponden a las de los cultivos "stock" (apartado "Cultivo" en "Materiales y Métodos"). Para estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno, se mantienen constantes el resto de los parámetros de cultivo, ya que la variación de más de un parámetro produce interrelaciones en la respuesta de una microalga (Ahlgren, 1980).

Los inóculos se toman a partir de un único cultivo "stock" en fase exponencial tardía para minimizar la presencia de nitrógeno residual, adicionando el volumen necesario para obtener las siguientes densidades celulares iniciales: $2.5 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ para *C. calcitrans* e *I. galbana*, $0.625 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ para *D. tertiolecta*, $1.5 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ para *P. tricornutum*, y $0.5 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ para *T. suecica*. Estas densidades representan aproximadamente la misma biomasa inicial expresada como materia seca. Una densidad inicial de $0.5 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ ha demostrado ser óptima para establecer cultivos masivos de *T. suecica* (Fábregas et al., 1985b).

El desarrollo de los cultivos se sigue hasta que éstos alcanzan la fase de crecimiento estacionaria, midiéndose diariamente la densidad celular y pH. Para todas las especies se analizó la composición bioquímica durante la fase logarítmica (fase log) del ciclo de crecimiento y al comienzo de la fase estacionaria (fase est-1),

analizándose también una fase estacionaria avanzada (fase est-2) en los cultivos de *C. calcitrans*, *I. galbana* y *T. suecica*. La toma de muestras se realiza en el período de luz y a las 3-4 horas del inicio de la fase de luz. El fotoperíodo de 12:12 h permite mantener una sincronización en la división celular, indispensable para conocer el estado fisiológico de un microorganismo.

Con *C. calcitrans*, *I. galbana* y *T. suecica*, las experiencias se realizaron dos veces para comprobar la reproducibilidad de los resultados. Esta fue excelente para el crecimiento y composición bioquímica bruta de *T. suecica* e *I. galbana*, así como para el crecimiento de *C. calcitrans*, único parámetro analizado en una de las experiencias para esta especie.

Chaetoceros calcitrans (BACILLARIOPHYCEAE)

Crecimiento

El crecimiento difiere en función de la fuente de N suministrada al medio de cultivo. En la fig. 1 se representan las curvas de crecimiento correspondientes a cada fuente de N, ajustadas mediante regresión polinómica, excepto para la urea en la que no se observó crecimiento. El inóculo procede de un cultivo creciendo en

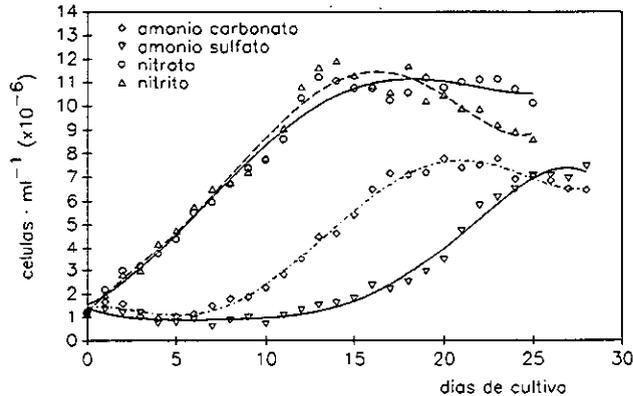


Fig. 1. Crecimiento de *Chaetoceros calcitrans* cultivada con diferentes fuentes de N.

nitrato, y los cultivos con nitrato o nitrito como fuente de N entran inmediatamente en crecimiento exponencial. Por el contrario, los cultivos con ambas fuentes de amonio precisan de una fase de latencia previa antes de entrar en crecimiento logarítmico. La duración de esta fase de adaptación fue de 5-6 días para los cultivos con carbonato amónico, y de 15 días para los cultivos con sulfato amónico. La duración de la fase de adaptación se ha mostrado variable entre diferentes experimentos, pero siempre manteniéndose constante un retardo de 4-5 días de los cultivos con sulfato amónico en el comienzo de la fase logarítmica con respecto a aquellos con carbonato amónico.

Comenzado el crecimiento exponencial, los cultivos con amonio crecen con tasas superiores a aquellos con nitrato o nitrito: 0.41-0.52 doblajes.día⁻¹ frente a 0.36-0.39 (Tabla I), manteniendo así mismo tasas de crecimiento medias más elevadas: 0.26-0.27 frente a 0.19-0.20 doblajes.d⁻¹. El período de crecimiento máximo es de 12-14 días (Tabla I).

Las densidades celulares alcanzadas al comienzo de la fase estacionaria (fase est-1) y en fase estacionaria avanzada (fase est-2) varían tanto en función de la

Tabla I. Tasa de crecimiento (k), duración de la fase logarítmica (PCM), densidad celular máxima en fase estacionaria y pH final en cultivos de *Chaetoceros calcitrans* con diferentes fuentes de N.

	nitrato	nitrito	amonio carbonato	amonio sulfato
k_{media} (d^{-1})	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01
$k_{\text{máxima}}$ (d^{-1})	0.36	0.39	0.52	0.41
PCM (días)	14	14	12	13
células. ml^{-1} ($\times 10^{-6}$)	13.80 ± 1.74	13.83 ± 1.86	10.29 ± 0.99	9.91 ± 1.36
pH final	8.41	8.24	7.87	6.58

fuente de N como de la fase de crecimiento ($P < 0.001$), existiendo interacción entre ambos factores ($P < 0.001$). Las mayores densidades celulares se alcanzan al comienzo de la fase estacionaria de los cultivos con nitrato y nitrito (Tabla I). La duración de la fase estacionaria es más corta en los cultivos con nitrito, que entran rápidamente en fase de muerte. Aún cuando el crecimiento representado en la fig. 1 se siguió mediante contaje en un Coulter ZM, las densidades celulares dadas en la Tabla I se estimaron mediante contaje en cámara Neubauer, siendo estas últimas utilizadas para estimar los contenidos celulares, dado que una parte de la población de *C. calcitrans* se presenta como cadenas de 2 células (Foto 1).

En los cultivos con sulfato amónico se produce un descenso del pH del cultivo con respecto a las demás fuentes de N, con un pH final de 6.6 (Fig. 2, Tabla I).

Rendimientos por unidad de volumen de cultivo (Tabla II)

Los mayores rendimientos en biomasa seca y materia orgánica (PSLC) se obtienen en los cultivos con nitrato en la fase est-2: 0.91 y 0.72 $g.l^{-1}$ respectivamente. Al comienzo de la fase estacionaria (fase est-1), los mayores rendimientos se alcanzan igualmente en los cultivos con nitrato o nitrito (0.61-0.62 $g.l^{-1}$ de PS y 0.47-0.49 $g.l^{-1}$ de PSLC). Aún cuando para estos cultivos decrece la densidad celular entre ambas fases (Fig. 1), la biomasa cosechada aumenta (Tabla II). Los cultivos con sulfato amónico producen los menores rendimientos en ambos puntos de cosecha. En los cultivos con fuentes amónicas la densidad celular, biomasa seca y materia orgánica se mantienen constantes ($P > 0.1$) entre ambos puntos de la fase estacionaria.

Al alcanzarse la fase estacionaria (est-1), en los cultivos con nitrato se obtienen también los mayores rendimientos de pigmentos (clorofilas *a* y *c*, y carotenos). Los mayores rendimientos de proteína, carbohidratos y ARN se

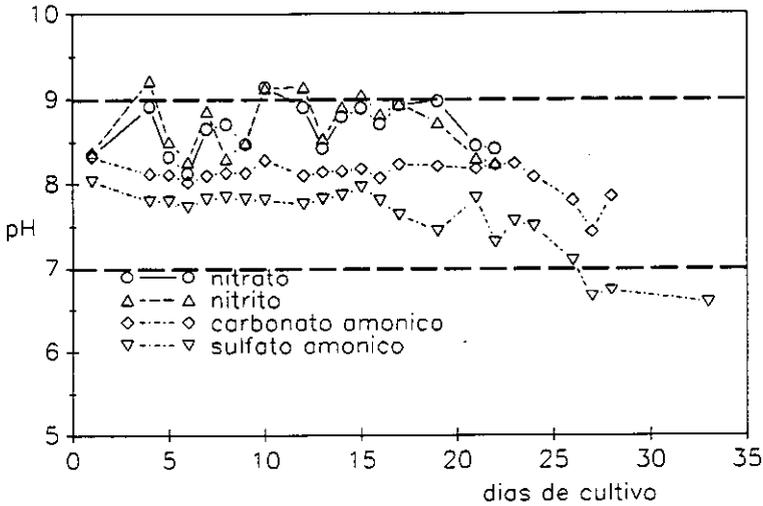


Fig. 2. Evolución temporal del pH extracelular en cultivos de *Chaetoceros calcitrans* con diferentes fuentes de N.

obtienen en los cultivos con nitrato o nitrito. Los rendimientos de lípidos no varían entre los cultivos con nitrato, nitrito y carbonato amónico, siendo menores en los cultivos con sulfato amónico.

En la fase est-2, los cultivos con nitrato producen los mayores rendimientos de todos los constituyentes analizados. No obstante, las diferencias no son significativas con los cultivos con sulfato amónico para clorofila α , ARN y lípidos, ni con el nitrito para los carotenos, proteína o lípidos. Excepto para los carbohidratos, los menores rendimientos se obtienen en los cultivos con carbonato amónico.

Los mayores rendimientos de pigmentos se obtienen en la fase est-1, excepto para el sulfato amónico que aumentan en la fase est-2. Para todos los demás constituyentes, las máximas producciones se obtienen en fase est-2. Los máximos rendimientos obtenidos son: 0.91 g.l^{-1} de materia seca, 0.72 g.l^{-1} de materia orgánica, 2.73 mg.l^{-1} de clorofila α , 0.45 mg.l^{-1} de clorofila c , 2.69 mg.l^{-1} de caroteno, 114.0 mg.l^{-1} de proteína, 191.6 mg.l^{-1} de carbohidratos, 80.5 mg.l^{-1} de lípidos y 26.5 mg.l^{-1} de ARN, todos en los cultivos con nitrato.

Composición celular

El peso seco celular (PS) y peso seco libre de cenizas (PSLC) son afectados tanto por la variación en la fuente de N metabolizada ($P < 0.001$), como por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), existiendo interacción entre ambos factores

Tabla II. Día de análisis, producciones de biomasa seca, materia orgánica, pigmentos y constituyentes macromoleculares en cultivos de *Chaetoceros calcitrans* con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrite	amonio	carbonato	amonio sulfato
día desde	log	8	8	8		8
inicio f. log	est-1	16	16	14		16
	est-2	21	21	18		21
PS (g.l ⁻¹)	log	0.36 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.01		0.34 ± 0.01
	est-1	0.61 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.53 ± 0.01		0.46 ± 0.02
	est-2	0.91 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.54 ± 0.01		0.47 ± 0.02
PSLC (g.l ⁻¹)	log	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.01		0.26 ± 0.01
	est-1	0.47 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.40 ± 0.01		0.37 ± 0.02
	est-2	0.72 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.44 ± 0.01		0.36 ± 0.01
clorofila a (mg.l ⁻¹)	log	1.11 ± 0.08	1.16 ± 0.07	1.08 ± 0.03		0.87 ± 0.05
	est-1	2.73 ± 0.16	2.05 ± 1.17	1.57 ± 0.04		1.18 ± 0.06
	est-2	1.80 ± 0.15	1.37 ± 0.12	1.24 ± 0.10		1.56 ± 0.17
clorofila c (mg.l ⁻¹)	log	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01		0.09 ± 0.01
	est-1	0.45 ± 0.01	0.40 ± 0.03	0.33 ± 0.11		0.14 ± 0.02
	est-2	0.32 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.14 ± 0.01		0.16 ± 0.02
carotenos (mg.l ⁻¹)	log	1.19 ± 0.08	1.20 ± 0.09	1.10 ± 0.04		0.83 ± 0.05
	est-1	2.69 ± 0.14	2.01 ± 0.17	1.43 ± 0.04		1.15 ± 0.07
	est-2	2.02 ± 0.16	1.87 ± 0.16	1.32 ± 0.09		1.54 ± 0.17
proteínas (mg.l ⁻¹)	log	40.45 ± 2.65	39.96 ± 2.62	46.93 ± 2.16		33.78 ± 1.22
	est-1	89.08 ± 8.83	97.72 ± 6.16	78.97 ± 2.05		62.55 ± 4.39
	est-2	113.97 ± 13.02	105.40 ± 7.08	61.61 ± 2.50		86.68 ± 2.91
carbohidr. (mg.l ⁻¹)	log	54.13 ± 1.32	56.38 ± 1.93	44.71 ± 4.57		28.17 ± 0.57
	est-1	114.31 ± 4.84	125.71 ± 2.77	68.98 ± 4.61		39.58 ± 0.58
	est-2	191.60 ± 9.21	165.04 ± 6.85	140.76 ± 6.37		103.07 ± 1.97
lípidos (mg.l ⁻¹)	log	35.00 ± 0.50	25.50 ± 0.75	45.50 ± 0.75		30.50 ± 1.00
	est-1	65.00 ± 3.50	60.50 ± 1.50	65.00 ± 2.00		55.00 ± 0.50
	est-2	80.50 ± 2.50	80.00 ± 2.75	70.50 ± 1.50		80.50 ± 0.75
ARN (mg.l ⁻¹)	log	12.34 ± 0.28	10.32 ± 0.54	14.70 ± 0.31		12.56 ± 0.10
	est-1	21.47 ± 0.25	23.71 ± 0.38	18.87 ± 0.44		19.56 ± 0.72
	est-2	26.45 ± 0.67	23.55 ± 1.41	17.35 ± 0.31		25.59 ± 0.79

($P < 0.001$). El peso seco aumenta con la edad del cultivo para las células cultivadas con nitrato y nitrito, desde 34 - 39 pg.cel^{-1} en la fase logarítmica hasta 96 - 121 pg.cel^{-1} en la fase est-2 (fase de muerte para los cultivos con nitrito) (Tabla III). El mismo comportamiento muestra el peso seco libre de cenizas (PSLC), aumentando de 24 - 26 pg.cel^{-1} a 76 - 94 pg.cel^{-1} (Tabla III). Las células cultivadas con fuentes amónicas presentan elevados pesos celulares en la fase logarítmica (60 - 70 pg.cel^{-1}), decreciendo a 43 - 57 pg en la fase est-2. Mientras en la fase log son las células cultivadas con fuentes de N reducidas las que presentan pesos celulares más elevados ($P < 0.001$), en la fase est-2 son las fuentes de N oxidadas las que presentan los mayores pesos celulares ($P < 0.001$), no existiendo diferencias en la fase est-1 ($0.05 > P > 0.01$).

El contenido de cenizas, como porcentaje del PS (Tabla III), decrece del 24.0 - 33.3% en la fase log al 19.4 - 23.8% en la fase est-1 ($P < 0.001$), no existiendo diferencias significativas entre las fases est-1 y est-2 ($P > 0.1$), ni entre las diferentes fuentes de N para una misma fase ($P > 0.1$).

El contenido celular de pigmentos (clorofilas α y c , y caroteno) presenta variaciones significativas en función de la fuente de N, fase de crecimiento e interacción significativa entre ambos factores ($P < 0.005$), excepto para el efecto de la fuente de N sobre la clorofila α ($P = 0.06$).

En los cultivos con nitrato y nitrito, los mayores contenidos celulares de clorofila α clorofila c y carotenos se alcanzan en la fase estacionaria (Tabla III). El contenido de cada pigmento como porcentaje respecto al PSLC (%PSLC) alcanza un máximo al comienzo de la fase estacionaria (fase est-1), decreciendo significativamente al envejecer el cultivo (Tabla IV). En los cultivos con carbonato amónico los contenidos celulares de pigmentos se mantienen constantes a lo largo del cultivo, excepto la clorofila c que alcanza un máximo en la fase est-1 (Tabla III). No obstante, en estos cultivos el contenido como %PSLC de todos los pigmentos disminuye entre las fases est-1 y est-2 (Tabla IV). En aquellos con sulfato amónico los mayores contenidos celulares se alcanzan en la fase logarítmica, decrecen al alcanzarse la fase estacionaria, y se mantienen constantes a lo largo de la misma (Tabla III). Sin embargo, cuando se expresa como porcentaje del PSLC, los mayores valores se alcanzan en la fase est-2 (Tabla IV).

Durante el crecimiento logarítmico las células cultivadas con fuentes amónicas presentan los mayores contenidos de cualquier pigmento, mientras en la fase est-2 son las células cultivadas con nitrato o nitrito las que presentan los mayores contenidos celulares (Tabla III).

Tabla III. Peso seco celular, peso seco libre de cenizas (PSLC), y contenidos celulares de pigmentos y constituyentes macromoleculares de *Chaetoceros calcitrans* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrite	amonio	carbonato	amonio sulfato
peso seco (pg.cel ⁻¹)	log	33.88 ± 1.64	39.18 ± 1.68	60.17 ± 0.72	70.46 ± 2.61	
	est-1	44.02 ± 0.54	44.65 ± 0.54	51.51 ± 0.49	45.91 ± 2.02	
	est-2	96.28 ± 1.06	120.56 ± 2.96	56.63 ± 0.78	42.89 ± 1.61	
PSLC (pg.cel ⁻¹)	log	23.97 ± 1.16	26.12 ± 1.12	40.88 ± 0.49	53.55 ± 1.98	
	est-1	33.82 ± 0.42	35.15 ± 0.43	39.27 ± 0.37	37.02 ± 1.63	
	est-2	76.43 ± 0.05	93.59 ± 0.18	45.79 ± 0.63	33.33 ± 1.25	
cenizas (% PS)	log	29.25 ± 1.21	33.33 ± 0.41	32.06 ± 1.25	24.00 ± 2.24	
	est-1	23.18 ± 0.72	21.28 ± 0.83	23.76 ± 0.30	19.38 ± 0.65	
	est-2	20.60 ± 0.83	22.32 ± 1.05	19.14 ± 0.91	22.29 ± 0.23	
clorofila a (pg.cel ⁻¹)	log	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.01	
	est-1	0.20 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.01	
	est-2	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.02	
clorofila c (fg.cel ⁻¹)	log	11.43 ± 2.09	11.36 ± 1.18	18.05 ± 0.34	18.80 ± 2.59	
	est-1	32.33 ± 0.30	20.14 ± 1.85	32.17 ± 0.91	13.79 ± 0.19	
	est-2	33.79 ± 5.46	26.63 ± 1.36	14.76 ± 0.30	15.06 ± 1.39	
carotenos (pg.cel ⁻¹)	log	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01	
	est-1	0.19 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	
	est-2	0.21 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	
proteínas (pg.cel ⁻¹)	log	3.78 ± 0.25	3.84 ± 0.25	6.72 ± 0.31	7.05 ± 0.25	
	est-1	6.46 ± 0.56	7.07 ± 0.45	7.67 ± 0.20	6.31 ± 0.44	
	est-2	12.12 ± 1.39	15.59 ± 1.05	6.43 ± 0.26	7.95 ± 0.27	
carbohidr. (pg.cel ⁻¹)	log	5.06 ± 0.12	5.42 ± 0.19	6.41 ± 0.65	5.88 ± 0.12	
	est-1	8.28 ± 0.35	9.09 ± 0.20	6.70 ± 0.45	3.99 ± 0.06	
	est-2	20.38 ± 0.98	24.41 ± 1.01	14.69 ± 0.67	9.46 ± 0.18	
lípidos (pg.cel ⁻¹)	log	3.30 ± 0.32	2.42 ± 0.18	6.52 ± 0.65	6.32 ± 0.49	
	est-1	4.76 ± 0.46	4.39 ± 0.47	6.37 ± 0.53	5.65 ± 0.58	
	est-2	8.79 ± 0.73	11.23 ± 0.55	6.97 ± 0.35	7.50 ± 0.83	
ARN (pg.cel ⁻¹)	log	1.15 ± 0.03	0.99 ± 0.04	2.11 ± 0.04	2.62 ± 0.04	
	est-1	1.56 ± 0.02	1.53 ± 0.03	1.83 ± 0.04	1.97 ± 0.07	
	est-2	2.81 ± 0.07	3.48 ± 0.21	1.81 ± 0.03	2.35 ± 0.07	

Tabla IV. Composición bioquímica, como porcentaje del PSLC, de *Chaetoceros calcitrans* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrite	amónio carbonato	amónio sulfato
clorofila <i>a</i>	log	0.43 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.38 ± 0.01	0.34 ± 0.02
	est-1	0.58 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.39 ± 0.01	0.32 ± 0.02
	est-2	0.25 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.43 ± 0.05
clorofila <i>c</i>	log	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
	est-1	0.10 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.04 ± 0.01
	est-2	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.00
carotenos	log	0.46 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.36 ± 0.01	0.32 ± 0.02
	est-1	0.58 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0.35 ± 0.01	0.31 ± 0.02
	est-2	0.28 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.42 ± 0.05
proteínas	log	15.77 ± 1.03	14.71 ± 0.96	16.45 ± 0.76	13.17 ± 0.48
	est-1	19.09 ± 1.85	21.31 ± 1.34	19.54 ± 0.51	17.05 ± 1.20
	est-2	15.86 ± 1.81	16.66 ± 1.12	14.04 ± 0.57	23.86 ± 0.80
carbohidr.	log	21.11 ± 0.52	20.76 ± 0.71	15.67 ± 1.60	10.98 ± 0.22
	est-1	24.49 ± 1.04	27.42 ± 0.60	17.07 ± 1.14	10.79 ± 0.16
	est-2	26.67 ± 1.28	26.09 ± 1.08	32.09 ± 1.45	28.37 ± 0.54
lípidos	log	13.65 ± 0.58	10.20 ± 1.14	15.77 ± 0.22	11.70 ± 0.13
	est-1	13.93 ± 0.65	13.09 ± 0.12	16.09 ± 0.50	14.99 ± 0.52
	est-2	11.14 ± 0.34	12.64 ± 0.44	15.96 ± 0.18	22.02 ± 0.52
ARN	log	4.81 ± 0.11	3.80 ± 0.13	5.15 ± 0.11	4.90 ± 0.08
	est-1	4.60 ± 0.07	4.62 ± 0.08	4.67 ± 0.11	5.33 ± 0.20
	est-2	3.68 ± 0.09	3.72 ± 0.22	3.96 ± 0.07	7.04 ± 0.22

La relación clorofilas *a:c* disminuye entre las fases log y est-1 para todas las fuentes de N, de 8.92 - 9.89 en la fase logarítmica a 4.73 - 8.37 en la fase est-1 (Fig. 3). El comportamiento a lo largo de la fase estacionaria difiere para cada fuente de N, sin variaciones significativas (nitrate, sulfato amónico) o aumentando (nitrite, carbonato amónico) entre las fases est-1 y est-2, con valores finales de 5.76 - 8.25. La relación clorofila *a*:carotenos muestra ligeras variaciones a lo largo del cultivo, con valores entre 0.73 - 1.09 (Fig. 3). Para cada fuente de N decrece entre las fases est-1 y est-2, de 1.02 - 1.09 a 0.73 - 1.01.

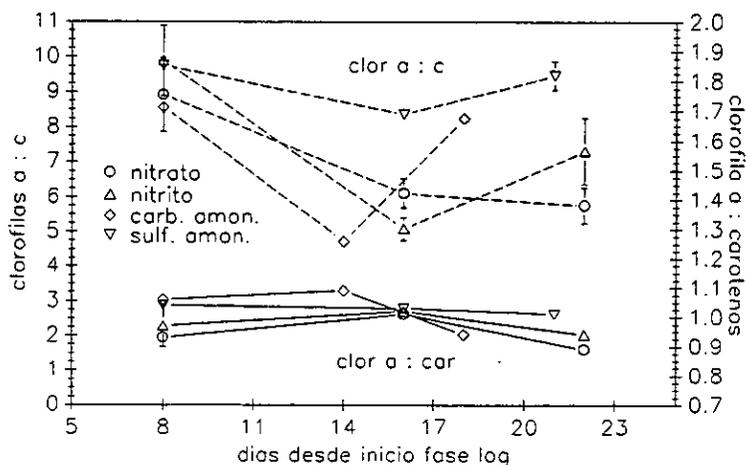


Fig. 3. Evolución a lo largo del ciclo de crecimiento de las relaciones entre pigmentos en cultivos de *Chaetoceros calcitrans* con diferentes fuentes de N. Para cada fuente de N, se representan las fases log, est-1 y est-2.

Los contenidos celulares de proteína, carbohidratos, lípidos y ARN son afectados tanto por la fuente de N ($P < 0.001$) como por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), existiendo interacción ($P < 0.001$).

El contenido celular de **proteína** ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$, Tabla III) de las células cultivadas con nitrato o nitrito aumenta con la fase de crecimiento: logarítmica < est-1 < est-2. No hay diferencias significativas entre estas dos fuentes de N a lo largo del cultivo ($P > 0.05$). Las células cultivadas con carbonato amónico presentan sus contenidos celulares más altos de proteína al comienzo de la fase estacionaria (est-1). No obstante, cuando se expresa como %PSLC, para estas tres fuentes de N la proteína celular alcanza su máximo valor al comienzo de la fase estacionaria (19.1 - 21.3%) y decrece posteriormente en la fase est-2 (14.0 - 16.7%) (Tabla IV). En los cultivos con sulfato amónico, el mayor contenido celular de proteína se alcanza en la última muestra analizada: $7.95 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ ó 23.9% PSLC.

El contenido celular de **carbohidratos** aumenta con la fase de crecimiento, alcanzándose los mayores valores en la fase est-2 para todas las fuentes de N (Tablas III y IV): $5.06 - 6.41 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ en la fase log (11.0 - 21.1% PSLC), a $9.46 - 24.41 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ (26.1 - 32.1% PSLC) en la fase est-2. Las células cultivadas con nitrato o nitrito presentan los mayores contenidos celulares absolutos en las fases est-1 y est-2, así como en % PSLC durante la fase est-1. Sin embargo, las células cultivadas con amonio presentan los porcentajes de carbohidratos más altos en la fase est-2.

El contenido celular de **lípidos** (pg.cel^{-1}) aumenta continuamente a lo largo del ciclo de crecimiento para las células cultivadas con nitrato o nitrito, mientras en aquellas cultivadas con ambas fuentes de amonio el aumento se produce a partir de la fase est-1, alcanzando incluso en la fase est-1 un mínimo en los cultivos con sulfato amónico (Tabla III). El porcentaje de lípidos en la materia orgánica (PSLC) sólo muestra ligeras variaciones a lo largo del ciclo de crecimiento, alcanzando valores ligeramente superiores al comienzo de la fase estacionaria (13.1 - 16.1%). La excepción la representan los cultivos con sulfato amónico, en los que aumenta continuamente del 11.7% en la fase log al 22.0% en la fase est-2 (Tabla IV).

Las células cultivadas con amonio presenta valores más altos de lípidos (pg.cel^{-1}) que aquellas cultivadas con N oxidado durante las fases est-1 y est-2. En la fase est-2, los mayores contenidos celulares (pg.cel^{-1}) se dan en los cultivos con nitrato o nitrito; no obstante, las células cultivadas con amonio presentan los mayores contenidos de lípidos como fracción del PSLC (16.0 - 22.0%).

El contenido de **ARN** (pg.cel^{-1} , Tabla III) aumenta continuamente a lo largo del cultivo para las células cultivadas con nitrato o nitrito, mientras en aquellas cultivadas con amonio bien se mantiene constante (carbonato) o alcanza un mínimo al comienzo de la fase estacionaria (sulfato). Las células cultivadas con amonio presentan los mayores contenidos celulares (pg.cel^{-1}) durante el crecimiento logarítmico y al comienzo de la fase estacionaria, presentando menores valores que aquellas cultivadas con fuentes oxidadas en la fase est-2. Las diferencias son menores en cuanto a la fracción que el ARN representa en la materia orgánica (Tabla IV), representando el 3.8 - 5.3% de la materia orgánica en las fases log y est-1, y decreciendo en la fase est-2 al 3.7 - 4.0%, excepto en los cultivos con sulfato amónico (7.0%).

La relación lípidos/proteínas no muestra tendencias claras en función del tiempo de cultivo, variando entre 0.63 y 0.97 en la fase log, 0.62 - 0.88 en la fase est-1 y 0.72 - 1.08 en la fase est-2 (Fig. 4A). Para cada fase de crecimiento, los valores más altos se registran en los cultivos con fuentes amónicas, siendo siempre > 0.8 . La relación lípidos/carbohidratos toma también los mayores valores en los cultivos con N reducido (Fig. 4A), registrándose para todas las fuentes de N los menores valores en la fase est-2 (0.43 - 0.79). Excepto para las células cultivadas con amonio carbonato en fase est-2 (0.47), esta relación es siempre mayor a 0.79 en los cultivos con amonio, valor no alcanzado en ningún caso en los cultivos con nitrato o nitrito (máximo = 0.65).

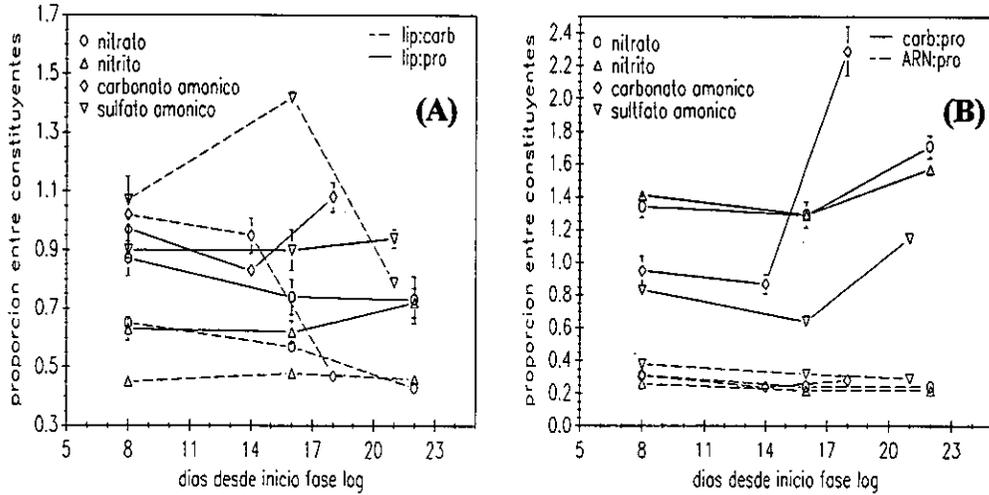


Fig. 4. Evolución a lo largo del ciclo de crecimiento de las relaciones entre constituyentes macromoleculares en cultivos de *Chaetoceros calcitrans* con diferentes fuentes de N. Para cada fuente de N, se representan las fases log, est-1 y est-2. carb: carbohidratos; pro: proteína; lip: lípidos.

La relación carbohidratos/proteína celular (Fig. 4B) toma valores entre 0.83 - 1.41 en la fase log, 0.64 - 1.71 en la fase est-1 y 1.15 - 2.29 en la fase est-2. Para cada fuente de N, disminuye ligeramente entre la fase log y est-1, aumentando posteriormente para alcanzar los máximos valores en la fase est-2, especialmente en los cultivos con carbonato amónico. La relación ARN/proteína decrece continuamente a lo largo del cultivo, desde 0.26 - 0.38 en la fase log a 0.22 - 0.29 en la fase est-2 (Fig. 4B).

Perfil de ácidos grasos (Tabla V)

El contenido total de ácidos grasos, como mg por gramo de materia seca, aumenta con el tiempo de cultivo, alcanzando el máximo al final del cultivo para todas las fuentes de N, excepto en los cultivos con carbonato amónico, en los que decrece. En la fase logarítmica las células cultivadas con ambas fuentes de amonio presentan los contenidos más altos en ácidos grasos, con 63.1 - 86.1 mg por g de peso seco (Tabla V). Los contenidos celulares aumentan hasta 122.5 mg por g de peso seco en los cultivos con sulfato amónico en la fase est-2, oscilando en las demás fuentes entre 63.9 - 78.3 mg por g de peso seco en esta fase.

El perfil de ácidos grasos de *Chaetoceros calcitrans* incluye:

-saturados: mirístico (14:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0), araquídico (20:0), behénico (22:0) y lignocérico (24:0).

-monoinsaturados: miristoleico (14:1 ω 5), palmitoleico (16:1 ω 7), oleico (18:1 ω 9), vaccénico (18:1 ω 7) y *cis*-11-eicosenoico o gondoico (20:1 ω 9).

-diinsaturados: hexadecadienoico (16:2 ω 7 y 16:2 ω 4), α -linoleico (18:2 ω 6) y 18:2 ω 4?*

-triinsaturados: hexadecatrienoico (16:3 ω 6, 16:3 ω 4 y 16:3 ω 3?*), γ -linolénico (18:3 ω 6) y α -linolénico (18:3 ω 3).

-tetrainsaturados: hexadecatetraenoico (16:4 ω 1), octadecatetraenoico (18:4 ω 3), araquidónico (20:4 ω 6) y eicosatetraenoico (20:4 ω 3).

-pentainsaturados: eicosapentaenoico (20:5 ω 3).

-hexainsaturados: docosaheptaenoico (22:6 ω 3).

Los principales ácidos grasos cuantitativamente son el 14:0 (13.0 - 29.3% del total), 16:0 (17.2 - 25.2%), 16:1 ω 7 (24.3 - 35.1%), 16:2 ω 7 (1.1 - 3.1%), 16:2 ω 4 (1.7 - 3.8%), 16:3 ω 4 (1.2 - 5.0%), 18:1 ω 9 (0.9 - 2.9%), 18:1 ω 7 (4.3 - 11.3%), 18:4 ω 3 (0.3 - 1.8%) y 20:5 ω 3 (1.3 - 9.3%).

La proporción entre ácidos grasos saturados + monoinsaturados a poliinsaturados ((S+MI)/PI) se mantienen en valores próximos al 85:15 en las diferentes fuentes de N durante el crecimiento logarítmico. El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (%PI) es más alto en los cultivos con fuentes de N reducido en ambas fases estacionarias: 17.7 - 27.0% del total de ácidos grasos frente a 13.8 - 18.7% en los cultivos con nitrato o nitrito. En todos los casos, el %PI alcanza su valor máximo en la fase est-1.

Los perfiles de ácidos grasos de las células cultivadas con nitrato o nitrito no difieren en las distintas fases de crecimiento. Con respecto a los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, el máximo contenido (% del total) de 14:0, 18:0, 18:1 ω 9, 20:0 y 22:0 se obtiene en la fase logarítmica, mientras el 16:0 alcanza un mínimo al comienzo de la fase estacionaria; 14:1, 15:0, 16:1 ω 7, 18:1 ω 7, 20:1 y 24:0 alcanzan los mayores valores en la fase estacionaria, y generalmente en la fase est-2. El mismo comportamiento se observa en los cultivos con sulfato amónico para estos ácidos grasos, con las excepciones del 15:0, 16:0 y 16:1 ω 7 (máximo en la fase log) y 22:0 (máx. en fase est-2). Los cultivos con amonio carbonato se comportan como los de amonio sulfato excepto para los ácidos grasos 18:0, 18:1 ω 9 y 20:0 que alcanzan el valor máximo en la fase est-2.

* El símbolo de interrogación (?) indica que no está confirmada la posición del doble enlace más cercano al extremo metilo (ω).

Tabla V. Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de PS, de *Chaetoceros calcitrans* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

AG	nitrato						nitrito					
	log		est-1		est-2		log		est-1		est-2	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	29.31	14.75	26.38	14.53	20.98	16.41	25.65	11.71	26.79	15.75	19.80	12.62
14:1	0.57	0.29	0.59	0.33	0.87	0.68	0.47	0.21	0.80	0.47	1.95	1.24
15:0	0.93	0.47	0.90	0.49	0.98	0.77	0.84	0.38	0.89	0.52	1.06	0.68
16:0	19.94	10.03	18.81	10.36	22.34	17.48	21.61	9.86	17.20	10.12	21.11	13.46
16:1 ω 7	24.45	12.31	26.07	14.36	28.12	22.01	24.34	11.11	27.06	15.92	26.04	16.60
16:2 ω 7	1.52	0.76	1.92	1.06	1.33	1.04	1.56	0.71	2.25	1.32	1.08	0.69
16:2 ω 4	2.37	1.19	2.92	1.61	2.04	1.60	2.57	1.17	2.97	1.75	1.73	1.10
16:3 ω 6	0.15	0.07	-	-	0.24	0.18	0.39	0.18	0.14	0.08	0.47	0.30
18:0	1.14	0.58	0.71	0.39	0.85	0.66	1.34	0.61	0.69	0.40	0.78	0.50
16:3 ω 4	1.93	0.97	2.48	1.37	1.40	1.09	1.71	0.78	2.92	1.72	1.18	0.75
16:3 ω 3?	0.18	0.09	0.19	0.10	0.39	0.30	0.24	0.11	0.20	0.12	0.42	0.27
18:1 ω 9	2.45	1.23	1.78	0.98	1.50	1.17	2.92	1.33	1.65	0.97	1.64	1.04
18:1 ω 7	4.30	2.16	5.42	2.99	8.82	6.90	5.46	2.49	5.13	3.02	11.34	7.23
16:4 ω 1	1.96	0.99	1.47	0.81	1.18	0.92	1.98	0.90	1.27	0.75	1.22	0.78
18:2 ω 6	0.66	0.33	0.95	0.52	0.69	0.54	0.46	0.21	0.67	0.40	0.63	0.40
18:2 ω 4	0.19	0.09	0.51	0.28	0.66	0.52	0.72	0.33	0.34	0.20	1.16	0.74
18:3 ω 6	0.30	0.15	0.31	0.17	0.32	0.25	0.70	0.32	0.27	0.16	1.25	0.80
20:0	0.24	0.12	0.18	0.10	-	-	0.40	0.18	0.17	0.10	-	-
18:3 ω 3	0.08	0.04	0.18	0.10	0.40	0.31	0.18	0.08	0.20	0.16	0.24	0.15
20:1 ω 9	∅	-	0.30	0.17	-	-	tr	tr	0.17	0.10	0.53	0.34
18:4 ω 3	0.86	0.43	0.96	0.53	1.31	1.03	0.79	0.36	0.98	0.58	0.92	0.59
Δ 2.13 ⁽¹⁾	0.65	0.33	0.22	0.12	1.26	0.99	1.73	0.79	0.57	0.34	1.53	0.97
22:0	2.40	1.21	0.71	0.39	0.84	0.66	1.51	0.69	0.38	0.22	tr	tr
20:4 ω 6	-	-	0.37	0.20	-	-	tr	tr	0.16	0.10	-	-
20:4 ω 3	0.24	0.12	0.37	0.20	⁽²⁾ tr	tr	tr	tr	0.14	0.08	-	-
20:5 ω 3	2.23	1.12	4.28	2.35	2.57	2.01	2.07	0.95	4.91	2.89	2.18	1.39
24:0	0.36	0.18	0.50	0.28	0.90	0.71	0.38	0.18	0.42	0.24	1.74	1.11
22:6 ω 3	0.58	0.29	0.52	0.29	tr	tr	tr	tr	0.44	0.26	tr	tr
total (mg.g ⁻¹ PS):	50.32		55.06		78.25		45.66		58.81		63.74	
%(S+MI):	86.10		82.36		86.21		85.02		81.34		86.09	
%PI:	13.90		17.64		13.79		14.98		18.66		13.91	
(S+MI)/PI:	6.19		4.67		6.25		5.67		4.36		6.19	
ω 6/ ω 3:	0.63		0.55		0.53		0.92		0.49		0.87	

⁽¹⁾ Δ i: no identificado, i siendo el tiempo de retención relativo; ⁽²⁾ -: no detectado; ⁽³⁾ tr: traza.

AG: ácido graso; S: ácidos grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: poliinsaturados.

Tabla V (continuación). Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de PS, de *Chaetoceros calcitrans* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

AG	carbonato amónico						sulfato amónico					
	log		est-1		est-2		log		est-1		est-2	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	20.36	17.52	13.04	10.01	13.96	8.92	20.53	12.94	14.66	15.92	19.30	23.64
14:1	0.47	0.41	0.45	0.34	0.73	0.47	0.57	0.36	0.87	0.95	1.21	1.48
15:0	0.93	0.80	0.63	0.48	0.70	0.45	0.94	0.59	0.82	0.89	0.88	1.07
16:0	24.48	21.07	20.46	15.72	25.17	16.08	24.84	15.66	20.32	22.06	19.96	24.46
16:1 ω 7	35.06	30.18	28.62	21.99	29.38	18.78	33.27	20.98	25.41	27.59	25.51	31.26
16:2 ω 7	1.67	1.43	2.43	1.87	1.42	0.91	1.44	0.91	2.97	3.23	3.06	3.74
16:2 ω 4	2.88	2.48	3.82	2.94	2.40	1.53	2.76	1.74	3.58	3.89	3.76	4.61
16:3 ω 6	^(a) -	-	0.11	0.09	0.12	0.07	tr	tr	0.19	0.21	tr	tr
18:0	0.78	0.67	0.69	0.53	0.98	0.63	0.71	0.45	0.61	0.66	0.45	0.56
16:3 ω 4	1.68	1.45	4.65	3.57	1.95	1.24	1.58	1.00	4.96	5.38	4.99	6.12
16:3 ω 3?	0.21	0.18	0.24	0.19	0.26	0.17	tr	tr	0.54	0.58	0.44	0.54
18:1 ω 9	1.75	1.51	1.86	1.43	2.14	1.37	1.63	1.03	1.26	1.37	0.93	1.14
18:1 ω 7	4.46	3.84	5.68	4.36	7.32	4.68	4.65	2.93	9.21	10.01	7.36	9.01
16:4 ω 1	0.93	0.80	1.27	0.98	1.10	0.70	1.19	0.75	1.64	1.78	1.27	1.56
18:2 ω 6	0.68	0.59	0.91	0.70	0.90	0.58	0.50	0.31	0.51	0.55	0.51	0.62
18:2 ω 4	0.53	0.45	0.79	0.61	0.99	0.63	0.98	0.62	0.97	1.05	0.57	0.70
18:3 ω 6	0.14	0.12	0.38	0.29	1.00	0.64	0.29	0.18	0.51	0.56	0.16	0.19
20:0	0.15	0.13	0.21	0.16	0.24	0.15	-	-	-	-	-	-
18:3 ω 3	^(a) tr	tr	0.21	0.16	0.12	0.07	tr	tr	0.25	0.27	0.13	0.16
20:1 ω 9	0.17	0.15	0.50	0.38	0.36	0.23	tr	tr	0.67	0.73	0.50	0.61
18:4 ω 3	0.31	0.27	1.39	1.07	0.82	0.52	1.53	0.97	1.78	1.94	1.57	1.93
Δ 2.13 ⁽ⁱ⁾	0.27	0.23	0.21	0.16	0.32	0.20	-	-	0.37	0.40	0.52	0.64
22:0	0.63	0.55	0.33	0.25	0.67	0.43	tr	tr	0.46	0.50	0.63	0.77
20:4 ω 6	tr	tr	0.25	0.19	0.26	0.17	1.33	0.84	0.33	0.36	0.45	0.56
20:4 ω 3	tr	tr	0.13	0.10	0.21	0.13	tr	tr	0.33	0.36	0.45	0.56
20:5 ω 3	1.28	1.10	9.25	7.11	5.14	3.29	1.28	0.80	5.59	6.07	4.00	4.90
24:0	0.16	0.14	0.60	0.46	0.68	0.43	-	-	0.50	0.54	0.74	0.91
22:6 ω 3	tr	tr	0.90	0.69	0.67	0.43	-	-	0.68	0.74	0.44	0.54
total (mg.g ⁻¹ PS):	86.06		76.82		63.90		63.06		108.59		122.53	
%(S+MI):	89.42		73.05		82.34		87.33		74.80		77.46	
%PI:	10.58		26.95		17.66		12.67		25.20		22.54	
(S+MI)/PI:	8.45		2.71		4.66		6.89		2.97		3.44	
ω 6/ ω 3:	1.24		0.34		0.51		1.18		0.49		0.59	

⁽ⁱ⁾ Δ i: no identificado, i siendo el tiempo de retención relativo; ^(a) -: no detectado; ^(a) tr: traza.

AG: ácido graso; S: ácidos grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: poliinsaturados.

En general, los ácidos grasos poliinsaturados, considerados individualmente, tienden a alcanzar valores más altos en la fase estacionaria. En los cultivos con ambas fuentes de N oxidado, los ácidos grasos 16:2 ω 7, 16:2 ω 4, 16:3 ω 4, 18:2 ω 6, y los ácidos grasos de 20 y 22 átomos de C alcanzan los valores más altos al comienzo de la fase estacionaria (est-1), mientras al final del cultivo (est-2) se alcanzan los mayores valores de 16:3 ω 6, 16:3 ω ?, 18:2 ω 4, 18:3 ω 6 y 18:3 ω 3. Los ácidos grasos 16:4 ω 1 y 22:6 ω 3, éste sólo en el caso del nitrato, alcanzan los mayores valores en la fase logarítmica. Los cultivos con amonio carbonato siguen la misma evolución, excepto para: 16:4 ω 1 y 18:3 ω 3 (máximo en la fase est-1) y 20:4 ω 3 (máximo en est-2); los contenidos de 16:3 ω 6, 18:2 ω 6 y 20:4 ω 6, como en el caso del N oxidado, son más altos en fase estacionaria, manteniéndose constantes a lo largo de dicha fase. En los cultivos con sulfato amónico los valores más altos de ácidos grasos poliinsaturados también se alcanzan en la fase estacionaria, aunque los máximos temporales no coinciden con ninguna otra fuente, excepto: 16:4 ω 1, 18:3 ω 3, 20:4 ω 3 (máximo en est-1, coincidiendo con amonio carbonato) y 20:5 ω 3 y 22:6 ω 3 (máximo en est-1, coincidiendo con las demás fuentes de N). En estos cultivos, el máximo de araquidónico (AA) se obtuvo en la fase logarítmica, a diferencia de las demás fuentes de N.

Los valores máximos de los principales ácidos grasos esenciales (mg.g⁻¹ PS) fueron: α -linoleico, 0.70 mg.g⁻¹ PS (amonio carbonato, est-1); γ -linolénico, 0.80 mg (nitrito, est-2); α -linolénico, 0.31 mg (nitrato, est-1); araquidónico (AA), 0.84 mg (amonio sulfato, log), eicosapentaenoico (EPA), 7.11 mg (amonio carbonato, est-1) y docosahexanoico (DHA), 0.74 mg (amonio sulfato, est-1). En la fase est-1, punto de máximo nivel de PI (ver arriba), la suma de estos ácidos grasos esenciales representa 9.14 y 8.62 mg.g⁻¹ PS, o el 11.9% y 7.9% del total de ácidos grasos en los cultivos con amonio carbonato y amonio sulfato, respectivamente, frente a 3.63 y 3.80 mg.g⁻¹ PS (6.6 - 6.5% del total) en los cultivos con nitrato y nitrito, respectivamente.

La relación entre ácidos grasos poliinsaturados de las series ω 6 y ω 3 (ω 6/ ω 3), alcanza su valor máximo en la fase logarítmica para todas las fuentes de N, con valores en el rango 0.63 - 1.24. Dentro de este rango, los valores mayores de 1 sólo se obtienen en cultivos con N reducido. Esta relación alcanza un mínimo en la fase est-1, con valores en el rango 0.34 - 0.55, aumentando de nuevo en la fase est-2 a 0.51 - 0.91.

Dunaliella tertiolecta (CHLOROPHYCEAE)

La variabilidad bioquímica de esta microalga, en función de la fuente de N y fase de crecimiento, ha sido extensivamente estudiada en anteriores trabajos (Fábregas *et al.*, 1989a,b; Abalde *et al.*, 1991; Herrero *et al.*, 1994) y Tesis Doctorales (Abalde, 1986), en condiciones experimentales similares a las empleadas en este estudio. Por ello, el análisis de esta microalga marina se restringe a la variabilidad en la composición de ácidos grasos, siguiéndose también el crecimiento y nivel de pigmentos.

Crecimiento

La duración de la fase logarítmica (PCM) (Fig. 5; Tabla VI) fue de 22 días para los cultivos con nitrato, nitrito y urea, y de 12-13 días para los cultivos con amonio. Las tasas de crecimiento medias observadas durante la fase logarítmica no muestran diferencias significativas entre las diferentes fuentes de N, con valores entre 0.20 doblajes d^{-1} en los cultivos con amonio y 0.23 doblajes d^{-1} en los cultivos con urea (Tabla VI). La tasa máxima observada varió entre 0.55 y 0.82 doblajes d^{-1} . Las densidades celulares en la fase estacionaria de los cultivos con nitrato, nitrito y urea, $19.1 - 23.1 \times 10^6$ cel. ml^{-1} , no son significativamente diferentes ($P > 0.05$). En los cultivos con amonio el crecimiento es acompañado por el descenso del pH, produciéndose la detención del crecimiento a densidades de 4.2×10^6 células. ml^{-1} (Fig. 6).

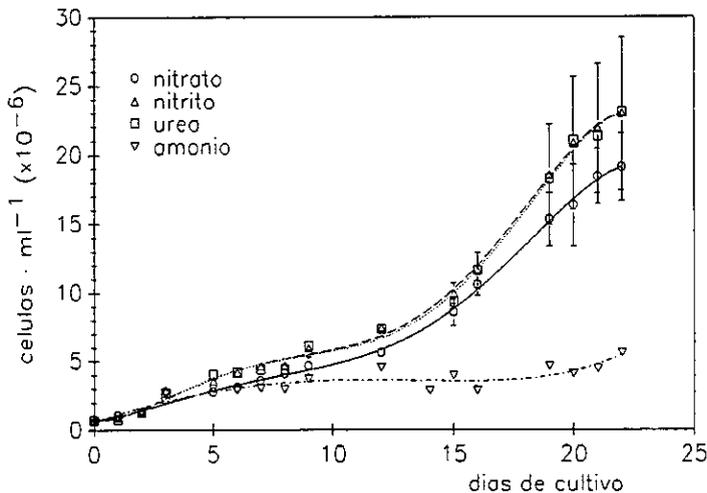


Fig. 5. Crecimiento de *Dunaliella tertiolecta* cultivada con diferentes fuentes de N. Las réplicas de los cultivos con amonio y urea se presentan por separado por la existencia de fases de adaptación.

Tabla VI. Tasa de crecimiento (k), duración de la fase logarítmica (PCM), densidad celular en fase estacionaria y pH final en cultivos de *Dunaliella tertiolecta* con diferentes fuentes de N.

	nitrato	nitrito	urea	amonio
k media (d^{-1})	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.20 ± 0.01
k máxima (d^{-1})	0.55	0.69	0.82	0.64
PCM (días)	22	22	22	12-13
cél. ml^{-1} ($\times 10^{-6}$)	19.10 ± 2.42	22.98 ± 5.53	23.11 ± 1.18	4.17 ± 0.22
pH final	7.94	7.94	8.00	3.56

Rendimientos por unidad de volumen de cultivo (Tabla VII)

Los cultivos con nitrato, nitrito y urea producen cantidades equivalentes de biomasa seca ($P = 0.35$), materia orgánica ($P = 0.38$), clorofilas a ($P = 0.30$) y b ($P = 0.23$), y carotenos ($P = 0.20$) al comienzo de la fase estacionaria (est-1). Los menores rendimientos de biomasa y pigmentos se obtienen en los cultivos con amonio ($P = 0.005$ para la clorofila b y $P < 0.001$ para los demás).

Composición celular

El **peso seco celular (PS)** y **peso seco libre de cenizas (PSLC)** son afectados tanto por la fuente de N ($P = 0.04$ y 0.01 , respectivamente) como por la fase de crecimiento ($P = 0.06$ y 0.05), sin interacción ($P = 0.09$ y 0.13). Las células cultivadas con amonio presentan en ambas fases de crecimiento el mayor peso seco ($106 - 111$ pg.cel $^{-1}$) y materia orgánica ($93 - 103$ pg.cel $^{-1}$) (Tabla VIII). Durante la fase logarítmica, las células cultivadas con nitrato, nitrito o urea no difieren en sus pesos, mientras en la fase estacionaria aquellas cultivadas con urea presentan pesos más bajos. El peso celular aumenta con la edad del cultivo para las células cultivadas con nitrato o nitrito ($P < 0.01$), manteniéndose constantes en el caso de la urea y amonio ($P > 0.1$).

El contenido en **cenizas** no es afectado por la fuente de N durante el crecimiento logarítmico, representando el $10.2 - 12.9\%$ del PS (Tabla VIII). En la fase estacionaria el porcentaje de cenizas de las células cultivadas con nitrato o nitrito no difiere entre sí, y es mayor que el de las células cultivadas con urea o amonio ($P = 0.06$). En los cultivos con nitrato o nitrito el porcentaje de cenizas aumenta con la edad del cultivo, mientras que disminuye en los cultivos con urea y amonio.

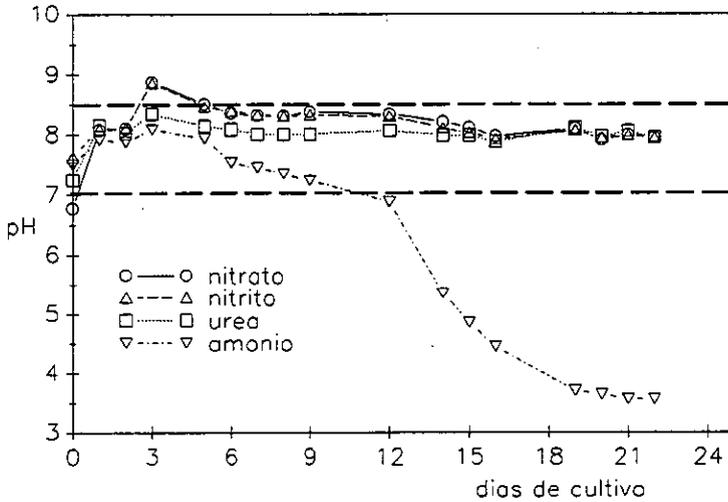


Fig. 5. Evolución temporal del pH extracelular en cultivos de *Dunaliella tertiolecta* con diferentes fuentes de N.

El contenido celular de **pigmentos** (clorofilas *a* y *b*, y carotenos) es afectado por la fuente de N ($P < 0.001$). Los contenidos de clorofila *a* y carotenos son afectados asimismo por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), pero no el de clorofila *b* ($P > 0.1$). En todos los casos se registra una interacción significativa ($P < 0.001$).

Durante el crecimiento logarítmico las células cultivadas con urea o amonio presentan los mayores contenidos celulares de todos los pigmentos (Tabla VIII), aunque el contenido de clorofilas *a* y *b* de los cultivos con nitrato no es significativamente diferente de aquellos (test de Duncan, $\alpha = 0.05$). En la fase estacionaria, las células cultivadas con amonio presentan los mayores contenidos celulares de todos los pigmentos, no existiendo diferencias significativas entre las demás fuentes.

El contenido celular de clorofila *a* decrece con la edad del cultivo para los cultivos con nitrato, nitrito o urea, de $3.03 - 3.45 \text{ pg. cel}^{-1}$ a $1.73 - 1.88 \text{ pg. cel}^{-1}$ (Tabla VIII). En estos cultivos, la clorofila *a* decrece del 4.3 - 4.4% del PSLC en la fase logarítmica al 2.0 - 2.5% en la fase est-1 (Tabla IX).

El contenido celular de clorofila *b* se mantiene constante entre las fases log y est-1 ($P > 0.05$), excepto para los cultivos con amonio en los que aumenta ($P < 0.005$) (Tabla VIII).

Tabla VII. Día de análisis y producciones de biomasa seca, materia orgánica y pigmentos en cultivos de *D. tertiolecta* con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

		nitrato	nitrito	urea	amonio
día desde inicio f. log	log	9	9	9	9
	est-1	22	22	22	16
PS (g.l ⁻¹)	log	0.39 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.54 ± 0.04	0.38 ± 0.01
	est-1	1.89 ± 0.26	2.33 ± 0.59	1.77 ± 0.02	0.46 ± 0.01
PSLC (g.l ⁻¹)	log	0.34 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.48 ± 0.03	0.33 ± 0.01
	est-1	1.59 ± 0.19	1.96 ± 0.46	1.63 ± 0.02	0.43 ± 0.01
clorofila a (mg.l ⁻¹)	log	11.60 ± 1.93	14.11 ± 0.41	14.39 ± 0.63	10.59 ± 0.87
	est-1	35.78 ± 3.31	38.74 ± 4.99	38.73 ± 0.62	12.97 ± 0.28
clorofila b (mg.l ⁻¹)	log	2.81 ± 0.58	3.43 ± 0.06	3.63 ± 0.20	2.58 ± 0.46
	est-1	13.08 ± 2.27	18.08 ± 6.86	16.14 ± 0.38	4.11 ± 0.07
carotenos (mg.l ⁻¹)	log	3.28 ± 0.49	3.96 ± 0.09	4.03 ± 0.18	3.12 ± 0.34
	est-1	12.42 ± 1.36	14.23 ± 2.28	13.59 ± 0.21	3.76 ± 0.09

Tabla VIII. Peso seco celular, peso seco libre de cenizas (PSLC), y contenidos celulares de pigmentos de *D. tertiolecta* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

		nitrato	nitrito	urea	amonio
peso seco (pg.cél ⁻¹)	log	83.90 ± 7.35	79.13 ± 0.05	87.97 ± 6.14	105.52 ± 6.87
	est-1	99.04 ± 1.08	101.09 ± 1.24	76.48 ± 0.97	110.52 ± 4.03
PSLC (pg.cél ⁻¹)	log	72.98 ± 5.24	70.63 ± 0.35	79.02 ± 5.51	92.59 ± 6.06
	est-1	83.65 ± 0.75	85.64 ± 0.57	70.70 ± 0.90	103.01 ± 2.30
cenizas (% PS)	log	12.90 ± 1.39	10.74 ± 0.50	10.17 ± 0.23	12.26 ± 0.03
	est-1	15.52 ± 1.68	15.27 ± 1.60	7.55 ± 0.01	6.75 ± 1.32
clorofila a (pg.cél ⁻¹)	log	3.21 ± 0.23	3.03 ± 0.12	3.45 ± 0.15	3.30 ± 0.01
	est-1	1.88 ± 0.07	1.73 ± 0.20	1.75 ± 0.03	3.28 ± 0.07
clorofila b (pg.cél ⁻¹)	log	0.77 ± 0.09	0.74 ± 0.02	0.87 ± 0.05	0.80 ± 0.08
	est-1	0.68 ± 0.03	0.76 ± 0.12	0.77 ± 0.02	1.04 ± 0.02
carotenos (pg.cél ⁻¹)	log	0.90 ± 0.05	0.85 ± 0.03	0.97 ± 0.04	0.94 ± 0.03
	est-1	0.65 ± 0.01	0.63 ± 0.05	0.63 ± 0.01	0.95 ± 0.02

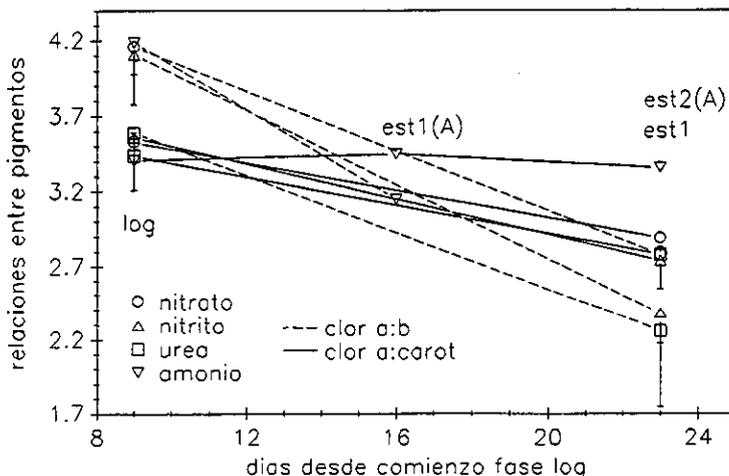


Fig. 7. Relaciones clorofilas *a:b* (trazo discontinuo) y clorofila *a:carotenos* (trazo continuo) en la fase logarítmica (log) e inicio estacionaria (est1) de cultivos de *Dunaliella tertiolecta* con diferentes fuentes de N. est2(A): estacionaria avanzada en los cultivos con amonio.

Tabla IX. Contenido en pigmentos, como porcentaje del PSLC, de *D. tertiolecta* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

		nitrato	nitrito	urea	amonio
clorofila <i>a</i>	log	4.44 ± 0.64	4.29 ± 0.15	4.37 ± 0.19	3.41 ± 0.09
	est-1	2.25 ± 0.06	2.02 ± 0.22	2.47 ± 0.06	3.12 ± 0.07
clorofila <i>b</i>	log	1.08 ± 0.20	1.04 ± 0.03	1.10 ± 0.06	0.86 ± 0.03
	est-1	0.81 ± 0.05	0.89 ± 0.14	1.09 ± 0.08	0.99 ± 0.02
carotenos	log	1.26 ± 0.16	1.20 ± 0.04	1.22 ± 0.05	1.05 ± 0.04
	est-1	0.78 ± 0.01	0.74 ± 0.06	0.89 ± 0.02	0.90 ± 0.02

Al igual que la clorofila *a*, el contenido celular de carotenos decrece con la edad del cultivo para los cultivos con nitrato, nitrito o urea, de 0.85 - 0.97 a 0.63 - 0.65 pg.cel⁻¹ (Tabla VIII) y de 1.2 - 1.3% PSLC a 0.7 - 0.9% PSLC (Tabla IX).

En los cultivos con amonio el contenido celular de clorofila *a* y carotenos se mantiene constante entre la fase log y est-1 (3 días a pH < 5 y en fase estacionaria) (Tabla VIII), produciéndose a continuación la desorganización de los pigmentos celulares que disminuyen a 0.21 ± 0.01 y 0.06 ± 0.01 pg.cel⁻¹ de clorofila *a* y carotenos,

Tabla X. Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de peso seco, y relaciones entre diferentes fracciones de éstos, de *Dunaliella tertiolecta* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento

AG	nitrato				nitrito			
	log		est-1		log		est-1	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	(¹) tr	tr	0.27	0.39	0.23	0.28	0.30	0.48
16:0	12.74	15.51	11.74	16.95	12.32	14.84	14.90	23.68
16:1 ω 9	4.74	5.77	3.96	5.71	4.29	5.18	3.36	5.33
16:2 ω 6	1.32	1.60	0.75	1.09	1.18	1.43	0.58	0.93
16:3 ω 6	0.80	0.98	0.85	1.22	0.73	0.88	0.63	1.00
18:0	tr	tr	0.72	1.04	0.53	0.64	0.56	0.89
16:3 ω 3	3.90	4.74	3.09	4.46	3.42	4.12	2.28	3.62
18:1 ω 9	2.77	3.37	3.84	5.54	2.85	3.43	5.30	8.42
16:4 ω 3	23.40	28.49	22.82	32.93	21.40	25.79	15.58	24.77
18:2 ω 6	4.28	5.21	3.97	5.73	4.47	5.38	5.15	8.18
18:3 ω 6	4.79	5.83	4.33	6.25	5.46	6.57	4.56	7.25
18:3 ω 3	38.89	47.35	39.32	56.74	39.56	47.67	43.34	68.87
18:4 ω 3	2.38	2.90	3.14	4.53	2.57	3.10	1.90	3.01
20:2 ω 6	tr	tr	1.19	1.72	1.00	1.20	1.13	1.80
20:4 ω 6	(²) -	-	tr	tr	-	-	0.43	0.68
total (mg.g ⁻¹ PS):		125.33		144.67		120.51		158.91
%(S+MI):		20.25		20.53		20.22		24.42
%PI:		79.75		79.47		79.78		75.58
(S+MI)/PI:		0.25		0.26		0.25		0.32
ω 6/ ω 3:		0.16		0.16		0.19		0.20

(¹) tr: traza. (²) -: no detectado

AG: ácido graso; S: ácidos grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: poliinsaturados.

respectivamente, a los 10 días en fase estacionaria, con valores 0 de clorofila *b* y un peso celular de 253.11 ± 2.66 pg.cél⁻¹.

La relación clorofilas *a*:*b* disminuye entre ambas fases, desde 3.59 - 4.19 en la fase logarítmica a 2.26 - 3.59 (Fig. 7), correspondiendo los valores más altos en ambas fases a los cultivos con amonio. La relación clorofila *a*:carotenos también disminuye entre ambas fases, de 3.44 - 3.56 a 2.74 - 3.89, excepto para los cultivos con amonio: 3.41 y 3.62 en las fases log y est-1, respectivamente (Fig. 7).

Perfil de ácidos grasos (Tabla X)

El contenido total de ácidos grasos, como mg.g⁻¹ de peso seco, aumenta con el tiempo de cultivo para los cultivos con nitrato y nitrito, alcanzando el máximo

Tabla X (continuación). Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de peso seco, y relaciones entre diferentes fracciones de éstos, de *Dunaliella tertiolecta* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

AG	urea				amonio			
	log		est-1		log		est-1	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	0.19	0.27	0.24	0.27	0.31	0.51	0.45	0.43
16:0	10.84	15.72	12.39	13.71	12.03	19.97	19.19	18.45
16:1 ω 9	3.95	5.72	4.47	4.95	4.53	7.52	6.40	6.15
16:2 ω 6	1.08	1.57	0.96	1.06	0.99	1.64	1.01	0.97
16:3 ω 6	0.94	1.37	1.08	1.20	0.94	1.57	0.72	0.69
18:0	0.52	0.76	0.55	0.61	0.41	0.69	0.46	0.44
16:3 ω 3	4.13	5.99	3.26	3.61	3.84	6.37	2.02	1.94
18:1 ω 9	2.22	3.22	3.45	3.82	2.48	4.11	3.34	3.21
16:4 ω 3	23.94	34.71	21.45	23.74	22.81	37.85	19.49	18.74
18:2 ω 6	4.14	6.00	3.98	4.41	4.80	7.97	4.51	4.33
18:3 ω 6	4.29	6.21	4.48	4.96	3.43	5.69	3.05	2.94
18:3 ω 3	41.54	60.22	40.67	45.02	41.59	69.02	36.69	35.29
18:4 ω 3	1.29	1.87	1.95	2.16	0.99	1.64	1.72	1.66
20:2 ω 6	0.93	1.35	1.05	1.16	0.85	1.41	0.95	0.91
20:4 ω 6	(¹) -	-	-	-	-	-	-	-
total (mg.g ⁻¹ PS):		144.99		110.70		165.95		96.16
%(S+MI):		17.73		21.11		19.76		29.83
%PI:		82.27		78.89		80.24		70.17
(S+MI)/PI:		0.22		0.27		0.25		0.43
ω 6/ ω 3:		0.16		0.17		0.16		0.17

(¹) -: no detectado

AG: ácido graso; S: ácidos grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: poliinsaturados.

al comienzo de la fase estacionaria: 145 - 159 mg.g⁻¹ de PS (Tabla X). En la fase logarítmica las células cultivadas con amonio o urea presentan los contenidos más altos en ácidos grasos, con 145 - 166 mg por gramo de biomasa liofilizada, decreciendo en la fase estacionaria (Tabla X).

El perfil de ácidos grasos de *D. tertiolecta* incluye los siguientes ác. grasos:

*saturados: 14:0, 16:0, 18:0.

*monoinsaturados: 16:1 ω 9, 18:1 ω 9.

*diinsaturados: 16:2 ω 6, 18:2 ω 6, 20:2 ω 6.

*triinsaturados: 16:3 ω 6, 16:3 ω 3, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3.

*tetrainsaturados: 16:4 ω 3, 18:4 ω 3, 20:4 ω 6 (sólo detectado en algunas muestras).

Los principales ácidos grasos cuantitativamente son el 16:0 (10.8 - 19.2% del total de ácidos grasos), 16:1 ω 9 (3.4 - 6.4%), 16:3 ω 3? (2.0 - 4.1%), 16:4 ω 3 (15.6 - 23.9%), 18:1 ω 9 (2.2 - 5.3%), 18:2 ω 6 (4.0 - 5.2%), 18:3 ω 6 (3.1 - 5.5%), 18:3 ω 3 (36.7 - 43.3%), y 18:4 ω 3 (1.0 - 3.1%). Tres ácidos grasos, palmítico, 16:4 ω 3 y α -linolénico representan el 85% del total de ácidos grasos.

La composición de ácidos grasos de *D. tertiolecta* no mostró fuertes variaciones en función de la fuente de N o fase de crecimiento. La relación entre ácidos grasos saturados + monoinsaturados a poliinsaturados, (S+MI)/PI, varía entre 0.22 - 0.25 durante el crecimiento logarítmico, aumentando a 0.26 - 0.43 al inicio de la fase estacionaria.

La relación entre ácidos grasos poliinsaturados de las series ω 6 y ω 3 (ω 6/ ω 3) oscila entre 0.16 - 0.20. Los valores más altos se obtienen durante la fase logarítmica o estacionaria en el medio de nitrito.

El porcentaje de los ácidos grasos saturados mirístico, palmítico y esteárico, así como del monoenoico 18:1 ω 9 alcanza niveles máximos en la fase estacionaria, con excepción del palmítico en los cultivos con nitrato. El porcentaje de 16:1 ω 9 en los cultivos con N oxidado es, sin embargo, superior en la fase logarítmica, mientras es más abundante en la fase estacionaria en los cultivos con N reducido.

Entre los ácidos grasos polienoicos siguen comportamientos dispares. Así, 16:2 ω 6, 16:3 ω 3, 16:4 ω 3, 18:2 ω 6 y 18:3 ω 6 alcanzan valores máximos en la fase logarítmica, o se mantienen constantes entre ambas fases como el 16:2 ω 6, 18:2 ω 6 y 18:3 ω 6 en los cultivos con urea. Los valores más altos de 20:2 ω 6 y 18:4 ω 3 se observan en la fase estacionaria, con excepción del 18:4 ω 3 para los cultivos con nitrito. El α -linolénico es más alto en la fase estacionaria para los cultivos con N oxidado y en la fase logarítmica para los cultivos con N reducido. El araquidónico sólo se detectó en las fase estacionaria de los cultivos con N oxidado.

Los mayores contenidos en ácidos grasos esenciales fueron: α -linoleico, 8.18 mg.g⁻¹ PS (nitrito, fase est-1), γ -linolénico, 7.25 mg.g⁻¹ PS (nitrito, fase est-1) y α -linolénico, 69.02 mg.g⁻¹ PS (amonio, fase log).

Isochrysis galbana (PRYMNESIOPHYCEAE)

Crecimiento

En la fig. 8 se representan las curvas que describen el crecimiento de las poblaciones cultivadas con cada fuente de N, hasta el inicio de la fase estacionaria. El inóculo proviene de un cultivo creciendo en nitrato, y las poblaciones entran en crecimiento exponencial sin fase de latencia previa, independientemente de la nueva fuente de N metabolizada.

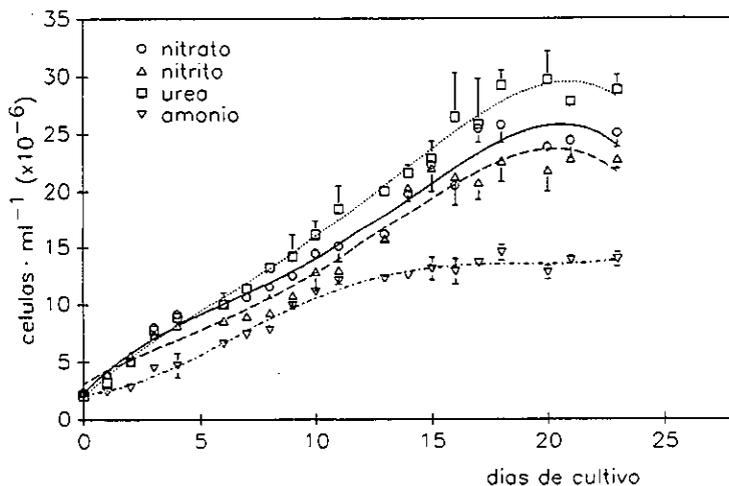


Fig. 8. Crecimiento de *Isochrysis galbana* cultivada con diferentes fuentes de N.

Con las diferentes fuentes de N se obtienen tasas de crecimiento medias similares, entre 0.18 y 0.22 doblajes d^{-1} ($P = 0.07$) (Tabla XI). Los cultivos con nitrato, nitrito o urea presentaron tasas de crecimiento máximas más altas que aquellos con amonio (Tabla XI). La tasa de crecimiento máxima registrada fue de 0.78 en los cultivos con nitrato. El período de crecimiento máximo es de 15-18 días, descendiendo a 13 días para los cultivos con amonio (Tabla XI).

Los cultivos con nitrato muestran un incremento significativo en la densidad celular entre las fases est-1 y est-2 ($P < 0.001$), mientras en las demás fuentes de N la densidad permanece constante ($P > 0.1$). La densidad celular en la fase estacionaria (fases est-1 y est-2) es afectada por la fuente de N ($P < 0.001$); mientras al comienzo de la fase estacionaria los cultivos con urea presentan las mayores densidades celulares (Fig. 8), son los cultivos con nitrato los que

Tabla XI. Tasa de crecimiento (k), duración de la fase logarítmica (PCM), densidad celular en fase estacionaria y pH final en cultivos de *Isochrysis galbana* con diferentes fuentes de N.

	nitrato	nitrito	urea	amonio
k media (d^{-1})	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.01
k máxima (d^{-1})	0.78	0.76	0.73	0.40
PCM (días)	18	15	18	12-13
células. ml^{-1} ($\times 10^{-6}$)	31.95 ± 3.24	26.57 ± 5.77	27.79 ± 0.49	13.85 ± 0.35
pH final	8.80	8.87	8.73	6.01

presentan las densidades más altas al final del cultivo (Tabla XI). En ambas fases, los cultivos con amonio presentan las menores densidades celulares.

En los cultivos con amonio el crecimiento es acompañado por un descenso del pH, que toma valores de 7.2 al inicio de la fase estacionaria y de 6.0 al final del cultivo (Fig. 9).

Rendimientos por unidad de volumen de cultivo (Tabla XII)

Para todas las fuentes de N, la producción de biomasa y constituyentes macromoleculares por unidad de volumen de cultivo aumenta a lo largo de la fase estacionaria, con excepción de la clorofila *c*, cuyo máximo se alcanza al comienzo de la fase estacionaria, manteniéndose constante o decreciendo posteriormente.

En los cultivos con nitrato se producen los máximos rendimientos en biomasa seca (PS) y materia orgánica (PSLC) tanto al comienzo de la fase estacionaria (fase est-1) como en la fase est-2: 1.19 y 2.48 $g.l^{-1}$ de materia seca y 1.00 y 2.08 $g.l^{-1}$ de materia seca libre de cenizas, respectivamente. Los medios con nitrato o urea no presentan diferencias significativas en la fase est-1. Los menores rendimientos se obtienen en los cultivos con amonio en ambas fases.

Los rendimientos de pigmentos, proteína y carbohidratos en los medios de nitrato o urea no difieren significativamente al alcanzarse la fase estacionaria (est-1) (test de Duncan, $\alpha = 0.05$). El rendimiento en proteína no difiere del obtenido en el medio de nitrito. Los mayores rendimientos en lípidos y ARN se obtienen en el medio de urea.

En la fase est-2, no se observan diferencias significativas en la producción de proteína, carbohidratos, lípidos y ARN entre los medios con nitrito o urea. Para

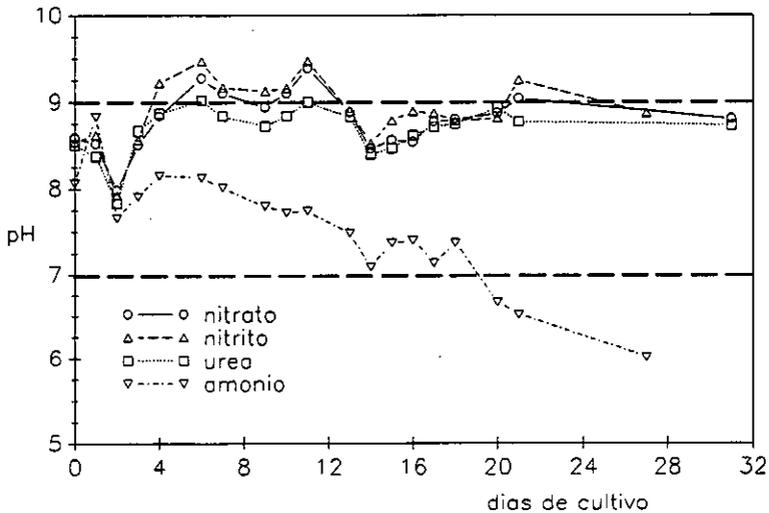


Fig. 9. Evolución temporal del pH extracelular en cultivos de *I. galbana* con diferentes fuentes de N.

todos los constituyentes las mayores producciones se alcanzan en los cultivos con nitrato. En el medio con urea, se obtienen las mayores producciones de pigmentos (clorofilas *a* y *c*, y carotenos).

Composición celular

El peso seco celular (PS) y peso seco libre de cenizas (PSLC) son afectados por la variación en la fuente de N metabolizada ($P < 0.001$), y por la fase de crecimiento ($P < 0.001$). Para todas las fuentes, el peso seco aumenta con la edad del cultivo, desde 38 - 53 pg.cel^{-1} en la fase logarítmica hasta 56 - 83 pg.cel^{-1} al final del cultivo (Tabla XIII). El mismo comportamiento muestra el peso seco libre de cenizas (PSLC), aumentando de 30 - 40 pg.cel^{-1} a 45 - 68 pg.cel^{-1} (Tabla XIII). El PS y PSLC en las fases log y est-1 no difieren significativamente, produciéndose el incremento a lo largo de la fase estacionaria. En la fase est-2, el peso seco y la materia orgánica son significativamente más altos en los cultivos con nitrato o urea que en aquellos con nitrito o amonio.

El contenido celular de pigmentos (clorofilas *a* y *c*, y carotenos) presenta variaciones significativas en función de la fuente de N, fase de crecimiento e interacción significativa entre ambos factores. Los mayores contenidos celulares de clorofila *a* y carotenos se observan al final del cultivo (fase est-2) para las células

Tabla XII. Día de análisis, producciones de biomasa seca, materia orgánica (PSLC), pigmentos y constituyentes macromoleculares en cultivos de *Isochrysis galbana* con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y fase estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrite	urea	amonio
día desde inicio fase	log	7	7	7	7
	est-1	21	18	21	18
	est-2	31	27	31	27
peso seco (g.l ⁻¹)	log	0.50±0.02	0.48±0.02	0.47±0.02	0.28±0.02
	est-1	1.19±0.04	1.02±0.02	1.19±0.06	0.54±0.02
	est-2	2.48±0.59	1.70±0.20	2.16±0.11	0.74±0.08
PSLC (g.l ⁻¹)	log	0.36±0.01	0.36±0.03	0.35±0.03	0.22±0.02
	est-1	1.00±0.03	0.86±0.02	0.98±0.05	0.42±0.02
	est-2	2.08±0.50	1.43±0.17	1.77±0.09	0.58±0.06
clorofila a (mg.l ⁻¹)	log	2.10±0.09	1.90±0.15	2.71±0.18	1.38±0.08
	est-1	3.49±0.07	3.12±0.43	3.73±0.17	2.57±0.21
	est-2	13.18±1.50	4.06±0.54	18.63±1.38	2.73±0.03
clorofila c (mg.l ⁻¹)	log	0.17±0.01	0.1±0.01	0.37±0.04	n.c. ⁽¹⁾
	est-1	1.72±0.11	0.85±0.20	1.31±0.17	0.56±0.08
	est-2	0.95±0.01	0.85±0.34	1.45±0.03	0.42±0.01
carotenos (mg.l ⁻¹)	log	1.60±0.15	1.46±0.10	2.07±0.16	1.13±0.04
	est-1	3.07±0.08	2.86±0.32	3.40±0.16	2.58±0.16
	est-2	17.49±0.42	4.27±0.20	24.72±0.01	3.29±0.15
proteínas (mg.l ⁻¹)	log	64.89±3.81	70.02±4.36	87.69±5.10	56.07±4.36
	est-1	147.76±18.84	145.23±21.35	137.18±10.01	78.09±8.56
	est-2	278.05±29.96	208.79±7.70	201.08±5.85	- ⁽²⁾
carbohidratos (mg.l ⁻¹)	log	27.64±2.06	29.31±1.37	34.03±1.35	21.45±1.70
	est-1	106.67±17.10	77.38±10.77	100.21±4.79	38.25±1.46
	est-2	245.25±35.12	198.23±26.34	192.25±9.46	-
lípidos (mg.l ⁻¹)	log	79.13±2.24	98.43±2.63	111.87±2.11	64.77±1.75
	est-1	341.33±9.94	287.34±8.85	413.95±8.57	128.11±3.10
	est-2	789.61±19.91	607.27±18.91	555.68±16.07	-
ARN (mg.l ⁻¹)	log	25.09±0.58	25.61±0.57	29.99±0.23	19.85±0.61
	est-1	60.22±2.47	56.97±1.67	82.34±2.38	32.00±1.07
	est-2	116.04±12.13	89.56±1.79	90.75±6.78	-

⁽¹⁾ n.c.: valor negativo mediante análisis espectrofotométrico. ⁽²⁾ -: no determinado.

cultivadas en nitrato o urea, siendo los contenidos celulares al comienzo de la fase estacionaria inferiores a aquellos de la fase logarítmica (Tabla XIII). En los cultivos con nitrito se observó también un mínimo al inicio de la fase estacionaria. En los cultivos con amonio, los contenidos celulares de clorofila *a* se mantienen constantes a lo largo del cultivo, mientras los de carotenos aumentan continuamente. Para la fase log, el efecto de la fuente de N sobre el contenido de clorofila *a* y carotenos, puede ordenarse: urea > nitrito = nitrato = amonio, según el test de Duncan al nivel 0.05; en la fase est-2 el resultado del test estadístico es: urea > nitrato > amonio = nitrito.

El porcentaje que la clorofila *a* y carotenos representa en la materia orgánica no sigue tendencias uniformes. En los cultivos con nitrato y urea alcanzan un mínimo en la fase est-1 (Tabla XIV). En los cultivos con nitrito y amonio la clorofila *a* decrece a lo largo de la fase estacionaria, mientras los carotenos se mantienen constantes (Tabla XIV).

Los contenidos celulares de clorofila *c* son significativamente más altos en la fase estacionaria que durante el crecimiento logarítmico, y, excepto para la urea, decrecen entre las fases est-1 y est-2 (Tabla XIII). Su porcentaje respecto al PSLC aumenta del 0.03 - 0.11% en la fase logarítmica al 0.10 - 0.17% al comienzo de la fase estacionaria, decreciendo posteriormente al 0.05 - 0.08% en la fase est-2 (Tabla XIV).

La relación clorofila *a*:carotenos disminuye constantemente con la edad del cultivo, desde 1.22 - 1.32 en la fase logarítmica a 0.74 - 0.94 en la fase est-2 (Fig. 10). La relación clorofilas *a*:*c* decrece entre las fases log y est-1 desde 7.31 - 20.39 a 2.08 - 4.54, y aumenta posteriormente a 5.43 - 14.68 en la fase est-2 (Fig. 10).

La **proteína** celular es afectada tanto por la fuente de N ($P < 0.001$) como por la fase de crecimiento ($P < 0.001$). Para cada fuente de N, el contenido celular en pg. cel^{-1} alcanza su valor mínimo al comienzo de la fase estacionaria, aumentando luego a valores similares a los de la fase logarítmica (Tabla XIII). No obstante, cuando se expresa como porcentaje del PSLC, la proteína decrece continuamente a lo largo del cultivo, de 17.9 - 25.4% PSLC en la fase log a 11.4 - 14.3% en la fase est-2 (Tabla XIV). Durante el crecimiento logarítmico y en la fase est-2 no existen diferencias significativas entre las diferentes fuentes de N ($P > 0.1$), presentando los cultivos con nitrato y nitrito mayores contenidos celulares al comienzo de la fase estacionaria ($P < 0.001$).

Tabla XIII. Peso seco, peso seco libre de cenizas (PSLC), y contenidos celulares de pigmentos y constituyentes macromoleculares de *Isochrysis galbana* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y fase estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrato	nitrito	urea	amonio
peso seco (pg.cel ⁻¹)	log	47.50 ± 1.65	53.38 ± 0.95	41.05 ± 0.16	37.83 ± 3.20
	est-1	49.00 ± 1.47	44.68 ± 0.45	42.68 ± 1.29	39.16 ± 0.27
	est-2	76.46 ± 10.78	65.40 ± 6.48	83.44 ± 2.19	56.46 ± 4.41
PSLC (pg.cel ⁻¹)	log	34.20 ± 1.28	40.03 ± 2.51	30.38 ± 2.76	30.27 ± 3.39
	est-1	41.16 ± 1.25	37.53 ± 0.47	35.42 ± 1.12	30.55 ± 0.60
	est-2	64.23 ± 9.07	54.94 ± 5.46	68.42 ± 2.00	44.60 ± 3.66
cenizas (% PS)	log	27.82 ± 1.29	24.82 ± 1.21	25.83 ± 0.10	20.20 ± 2.62
	est-1	15.73 ± 0.20	16.25 ± 0.75	17.25 ± 0.24	21.99 ± 0.31
	est-2	16.21 ± 0.65	16.24 ± 0.72	17.81 ± 0.50	
clorofila a (pg.cel ⁻¹)	log	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.19 ± 0.01
	est-1	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.00	0.19 ± 0.01
	est-2	0.46 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.72 ± 0.04	0.21 ± 0.01
clorofila c (fg.cel ⁻¹)	log	16.33 ± 1.29	10.78 ± 0.91	32.77 ± 2.76	n.c.
	est-1	70.70 ± 0.30	37.31 ± 8.25	47.09 ± 5.16	40.25 ± 4.45
	est-2	31.49 ± 1.34	30.49 ± 6.21	56.11 ± 2.40	32.24 ± 0.12
carotenos (pg.cel ⁻¹)	log	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.01
	est-1	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.01
	est-2	0.62 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.95 ± 0.02	0.25 ± 0.02
proteínas (pg.cel ⁻¹)	log	6.13 ± 0.26	7.83 ± 0.37	7.70 ± 0.48	7.56 ± 0.44
	est-1	6.06 ± 0.54	6.37 ± 0.62	4.94 ± 0.35	5.64 ± 0.52
	est-2	8.70 ± 0.76	7.86 ± 0.19	7.76 ± 0.16	-
carbohidratos (pg.cel ⁻¹)	log	2.61 ± 0.14	3.28 ± 0.12	2.99 ± 0.13	2.89 ± 0.17
	est-1	4.38 ± 0.49	3.39 ± 0.31	3.61 ± 0.17	2.76 ± 0.09
	est-2	7.68 ± 0.89	7.46 ± 0.65	7.42 ± 0.26	-
lípidos (pg.cel ⁻¹)	log	7.48 ± 0.15	11.01 ± 0.22	9.82 ± 0.20	8.74 ± 0.18
	est-1	14.01 ± 0.29	12.60 ± 0.26	14.90 ± 0.30	9.25 ± 0.19
	est-2	24.72 ± 0.50	22.86 ± 0.47	21.45 ± 0.44	-
ARN (pg.cel ⁻¹)	log	2.37 ± 0.04	2.86 ± 0.05	2.63 ± 0.02	2.68 ± 0.06
	est-1	2.47 ± 0.07	2.50 ± 0.05	2.96 ± 0.08	2.31 ± 0.07
	est-2	3.63 ± 0.31	3.37 ± 0.04	3.50 ± 0.18	-

n.c.: no cuantificable mediante el método espectrofotométrico.

Tabla XIV. Composición bioquímica, como porcentaje del PSLC, de *Isochrysis galbana* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y fase estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrato	nitrito	urea	amonio
clorofila <i>a</i>	log	0.58 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0.61 ± 0.06
	est-1	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.00	0.61 ± 0.02
	est-2	0.72 ± 0.15	0.28 ± 0.00	1.05 ± 0.02	0.47 ± 0.04
clorofila <i>c</i>	log	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.11 ± 0.01	n.c.
	est-1	0.17 ± 0.00	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01
	est-2	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00
carotenos	log	0.44 ± 0.02	0.40 ± 0.00	0.59 ± 0.02	0.50 ± 0.04
	est-1	0.31 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.00	0.62 ± 0.01
	est-2	0.97 ± 0.12	0.31 ± 0.02	1.39 ± 0.06	0.56 ± 0.07
proteínas	log	17.94 ± 0.79	19.56 ± 1.23	25.35 ± 0.83	24.98 ± 1.24
	est-1	14.73 ± 0.94	16.97 ± 0.96	13.94 ± 1.49	18.46 ± 1.54
	est-2	13.55 ± 1.31	14.31 ± 1.41	11.35 ± 1.51	-
carbohidratos	log	7.64 ± 0.43	8.19 ± 0.50	9.84 ± 0.44	9.56 ± 0.53
	est-1	10.64 ± 0.48	9.04 ± 0.45	10.18 ± 0.49	9.04 ± 0.35
	est-2	11.95 ± 0.47	13.58 ± 0.50	10.85 ± 0.47	-
lípidos	log	21.87 ± 0.47	27.50 ± 3.11	32.33 ± 0.58	28.86 ± 0.58
	est-1	34.03 ± 0.58	33.58 ± 0.58	42.05 ± 0.51	30.28 ± 1.60
	est-2	38.49 ± 0.51	41.61 ± 0.51	31.36 ± 0.98	-
ARN	log	6.94 ± 0.12	7.16 ± 0.13	8.67 ± 0.13	8.84 ± 0.12
	est-1	6.01 ± 0.13	6.66 ± 0.13	8.36 ± 0.28	7.56 ± 0.26
	est-2	5.66 ± 0.20	6.14 ± 0.18	5.12 ± 0.23	-

Los cultivos en medio con amonio en fase est-2 no fueron analizados para constituyentes macromoleculares. En estos cultivos, dada la baja biomasa y el bajo volumen de cultivo restante en la fase est-2 y el interés en analizar los ácidos grasos, se recogió la biomasa y se sometió a liofilización. Los análisis en los que hemos pretendido comparar la determinación de proteína y lípidos a partir de biomasa fresca congelada inmediatamente y material liofilizado han dado resultados muy diferentes, particularmente una infraestimación de ambos componentes cuando se analizan a partir de material liofilado. La comparación de resultados obtenidos a partir de biomasa procesada de diferentes modos resulta así difícil.

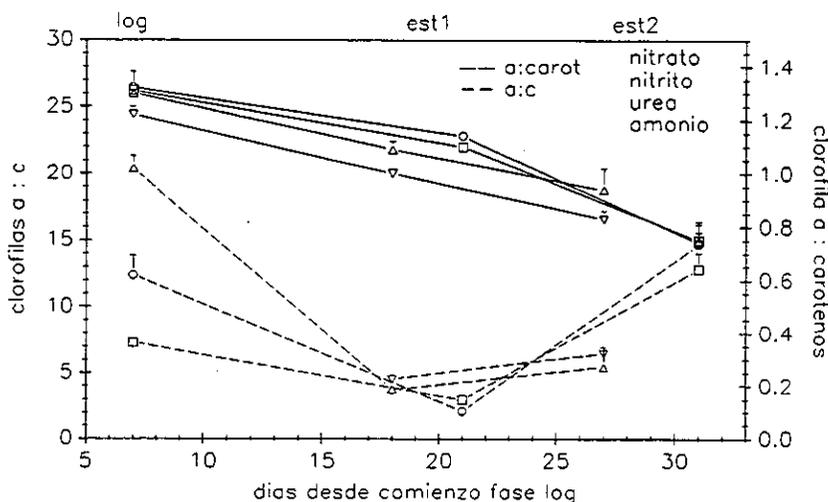


Fig. 10. Evolución temporal de las relaciones entre pigmentos en cultivos de *Isochrysis galbana* con diferentes fuentes de N. Para cada fuente de N, se representan las fases log, inicio de la fase estacionaria (est-1) y fase estacionaria avanzada (est-2).

Los **carbohidratos** presentan variaciones significativas principalmente en función de la fase de crecimiento ($P < 0.001$), con ligeras variaciones en función de la fuente de N ($P = 0.01$). El contenido celular de carbohidratos aumenta continuamente a lo largo del período de cultivo, desde 2.61 - 3.28 pg.cel^{-1} en la fase log hasta 7.42 - 7.68 pg.cel^{-1} en la fase est-2 (Tabla XIII). Respecto a la materia orgánica celular total, los carbohidratos aumentan del 7.6 - 9.8% al 10.9 - 13.6% entre ambas fases (Tabla XIV).

El contenido celular de **lípidos** aumenta también continuamente a lo largo del período de cultivo, desde 7.48 - 11.01 pg.cel^{-1} en la fase log hasta 21.45 - 24.72 pg.cel^{-1} en la fase est-2 (Tabla XIII). El porcentaje que los lípidos representan de la materia orgánica aumenta progresivamente desde el 21.9 - 32.3% en la fase logarítmica hasta el 31.4 - 41.6% al final del cultivo (Tabla XIV). Al comienzo de la fase estacionaria los cultivos con urea presentan los mayores contenidos de lípidos (42.1% PSLC; Tabla XIV), así como de ácidos grasos (Tabla XV). Sin embargo, al final del cultivo son los cultivos con nitrato y nitrito los que presentan los mayores contenidos de lípidos (38.5- 41.6% PSLC) frente al 31.4% en el medio de urea.

Los contenidos celulares de ARN no difieren significativamente ($P > 0.05$) entre el crecimiento exponencial y el comienzo de la fase estacionaria, incrementándose posteriormente durante la fase estacionaria (Tabla XIII). Su

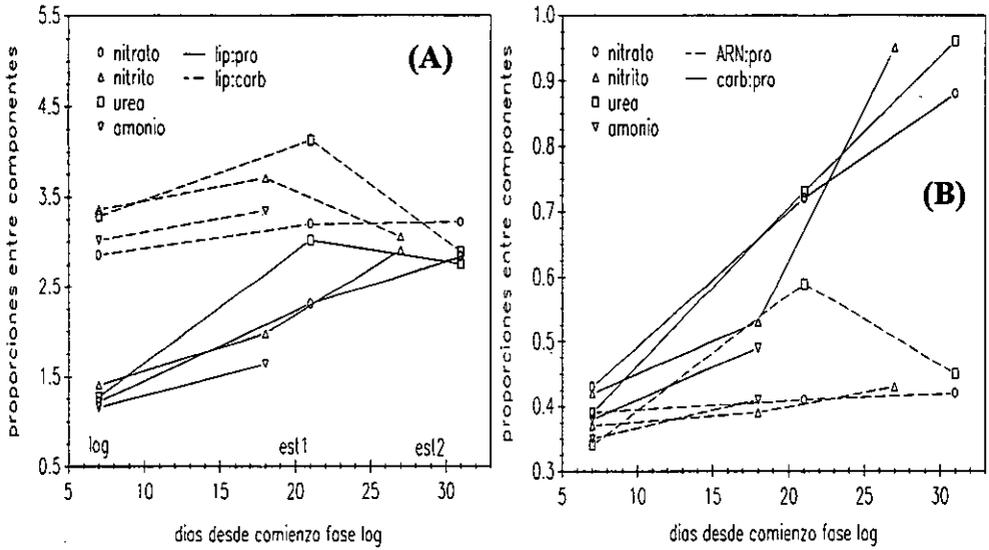


Fig. 11. Evolución temporal de las relaciones entre constituyentes macromoleculares en cultivos de *Isochrysis galbana* con diferentes fuentes de N. Para cada fuente de N, se representan las fases log, inicio de la fase estacionaria (est1) y estacionaria avanzada (est2). carb: carbohidratos; lip: lípidos; pro: proteínas.

contenido como porcentaje del PSLC decrece constantemente a lo largo del cultivo, del 6.9 - 8.8% en la fase log al 5.1 - 6.1 en la fase est-2 (Tabla XIV). El valor de significación para la F referida a las variaciones en los contenidos (pg.cél⁻¹) de ARN en función de la fuente de N ($P = 0.02$) no permite afirmar la existencia de diferencias entre las medias. No obstante, las células cultivadas con amonio o urea presentan contenidos de ARN más altos (como % PSLC) durante el crecimiento logarítmico y comienzo de la fase estacionaria (Tabla XIV).

La relación lípidos:proteínas aumenta con el ciclo de crecimiento del cultivo, desde 1.16 - 1.41 durante el crecimiento exponencial hasta 2.76 - 2.91 en la fase est-2 (Fig. 11A). La relación lípidos:carbohidratos alcanza valores máximos (3.20 - 3.71) al comienzo (nitrito, urea) o final (nitrato) de la fase estacionaria (Fig. 11A). La relación carbohidratos:proteínas aumenta con la edad del cultivo, de 0.38 - 0.42 a 0.88 - 0.96 al final del cultivo (Fig. 11B). La relación ARN:proteínas es ligeramente mayor durante la fase estacionaria (0.39 - 0.45) que durante el crecimiento exponencial (0.34 - 0.39) (Fig. 11B).

Perfil de ácidos grasos (Tabla XV)

El contenido total de ácidos grasos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) aumenta con el tiempo de cultivo, alcanzando valores máximos durante la fase estacionaria. En la fase logarítmica el contenido en ácidos grasos varió entre 103 - 127 mg por g de peso seco (Tabla XV). Los contenidos celulares en la fase estacionaria aumentan a 133 - 201 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS (fase est-1), variando al final del cultivo entre 140 - 177 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS.

El perfil de ácidos grasos de *Isochrysis galbana* incluye los siguientes ácidos grasos:

*saturados: 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0.

*monoinsaturados: 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 18:1 ω 9, 18:1 ω 7, 20:1 ω 9.

*diinsaturados: 16:2 ω 6, 16:2 ω 4, 18:2 ω 6, 20:2 ω 6.

*triinsaturados: 16:3 ω 6, 16:3 ω 4, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3, 20:3 ω 6.

*tetrainsaturados: 18:4 ω 3, 20:4 ω 6 y 20:4 ω 3.

*pentainsaturados: 20:5 ω 3 y 22:5 ω 3.

*hexainsaturados: 22:6 ω 3.

Se observan además cuatro ácidos grasos, dos no identificados y dos identificados presuntivamente como 18:4 ω 1 y 21:5 ω 3 por comparación con el patrón cualitativo PUFA-3. Por otra parte, en las presentes condiciones de análisis se produce la coelución de 20:0 y 18:3 ω 4, no siendo resolubles en cantidades traza.

Los principales ácidos grasos cuantitativamente son el 14:0 (9.7 - 19.9% del total), 16:0 (12.2 - 18.8%), 16:1(ω 9+ ω 7) (10.9 - 25.8%), 18:1 ω 9 (1.2 - 2.4%), 18:1 ω 7 (1.2 - 4.1%), 18:2 ω 6 (0.3 - 2.0%), 18:3 ω 3 (0.7 - 1.9%), 18:4 ω 3 (7.1 - 16.3%), 20:5 ω 3 (12.8 - 27.7%) y 22:6 ω 3 (5.1 - 14.1%).

El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados totales alcanza sus valores máximos al comienzo de la fase estacionaria (excepto para los cultivos con amonio), cuando representan el 48.7 - 62.3% del total de ácidos grasos. Por ello la relación de ácidos grasos saturados + monoinsaturados (S+MI) a poliinsaturados (PI) alcanza su valor mínimo (0.61 - 1.05) al comienzo de la fase estacionaria, excepto para los cultivos con amonio en los que los poliinsaturados alcanzan su valor máximo al final del cultivo.

La relación entre ácidos grasos poliinsaturados de las series ω 6 y ω 3 (ω 6/ ω 3) alcanza también un mínimo en la fase est-1 en los cultivos con N oxidado o urea:

toma valores entre 0.07 y 0.13 en las fases log y est-2, y 0.03-0.04 en la fase est-1. En los cultivos con amonio el valor de esta relación cae continuamente con la edad del cultivo.

Los perfiles de ácidos grasos de las células cultivadas con nitrato o nitrito son muy similares a lo largo de todo el ciclo de crecimiento. Los cultivos con urea y amonio difieren ligeramente respecto a ellos. Los cultivos con urea presentan mayores contenidos de ácidos grasos saturados y monoinsaturados que aquellos con fuentes de N oxidadas durante el crecimiento logarítmico, y mayores contenidos de poliinsaturados durante la fase estacionaria. Los cultivos con amonio presentan mayores contenidos de ácidos grasos poliinsaturados durante todo el ciclo de crecimiento.

El contenido (% del total) en mirístico (14:0) decrece continuamente a lo largo del ciclo de crecimiento. Pentadecanoico (15:0), hexadecanoico (16:1) y vaccénico (18:1 ω 9) aumentan continuamente, excepto el 16:1 en los cultivos con amonio donde los valores más altos se observaron en la fase log. Palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1 ω 7) y *cis*-11-eicosenoico (20:1 ω 9) alcanzan un mínimo al comienzo de la fase estacionaria, y los valores más altos al final del cultivo, excepto el esteárico y eicosenoico en los cultivos con nitrito, con valores máximos en la fase log.

Los valores más altos de los ácidos grasos diinsaturados *cis*-7,10-hexadecadienoico (16:2 ω 6), *cis*-9,12-hexadecadienoico (16:2 ω 4) y α -linoleico (18:2 ω 6) se observan durante el crecimiento logarítmico, excepto los dos primeros en el medio con urea que alcanzan valores máximos al comienzo de la fase estacionaria (fase est-1). El contenido más alto en eicosadienoico (20:2 ω 6) se observa en fases diferentes según la fuente de N.

Entre los trienoicos, 16:3 ω 6, y 20:3 ω 6 alcanzan los valores más altos (% del total) en la fase estacionaria, y el γ -linolénico en la fase logarítmica. El máximo en α -linolénico se observó en la fase logarítmica en los medios con N oxidado, y en la fase est-1 en los medios con N reducido. El 16:3 ω 4 sólo aparece en cantidades traza.

El contenido más alto en *cis*-6,9,12,15-octadecatetraenoico (18:4 ω 3) se observa en la fase est-1 para todas las fuentes de N. El *cis*-8,11,14,17-eicosatetraenoico (20:4 ω 3) sólo aparece en trazas, mientras el *cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoico (20:4 ω 6) tiende a aparecer en mayores porcentajes durante la fase estacionaria.

Tabla XV. Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de PS, de *Isochrysis galbana* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y fase estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

AG	nitrato						nitrito					
	log		est1		est2		log		est1		est2	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	19.23	22.96	14.44	21.21	10.27	18.22	18.51	23.17	12.70	23.20	12.50	18.28
15:0	0.26	0.31	0.27	0.39	0.32	0.56	0.21	0.26	0.22	0.39	0.33	0.49
16:0	14.94	17.84	12.58	18.48	18.62	33.05	13.86	17.35	12.58	22.98	18.81	27.51
16:1 ω 7	20.50	24.48	19.43	28.54	24.59	43.63	20.55	25.72	19.09	34.87	25.84	37.79
16:2 ω 7	0.41	0.49	0.33	0.49	0.22	0.39	0.40	0.50	0.34	0.62	0.20	0.29
16:2 ω 4	0.41	0.49	0.16	0.23	0.14	0.25	0.42	0.53	0.17	0.31	0.14	0.21
16:3 ω 6	⁽¹⁾ tr	tr	0.16	0.23	0.10	0.17	-	-	-	-	0.40	0.58
18:0	0.52	0.62	0.42	0.62	0.67	1.20	0.79	0.99	0.20	0.37	0.54	0.79
16:3 ω 4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.13	0.24	tr	tr
18:1 ω 9	1.78	2.12	1.41	2.08	2.37	4.20	1.48	1.85	1.29	2.35	2.02	2.95
18:1 ω 7	1.76	2.10	1.68	2.47	3.88	6.89	1.99	2.49	2.11	3.85	4.08	5.97
18:2 ω 6	2.00	2.39	0.68	1.00	1.23	2.17	1.95	2.44	0.91	1.65	1.10	1.61
18:3 ω 6	0.54	0.64	0.33	0.49	0.41	0.72	0.96	1.21	0.26	0.47	1.18	1.72
20:0+18:3 ω 4+20:2	0.35	tr	tr	0.22	0.40	-	-	-	-	-	0.73	1.06
18:3 ω 3	1.37	1.63	1.23	1.81	0.68	1.21	1.04	1.30	1.03	1.88	0.73	1.06
20:1 ω 9	tr	tr	tr	tr	0.25	0.45	1.24	1.55	0.13	0.24	0.27	0.40
18:4 ω 3	12.03	14.37	14.28	20.99	8.30	14.73	11.71	14.65	13.99	25.55	7.06	10.33
18:4 ω 1	0.51	0.60	0.89	1.31	0.38	0.67	0.43	0.53	0.16	0.29	0.38	0.55
20:2 ω 6	0.41	0.49	tr	tr	0.39	0.70	tr	tr	0.14	0.26	0.35	0.51
20:3 ω 6	⁽²⁾ -	-	-	-	0.34	0.60	-	-	-	-	0.19	0.27
Δ 2.28 ⁽³⁾	0.54	0.65	1.07	1.58	tr	tr	1.53	1.91	0.41	0.76	1.60	2.34
20:4 ω 6	tr	tr	tr	tr	0.31	0.55	1.04	1.31	0.28	0.51	0.33	0.48
Δ 2.45	tr	tr	1.08	1.59	0.92	1.63	-	-	-	-	0.63	0.92
20:4 ω 3	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr
20:5 ω 3	14.64	17.48	19.09	28.05	16.14	28.63	14.94	18.69	22.74	41.54	13.10	19.16
21:5 ω 3	2.23	2.66	1.49	2.19	0.51	0.90	0.65	0.81	0.98	1.79	1.15	1.68
22:5 ω 3	-	-	1.11	1.64	0.48	0.86	-	-	-	-	0.51	0.75
22:6 ω 3	5.64	6.74	7.85	11.54	8.26	14.67	6.30	7.89	10.14	18.53	5.85	8.56
total (mg.g ⁻¹ PS)	119.42		146.92		177.45		125.16		182.65		146.24	
%(S+MI):	59.30		51.33		61.54		59.54		48.52		65.86	
%PI:	40.70		48.67		38.46		40.46		51.48		34.14	
(S+MI)/PI:	1.46		1.05		1.60		1.47		0.94		1.93	
ω 6/ ω 3:	0.09		0.03		0.09		0.13		0.04		0.13	

⁽¹⁾ tr: traza; ⁽²⁾ -: no detectado; ⁽³⁾ Δ i: no identificado, siendo i el tiempo de retención relativo.

AG: ácido graso; S: ác. grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: polinsaturados.

Tabla XV (continuación). Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de PS, de *Isochrysis galbana* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio fase estacionaria (est-1) y fase estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

AG	urea						amonio					
	log		est1		est2		log		est1		est2	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	19.93	20.44	10.25	20.57	9.80	14.82	14.13	17.98	12.36	16.40	9.69	13.59
15:0	0.29	0.30	0.24	0.49	0.34	0.52	0.24	0.31	0.26	0.34	0.30	0.42
16:0	17.74	18.19	12.17	24.44	18.00	27.24	15.28	19.45	15.83	21.00	15.79	22.13
16:1 ω 7	19.92	20.43	12.43	24.96	21.58	32.65	16.01	20.37	13.80	18.31	10.93	15.31
16:2 ω 7	0.32	0.33	0.41	0.82	0.28	0.42	0.27	0.34	0.22	0.29	0.10	0.15
16:2 ω 4	0.45	0.46	0.11	0.23	0.09	0.14	0.16	0.21	0.19	0.26	tr	tr
16:3 ω 6	⁽¹⁾ tr	tr	0.11	0.22	0.14	0.21	0.12	0.15	-	-	0.13	0.18
18:0	tr	tr	0.15	0.31	0.52	0.78	0.37	0.48	0.38	0.51	0.48	0.67
16:3 ω 4	tr	tr	0.07	0.13	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-
18:1 ω 9	1.53	1.57	1.17	2.34	2.07	3.14	1.39	1.77	1.63	2.16	1.59	2.23
18:1 ω 7	1.79	1.84	1.17	2.34	2.66	4.02	1.49	1.90	2.02	2.68	4.08	5.71
18:2 ω 6	2.01	2.06	0.43	0.86	0.96	1.45	1.60	2.04	0.84	1.12	0.28	0.39
18:3 ω 6	0.61	0.63	0.20	0.40	0.35	0.54	0.39	0.49	0.23	0.30	0.28	0.39
20:0+18:3 ω 4	0.37	0.38	-	-	-	-	0.21	0.27	tr	tr	-	-
18:3 ω 3	1.19	1.22	1.88	3.78	0.67	1.01	1.13	1.44	1.27	1.68	0.74	1.04
20:1 ω 9	tr	tr	tr	tr	0.15	0.22	0.17	0.21	0.11	0.14	0.20	0.27
18:4 ω 3	12.13	12.44	15.37	30.87	9.78	14.79	13.89	17.68	16.27	21.58	13.02	18.25
18:4 ω 1	tr	tr	-	-	tr	tr	0.38	0.48	-	-	-	-
20:2 ω 6	tr	tr	0.34	0.69	0.15	0.23	0.43	0.55	tr	tr	tr	tr
20:3 ω 6	⁽²⁾ -	-	-	-	0.45	0.68	-	-	-	-	-	-
Δ 2.28 ⁽³⁾	2.15	2.20	0.41	0.83	-	-	0.34	0.43	0.81	1.08	1.14	1.60
20:4 ω 6	tr	tr	0.34	0.69	0.43	0.65	0.26	0.33	0.41	0.55	0.39	0.55
Δ 2.45	-	-	tr	tr	0.75	1.14	-	-	-	-	-	-
20:4 ω 3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
20:5 ω 3	12.76	13.09	27.66	55.55	19.69	29.79	20.74	26.39	23.24	30.84	25.70	36.02
21:5 ω 3	1.65	1.69	0.95	1.92	0.64	0.96	1.07	1.36	0.77	1.02	1.27	1.78
22:5 ω 3	-	-	-	-	0.56	0.85	-	-	-	-	tr	tr
22:6 ω 3	5.14	5.28	14.13	28.37	9.94	15.04	9.93	12.63	9.37	12.44	13.90	19.48
total(mg.g ⁻¹ PS)	102.55		200.82		151.30		127.27		132.70		140.16	
% S+MI:	62.54		37.73		55.54		49.25		46.76		43.55	
% PI:	37.46		62.27		44.46		50.75		53.24		56.45	
(S+MI)/PI:	1.67		0.61		1.25		0.97		0.88		0.77	
w6/w3:	0.09		0.03		0.07		0.07		0.03		0.02	

⁽¹⁾ tr: traza; ⁽²⁾ -: no detectado; ⁽³⁾ Δ i: no identificado, siendo i el tiempo de retención relativo.

AG: ácido graso; S: ác. grasos saturados; PI: monoinsaturados; PI: polinsaturados.

Los contenidos más altos (% del total) de eicosapentaenoico (20:5 ω 3), docosapentaenoico (22:5 ω 3) y docosahexaenoico (22:6 ω 3) se observan durante la fase estacionaria.

El contenido en 14:0 (mg.g⁻¹ de PS), así como en 16:1 en el medio de amonio, decrecen continuamente a lo largo del ciclo de crecimiento, mientras los demás ácidos grasos saturados y monoinsaturados aumentan con la edad del cultivo, alcanzando su valor máximo al final del cultivo. Los ácidos grasos poliinsaturados tienden a alcanzar los valores máximos durante el crecimiento logarítmico o al comienzo de la fase estacionaria.

Los mayores contenidos en los principales ácidos grasos esenciales fueron: α -linoleico, 2.44 mg.g⁻¹ PS (nitrito, fase log); γ -linolénico, 1.72 mg.g⁻¹ PS (nitrito, fase est-1); α -linolénico, 3.78 mg.g⁻¹ PS (urea, fase est-1), araquidónico, 1.31 mg.g⁻¹ PS (nitrito, fase log), EPA, 55.55 mg.g⁻¹ PS (urea, fase est-1) y DHA, 28.37 mg.g⁻¹ PS (urea, fase est-1).

Phaeodactylum tricornutum (BACILLARIOPHYCEAE)

Crecimiento

En la fig. 12 se presentan las curvas correspondientes al crecimiento poblacional en los medios con cada fuente de N, ajustadas mediante regresión polinómica. El inóculo proviene de un cultivo creciendo en nitrato, y las poblaciones entran en crecimiento exponencial con una fase de latencia de 24 h, independientemente de la nueva fuente de N metabolizada.

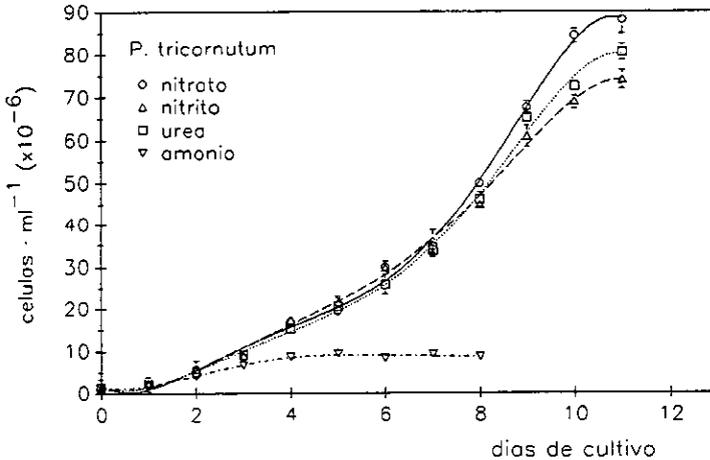


Fig. 12. Crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes fuentes de N.

Las tasas de crecimiento medias (k media) observadas durante la fase logarítmica varían entre los 0.59 doblajes d^{-1} de los cultivos con nitrato y 0.37 doblajes d^{-1} en los cultivos con amonio (Tabla XVI), con una tasa máxima (k máx) de 1.46 doblajes d^{-1} en los cultivos con nitrato y nitrito. El período de crecimiento máximo es de 10 días, excepto en los cultivos con amonio que es de 3 días (Tabla XVI).

La máxima densidad celular en la fase estacionaria se obtiene en los cultivos con nitrato (88×10^6 células · ml^{-1} , $P > 0.05$), no existiendo diferencias significativas entre nitrito y urea. En los cultivos con amonio el pH cae por debajo de 7 a partir del 4º día de cultivo (Fig. 13), acompañado de una inhibición del crecimiento, por lo que la densidad celular máxima alcanzada es inferior a 9×10^6 células · ml^{-1} .

Tabla XVI. Tasa de crecimiento (k), duración de la fase logarítmica (PCM), densidad celular en fase estacionaria y pH final en cultivos de *Phaeodactylum tricorutum* con diferentes fuentes de N.

	nitrato	nitrito	urea	amonio
k media (doblajes.d ⁻¹)	0.59 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.56 ± 0.01	0.37 ± 0.01
k máx. (doblajes.d ⁻¹)	1.46	1.45	1.21	0.98
PCM (días)	10	10	10	3
células.ml ⁻¹ (x10 ⁶)	87.98 ± 3.24	74.01 ± 2.50	80.88 ± 1.85	8.72 ± 0.30
pH final	8.49	8.54	8.54	4.37

Rendimientos por unidad de volumen de cultivo (Tabla XVII)

En los cultivos con nitrato se producen los máximos rendimientos en biomasa seca (PS) y materia orgánica (PSLC): 2.84 y 1.82 g.l⁻¹, respectivamente. Los menores rendimientos de ambos se obtienen en los cultivos con amonio.

En los cultivos con nitrato, se obtienen también las mayores rendimientos de clorofila *a* (21.25 mg.l⁻¹), clorofila *c* (3.95 mg.l⁻¹), carbohidratos (718 mg.l⁻¹) y ARN (93 mg.l⁻¹). Las producciones de proteína y lípidos no difieren entre los cultivos con nitrato y nitrito, con un rendimiento de 340 mg.l⁻¹ de proteína, y 410 - 440 mg.l⁻¹ de lípidos. En los cultivos con urea se obtienen menores rendimientos de todos los componentes macromoleculares analizados, aunque los rendimientos en clorofilas *a* y *c*, carbohidratos y ARN no son significativamente diferentes de los alcanzados en los cultivos de nitrito.

Composición celular

El **peso seco celular** (PS) y **peso seco libre de cenizas** (PSLC) son afectados tanto por la fuente de N ($P < 0.001$) como por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), detectándose una interacción significativa ($0.01 > P > 0.001$). Durante la fase logarítmica las células cultivadas con amonio presentan el mayor peso seco (48 pg.cel⁻¹) y materia orgánica (36 pg.cel⁻¹) (Tabla XVIII), si bien el peso seco no es diferente del observado en los cultivos con nitrato. Durante la fase estacionaria, las células cultivadas con amonio presentan el mayor peso seco (67 pg.cel⁻¹) y PSLC (51 pg.cel⁻¹), duplicando los observados en las demás fuentes de N. El peso celular decrece con la edad del cultivo, excepto para los cultivos con amonio.

El contenido en **cenizas** es afectado tanto por la fuente de N como por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), con una baja interacción ($P = 0.02$). En ambas fases el

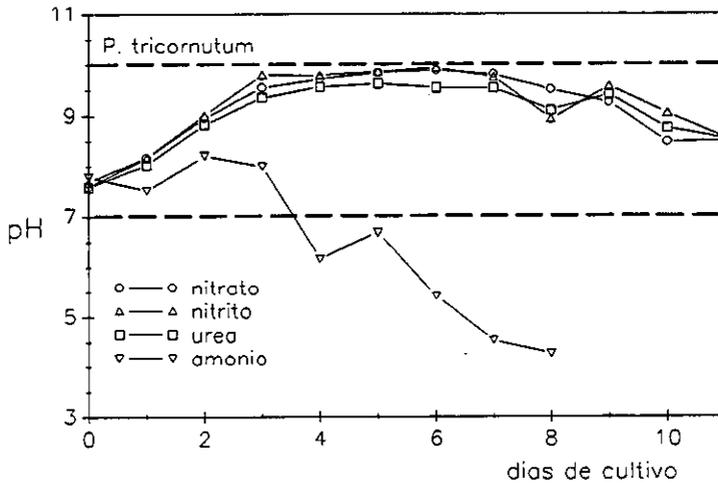


Fig. 13. Evolución temporal del pH extracelular en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes fuentes de N.

porcentaje de cenizas de las células cultivadas con nitrato o nitrito no difiere entre sí, y es mayor que el de las células cultivadas con urea o amonio (Tabla XVIII). En los cultivos con nitrato o nitrito el porcentaje de cenizas disminuye del 40% del peso seco en la fase log al 36% en la fase est-1.

Los resultados de los ANOVAs bifactoriales para cualquier constituyente celular muestran que la interacción observada entre ambos factores desaparece cuando se eliminan del análisis los datos correspondiente a los cultivos con amonio en fase estacionaria, con una ligera interacción residual en el caso del ARN ($P = 0.022$) y clorofila *c* ($P = 0.064$). Bajo estas condiciones, la principal fuente de variación es la fase de crecimiento, con una significación siempre < 0.001 .

El contenido celular de pigmentos (clorofilas *a* y *c*) es afectado por la fase de crecimiento ($P < 0.005$), pero no por la fuente de N ($P > 0.1$). El contenido celular de clorofila *a* decrece con la edad del cultivo, de $0.52-0.68 \text{ pg.cel}^{-1}$ a $0.21-0.24 \text{ pg.cel}^{-1}$ (Tabla XVIII), excepto para los cultivos con amonio (0.53 pg.cel^{-1} en la fase est-1). La clorofila *a*, como porcentaje del PSLC, decrece para todas las fuentes del 1.9 - 2.5% PSLC en la fase logarítmica al 0.9 - 1.2% en la fase est-1 (Tabla XIX).

El contenido celular de clorofila *c* también disminuye de la fase log a la fase est-1, tanto en contenidos absolutos ($95 - 150 \text{ fg.cel}^{-1}$ a $39 - 45 \text{ fg.cel}^{-1}$) como en porcentaje del PSLC (0.4 - 0.5% a 0.2%). Los cultivos con amonio en fase

Tabla XVII. Producciones de biomasa seca (PS), materia orgánica (PSLC), pigmentos y constituyentes macromoleculares en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes fuentes de N en la fase logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrito	urea	amonio
día de cultivo	log	4	4	4	4
	est-1	11	11	11	7
PS (g.l ⁻¹)	log	0.82 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.42 ± 0.01
	est-1	2.84 ± 0.01	2.56 ± 0.03	2.18 ± 0.02	0.58 ± 0.01
PSLC (g.l ⁻¹)	log	0.48 ± 0.00	0.433 ± 0.00	0.42 ± 0.01	0.31 ± 0.01
	est-1	1.82 ± 0.02	1.64 ± 0.03	1.53 ± 0.02	0.44 ± 0.01
clorofila a (mg.l ⁻¹)	log	10.23 ± 0.22	9.00 ± 0.59	10.29 ± 0.02	5.79 ± 0.51
	est-1	21.25 ± 1.48	15.20 ± 1.41	17.52 ± 0.65	4.62 ± 0.46
clorofila c (mg.l ⁻¹)	log	2.05 ± 0.14	1.64 ± 0.05	2.27 ± 0.07	1.17 ± 0.04
	est-1	3.95 ± 0.27	2.93 ± 0.25	3.15 ± 0.14	0.92 ± 0.20
proteína (mg.l ⁻¹)	log	149.36 ± 4.24	123.63 ± 5.37	132.41 ± 8.75	92.51 ± 12.73
	est-1	343.42 ± 15.39	339.36 ± 22.84	285.65 ± 18.82	74.14 ± 7.26
carbohidratos (mg.l ⁻¹)	log	46.33 ± 2.97	48.22 ± 5.83	38.35 ± 1.20	38.44 ± 1.90
	est-1	718.12 ± 31.80	654.05 ± 28.24	616.20 ± 21.35	69.04 ± 3.58
lípidos (mg.l ⁻¹)	log	112.96 ± 2.82	103.97 ± 2.60	107.78 ± 2.69	65.34 ± 1.63
	est-1	440.01 ± 11.00	409.94 ± 10.20	361.10 ± 9.03	141.48 ± 3.54
ARN (mg.l ⁻¹)	log	37.46 ± 1.77	34.29 ± 0.87	35.47 ± 1.00	28.15 ± 1.46
	est-1	93.03 ± 4.41	87.39 ± 4.58	76.63 ± 3.80	34.94 ± 0.84

estacionaria siguen manteniendo elevados contenidos celulares tanto de clorofila c (90 fg.cel⁻¹) como de clorofila a (0.53 pg.cel⁻¹), aunque no difieren del resto en los porcentajes que los pigmentos representan de la materia orgánica (Tabla XIX).

La relación entre las clorofilas a y c tiende a ser más alta en la fase estacionaria (Fig. 14): 5.2 - 5.6 frente a 4.5 - 5.4 en la fase logarítmica. No obstante, la alta variabilidad observada para esta relación en los análisis correspondientes a la fase logarítmica, debida fundamentalmente a la baja reproducibilidad de los contenidos de clorofila c, no permite establecer un patrón claro de comportamiento.

Tabla XVIII. Peso seco celular, peso seco libre de cenizas (PSLC), y contenidos celulares de pigmentos y constituyentes macromoleculares de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes fuentes de N en la fase logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrite	urea	amonio
peso seco (pg.cel ⁻¹)	log	48.75 ± 0.40	41.13 ± 0.39	39.12 ± 0.55	48.49 ± 0.19
	est-1	32.24 ± 0.04	34.54 ± 0.45	26.93 ± 0.27	66.51 ± 0.38
cenizas (% PS)	log	40.70 ± 0.51	38.98 ± 0.52	29.76 ± 0.24	25.47 ± 0.90
	est-1	35.88 ± 0.88	35.94 ± 0.16	29.84 ± 0.35	23.93 ± 0.69
PSLC (pg.cel ⁻¹)	log	28.91 ± 0.24	25.10 ± 0.24	27.48 ± 0.38	36.14 ± 0.14
	est-1	20.68 ± 0.02	22.13 ± 0.29	18.90 ± 0.19	50.59 ± 0.29
clorofila a (pg.cel ⁻¹)	log	0.61 ± 0.01	0.52 ± 0.03	0.68 ± 0.01	0.67 ± 0.06
	est-1	0.24 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.53 ± 0.05
clorofila c (fg.cel ⁻¹)	log	122.42 ± 8.28	94.85 ± 2.74	149.65 ± 4.31	135.48 ± 5.12
	est-1	44.93 ± 3.13	39.61 ± 3.44	38.91 ± 1.69	115.55 ± 22.37
proteína (pg.cel ⁻¹)	log	8.92 ± 0.25	7.16 ± 0.31	8.71 ± 0.58	10.72 ± 1.48
	est-1	3.90 ± 0.17	4.59 ± 0.31	3.53 ± 0.23	8.50 ± 0.83
carbohidratos (pg.cel ⁻¹)	log	2.77 ± 0.18	2.79 ± 0.34	2.52 ± 0.08	4.46 ± 0.22
	est-1	8.16 ± 0.36	8.84 ± 0.38	7.62 ± 0.26	7.92 ± 0.41
lípidos (pg.cel ⁻¹)	log	6.74 ± 0.17	6.02 ± 0.15	7.09 ± 0.19	7.57 ± 0.18
	est-1	5.00 ± 0.14	5.54 ± 0.14	4.46 ± 0.32	16.22 ± 0.12
ARN (pg.cel ⁻¹)	log	2.24 ± 0.11	1.99 ± 0.05	2.33 ± 0.07	3.26 ± 0.17
	est-1	1.06 ± 0.05	1.18 ± 0.06	0.95 ± 0.05	4.01 ± 0.10

La **proteína** celular es afectada tanto por la fuente de N ($0.05 > P > 0.01$) como por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), no existiendo interacción ($P > 0.1$). Para cada fuente de N, el contenido celular en pg.cel⁻¹ disminuye con la edad del cultivo: logarítmica < est-1 (Tabla XVIII). La proteína representa el 28.5 - 31.7% PSLC durante la fase logarítmica, decreciendo al 16.8 - 20.8% al comienzo de la fase estacionaria (Tabla XIX). Las células cultivadas con amonio presentan los contenidos celulares más altos en las dos fases (Tabla XVIII), no existiendo diferencias significativas entre nitrato, nitrito y urea.

Tabla XIX. Composición bioquímica, como porcentaje del PSLC, de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes fuentes de N en la fase logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrite	urea	amonio
clorofila a	log	2.11 ± 0.05	2.08 ± 0.14	2.46 ± 0.01	1.86 ± 0.16
	est-1	1.17 ± 0.08	0.93 ± 0.09	1.15 ± 0.04	1.05 ± 0.06
clorofila c	log	0.42 ± 0.03	0.38 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.37 ± 0.01
	est-1	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01
proteína	log	30.84 ± 0.55	28.54 ± 0.36	31.68 ± 0.95	29.67 ± 3.90
	est-1	18.88 ± 0.77	20.80 ± 0.95	18.69 ± 1.06	16.81 ± 1.48
carbohidratos	log	9.57 ± 0.77	11.13 ± 1.14	9.17 ± 0.20	12.33 ± 0.42
	est-1	39.48 ± 1.41	39.93 ± 1.68	40.32 ± 0.29	15.65 ± 0.78
lípidos	log	23.32 ± 0.10	24.00 ± 0.11	25.79 ± 0.09	20.96 ± 0.05
	est-1	24.19 ± 0.00	25.03 ± 0.03	23.63 ± 0.00	32.07 ± 0.05
ARN	log	7.73 ± 0.36	7.92 ± 0.01	8.49 ± 0.19	9.02 ± 0.44
	est-1	5.11 ± 0.24	5.34 ± 0.27	5.01 ± 0.24	7.92 ± 0.18

Los **carbohidratos** presentan variaciones significativas en función de la fuente de N ($P < 0.01$) y en función de la fase de crecimiento ($P < 0.001$). Las células cultivadas con amonio presentan el mayor contenido de carbohidratos durante el crecimiento exponencial, sin diferencias entre las demás fuentes (Tabla XVIII). En la fase estacionaria, los mayores contenidos celulares se dan en el nitrato o nitrito. Su contenido aumenta para todas las fuentes de N, desde el 9.2 - 12.3% PSLC al 15.7% (amonio) - 40% (demás medios) en la fase estacionaria (Tabla XIX).

El contenido celular de **lípidos** ($\mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1}$, Tabla XVIII) es mayor durante la fase logarítmica que al comienzo de la fase estacionaria, con la excepción del medio con amonio donde aumentan 2.14 veces. No obstante, el porcentaje que los lípidos representan de la materia orgánica se mantiene constante en el 21.0 - 25.8% PSLC (Tabla XIX), excepto las células cultivadas con amonio donde aumentan al 32.1% PSLC. Las células cultivadas con amonio presenta siempre los valores más altos de lípidos (Tabla XVIII).

El contenido de **ARN** es afectado por la fase de crecimiento ($P < 0.001$) y fuente de N ($P < 0.001$). Los contenidos celulares de ARN decrecen con la

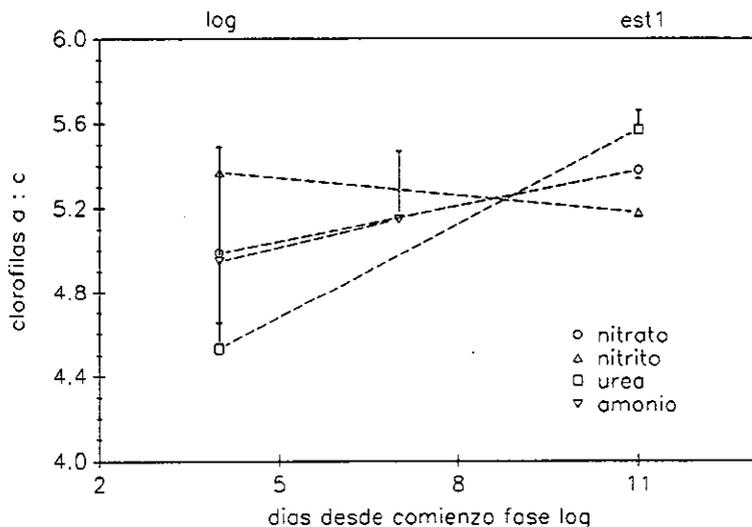


Fig. 14. Evolución de las relaciones entre las clorofilas *a* y *c* en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes fuentes de N.

disminución de la tasa de crecimiento, nuevamente con la excepción del medio con amonio en los que se produce un incremento de 1.2 veces (Tabla XVIII). El porcentaje de ARN con respecto al PSLC decrece del 7.7 - 9.0% al 5.0 - 5.3%, excepto para el amonio (7.9% PSLC; Tabla XIX). Las células cultivadas con amonio presentan los mayores contenidos celulares de ARN en ambas fases.

La relación lípidos:proteínas aumenta de 0.68 - 0.84 a 1.21 - 1.85 con la fase de crecimiento (Fig. 15A). La relación lípidos:carbohidratos decrece con la edad del cultivo (Fig. 15A), desde 1.70 - 2.80 a 0.6, con la excepción del amonio, donde aumenta a 2.05. La relación entre los carbohidratos y la proteína aumenta de 0.29 - 0.40 durante el crecimiento logarítmico a 0.90 - 2.13 en la fase estacionaria (Fig. 15B). La relación ARN:proteínas se mantiene estable en el rango 0.26 - 0.28, aumentando en la fase estacionaria de los cultivos con amonio a 0.45 (Fig. 15B).

Perfil de ácidos grasos (Tabla XX)

Los contenidos más altos en ácidos grasos se obtienen en la fase estacionaria de los cultivos con urea y amonio, con 120 y 147 mg por g de peso seco, respectivamente (Tabla XX).

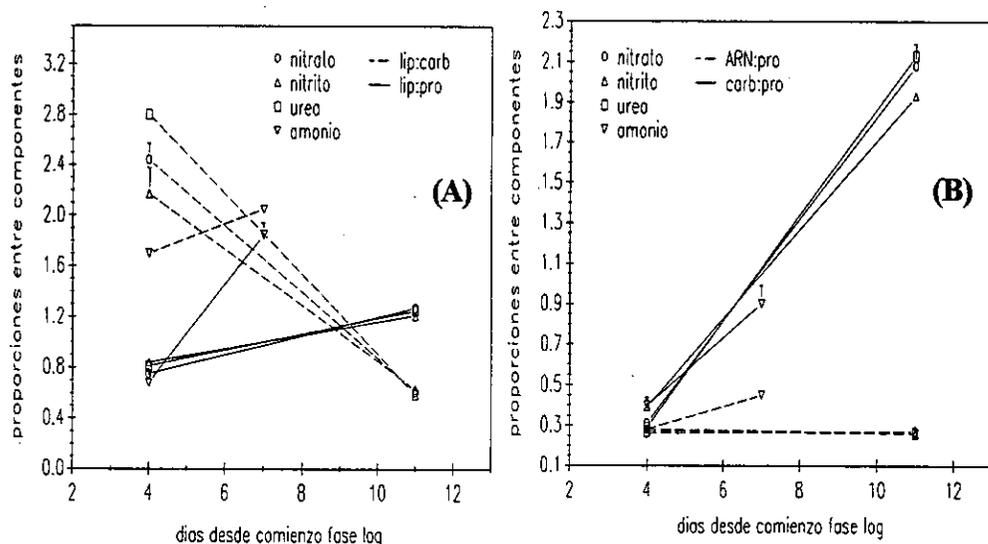


Fig. 15. Evolución de las relaciones entre constituyentes macromoleculares en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes fuentes de N. carb: carbohidratos; lip: lípidos; pro: proteínas.

El perfil de ácidos grasos de *P. tricornutum* incluye los siguientes:

- *saturados: 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0 y 24:0.
- *monoinsaturados: 16:1 ω 7, 18:1 ω 9, 18:1 ω 7 y 20:1 ω 9.
- *diinsaturados: 16:2 ω 7, 16:2 ω 4, 18:2 ω 6, 20:2 ω 6.
- *triinsaturados: 16:3 ω 4, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3.
- *tetrainsaturados: 16:4 ω 1, 18:4 ω 3, 20:4 ω 6 y 20:4 ω 3.
- *pentainsaturados: 20:5 ω 3.
- *hexainsaturados: 22:6 ω 3.

Los principales ácidos grasos cuantitativamente son el 14:0 (4.7 - 11.4% del total), 16:0 (8.9 - 19.1%), 16:1 ω 7 (24.3 - 37.9%), 16:2 ω 4 (3.1 - 5.8%), 16:3 ω 4 (2.9 - 12.0%), 18:2 ω 6 (1.4 - 4.0%), 20:5 ω 3 (6.2 - 30.9%) y 24:0 (1.3 - 2.9%).

Los cultivos con urea en fase estacionaria o amonió en ambas fases presentaron mayores contenidos de ácidos grasos poliinsaturados que aquellos con nitrato o nitrito; la relación entre ácidos grasos saturados + monoinsaturados a poliinsaturados [(S+MI):PI] fue 0.79 - 0.98 para las células cultivadas con amonió o urea, con valores entre 1.27 - 2.77 para aquellas cultivadas con nitrato o nitrito. Así, el eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3) representa el 22.4 - 30.9% del total de ácidos grasos en la fase estacionaria cuando la fuente de N es amonió o urea, y el 6.2 - 16.0% cuando es nitrato o nitrito. En ambas fases del ciclo de

crecimiento, los mayores contenidos en EPA y DHA se obtienen en los cultivos con amonio: 29.31 mg EPA y 1.67 mg DHA por gramo de PS (fase log) y 45.57 mg EPA y 2.57 mg DHA por gramo de PS (fase est-1), respectivamente. El contenido de ácidos grasos poliinsaturados del medio con urea en fase logarítmica fue anormalmente bajo en comparación a las fases logarítmicas de los demás medios.

La relación entre ácidos grasos poliinsaturados de las series $\omega 6$ y $\omega 3$ ($\omega 6/\omega 3$) muestra menores variaciones, aún cuando tiende a ser menor en los cultivos con amonio y urea (0.14 - 0.28) que en aquellos con nitrato y nitrito (0.28 - 0.64).

Entre los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, mirístico, palmítico y oleico fueron más abundantes (% del total de ácidos grasos) en la fase logarítmica, excepto los dos primeros para el nitrato. El pentadecanoico fue más abundante en la fase est-1 para nitrato y nitrito, pero en la fase log para urea y amonio. Palmitoleico, eicosenoico, behénico y lignocérico fueron más abundantes al inicio de la fase estacionaria, excepto para los cultivos con urea. Oleico y vaccénico no mostraron tendencias uniformes.

Los contenidos más altos de 16:2 ω 7 y 16:2 ω 4 se observan en la fase log para los cultivos con N oxidado y amonio. 18:2 ω 6 y 20:2 ω 6 fueron más abundantes en la fase estacionaria para los medios con N oxidado, pero en la fase log para el amonio. En el medio con urea la tendencia fue opuesta a la observada en nitrato y nitrito, excepto para el α -linoleico.

Los contenidos más altos de 16:3 ω 4 y α -linolénico se observaron normalmente en la fase logarítmica, mientras el γ -linolénico fue más abundante en la fase estacionaria (3 de los 4 medios para los tres ácidos grasos). 16:4 ω 1 y 18:4 ω 3 fueron más abundantes en la fase log, y araquidónico, 20:4 ω 3 y EPA al inicio de la fase estacionaria. No se observan tendencias uniformes para el DHA.

El contenido en ácidos grasos esenciales fue (mg.g⁻¹ PS): α -linoleico, 0.75 - 3.87; α -linolénico, 0.34 - 1.55, γ -linolénico, 0.44 - 1.95; araquidónico: 0.13 - 0.70; EPA, 3.94 - 45.57; DHA, 0.95 - 4.07.

Tabla XX. Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de PS, de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes fuentes de N en la fase logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

AG	nitrato				nitrito			
	log		est-1		log		est-1	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	9.92	8.09	11.40	7.28	8.82	6.93	8.30	7.40
15:0	0.92	0.75	2.54	1.62	0.32	0.25	0.45	0.40
16:0	14.13	11.52	17.35	11.07	12.98	10.20	11.68	10.41
16:1 ω 7	29.92	24.39	34.65	22.11	29.43	23.12	30.14	26.88
16:2 ω 7	1.26	1.03	0.85	0.55	0.76	0.60	0.70	0.63
16:2 ω 4	5.78	4.72	4.55	2.90	5.26	4.13	3.69	3.29
16:3 ω 4	8.34	6.80	6.26	3.99	9.53	7.49	9.29	8.28
16:4 ω 1	1.51	1.23	0.82	0.53	1.57	1.23	1.11	0.99
18:0	1.46	1.19	0.87	0.56	0.51	0.40	0.19	0.17
18:1 ω 9	2.01	1.64	1.53	0.98	1.02	0.80	1.17	1.04
18:1 ω 7	0.78	0.63	1.08	0.69	0.73	0.57	0.61	0.54
18:2 ω 6	2.52	2.06	2.57	1.64	2.37	1.86	3.96	3.53
18:3 ω 6	0.81	0.66	0.54	0.34	0.81	0.63	0.59	0.52
18:3 ω 3	1.01	0.83	0.68	0.44	1.24	0.98	1.71	1.53
18:4 ω 3	1.47	1.20	0.23	0.14	0.41	0.32	1.02	0.91
18:4 ω 1	0.75	0.61	0.58	0.37	0.92	0.72	1.46	1.30
20:0	⁽²⁾ -	-	0.60	0.38	0.35	0.28	-	-
20:1 ω 9	⁽³⁾ tr	tr	0.18	0.12	0.33	0.26	0.45	0.40
20:2 ω 6	tr	tr	0.26	0.17	0.48	0.37	0.66	0.59
Δ 2.13 ⁽¹⁾	1.55	1.27	1.16	0.74	0.68	0.53	0.91	0.81
Δ 2.28	0.70	0.57	0.45	0.29	0.63	0.49	tr	tr
20:4 ω 6	0.25	0.20	0.36	0.23	0.30	0.24	0.54	0.49
Δ 2.49	0.37	0.30	0.23	0.14	0.45	0.35	0.34	0.30
20:4 ω 3	0.32	0.26	0.30	0.19	0.39	0.30	0.74	0.66
20:5 ω 3	10.51	8.57	6.18	3.94	16.39	12.88	16.01	14.28
22:0	0.34	0.28	0.41	0.26	0.74	0.58	1.01	0.90
22:6 ω 3	0.64	0.52	0.50	0.32	0.79	0.62	1.26	1.12
24:0	2.72	2.22	2.87	1.83	1.83	1.43	2.02	1.80
total (mg.g ⁻¹ PS):	81.54		63.82		78.58		89.19	
%(S+MI):	62.21		73.47		57.04		56.02	
%PI:	37.79		26.53		42.96		43.98	
(S+MI)/PI:	1.65		2.77		1.33		1.27	
ω 6/ ω 3:	0.40		0.64		0.28		0.31	

⁽¹⁾ Δ : no identificado, siendo i el tiempo de retención relativo; ⁽²⁾ -: no detectado; ⁽³⁾ tr: traza.

AG: ácido graso; S: ácidos grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: poliinsaturados.

Tabla XX (continuación). Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de PS, de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes fuentes de N en la fase logarítmica (log) e inicio fase estacionaria (est-1) del ciclo de crecimiento.

AG	urea				amonio			
	log		est-1		log		est-1	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	11.42	6.15	6.20	7.43	6.85	7.18	4.69	6.92
15:0	0.54	0.29	0.27	0.32	0.45	0.48	0.20	0.29
16:0	19.09	10.28	10.74	12.86	9.45	9.91	8.90	13.12
16:1 ω 7	37.93	20.42	28.88	34.60	24.30	25.49	25.14	37.07
16:2 ω 7	0.73	0.39	1.00	1.20	1.23	1.29	0.75	1.10
16:2 ω 4	3.22	1.73	4.32	5.17	4.85	5.08	3.14	4.63
16:3 ω 4	2.87	1.55	11.92	14.28	12.02	12.61	10.04	14.80
16:4 ω 1	1.25	0.67	1.18	1.41	1.76	1.84	1.30	1.91
18:0	0.65	0.35	0.27	0.32	0.36	0.38	0.22	0.32
18:1 ω 9	1.62	0.87	0.80	0.96	0.61	0.64	1.32	1.95
18:1 ω 7	1.60	0.86	0.55	0.65	0.52	0.55	0.55	0.81
18:2 ω 6	1.40	0.75	3.23	3.87	2.69	2.82	2.31	3.41
18:3 ω 6	0.66	0.36	0.35	0.42	0.40	0.42	1.05	1.55
18:3 ω 3	1.02	0.55	1.47	1.76	0.96	1.00	1.33	1.95
18:4 ω 3	0.81	0.44	0.33	0.39	0.77	0.81	0.62	0.92
18:4 ω 1	0.81	0.44	0.53	0.63	tr	tr	0.31	0.46
20:0	⁽²⁾ -	-	0.26	0.32	tr	tr	tr	tr
20:1 ω 9	⁽³⁾ tr	tr	0.29	0.35	0.30	0.32	0.39	0.57
20:2 ω 6	0.39	0.21	0.25	0.30	0.37	0.38	0.28	0.42
Δ 2.13 ⁽¹⁾	1.14	0.61	0.41	0.49	0.13	0.13	0.43	0.64
Δ 2.28	tr	tr	0.34	0.41	tr	tr	tr	tr
20:4 ω 6	0.25	0.13	0.40	0.48	0.23	0.24	0.48	0.70
Δ 2.49	tr	tr	0.96	1.15	0.45	0.47	0.67	0.99
20:4 ω 3	0.32	0.17	0.27	0.32	0.46	0.48	0.48	0.70
20:5 ω 3	9.19	4.95	22.36	26.78	27.94	29.31	30.91	45.57
22:0	0.60	0.32	tr	tr	tr	tr	tr	tr
22:6 ω 3	0.75	0.40	1.08	1.29	1.59	1.67	1.74	2.57
24:0	1.76	0.95	1.34	1.60	1.30	1.37	2.76	4.07
total (mg.g ⁻¹ PS):		53.85		119.78		104.88		147.45
%(S+MI):		75.20		49.61		44.16		44.17
%PI:		24.80		50.39		55.84		55.83
(S+MI)/PI:		3.03		0.98		0.79		0.79
ω 6/ ω 3:		0.28		0.22		0.16		0.14

⁽¹⁾ Δ i: no identificado, siendo i el tiempo de retención relativo; ⁽²⁾ -: no detectado; ⁽³⁾ tr: traza.

AG: ácido graso; S: ácidos grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: poliinsaturados.

Tetraselmis suecica (PRASINOPHYCEAE)

Crecimiento

En la fig. 16 se representan las curvas de crecimiento correspondientes a cada fuente de N, ajustadas mediante regresión polinómica. El inóculo proviene de un cultivo creciendo en nitrato, y las poblaciones entran en crecimiento exponencial con una fase de latencia máxima de 48 h, independientemente de la nueva fuente de N metabolizada.

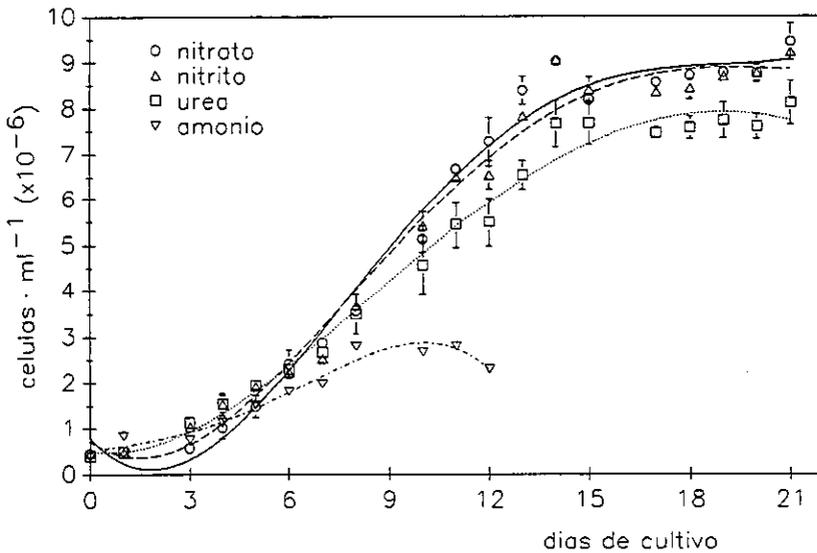


Fig. 16. Crecimiento de *Tetraselmis suecica* cultivada con diferentes fuentes de N.

Con las diferentes fuentes de N se obtienen tasas de crecimiento similares, siendo no obstante más altas ($P < 0.05$) en los cultivos con nitrato: 0.39 doblajes d^{-1} para la fase logarítmica global, con una tasa diaria máxima de 0.80 doblajes d^{-1} (Tabla XXI); los cultivos con amonio presentan el crecimiento inicialmente más rápido, con una tasa inicial de 1.00 doblajes d^{-1} . El período de crecimiento máximo es de 12 - 13 días, descendiendo a 7 días para los cultivos con amonio (Tabla XXI).

Cuando se eliminan los cultivos con amonio del análisis, la densidad celular es únicamente afectada por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), pero no por la fuente de N ($P > 0.05$), no existiendo interacción entre ambos factores ($P = 0.48$). La única fuente de N que afecta a la densidad celular es el amonio, ya que en los cultivos

Tabla XXI. Tasa de crecimiento (k), duración de la fase logarítmica (PCM), densidad celular máxima en fase estacionaria y pH final en cultivos de *Tetraselmis suecica* con diferentes fuentes de N.

	nitrato	nitrito	urea	amonio
k media (d^{-1})	0.39 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.00
k máxima (d^{-1})	0.80	0.53	0.54	1.09
PCM (días)	12 - 13	13	13	7
cél. ml^{-1} ($\times 10^{-6}$)	11.34 ± 1.22	9.98 ± 0.22	9.16 ± 1.03	2.79 ± 0.03
pH final	7.76	7.78	7.00	3.21

con éste el crecimiento es acompañado por un descenso brusco del pH a valores extremadamente ácidos (Fig. 17), lo cual provoca la inhibición del crecimiento.

Rendimientos por unidad de volumen de cultivo (Tabla XXII)

En los cultivos con nitrato se producen los máximos rendimientos en biomasa seca (PS) y materia orgánica (PSLC) tanto al comienzo de la fase estacionaria (fase est-1) como a los 10 días en fase estacionaria (fase est-2): 1.83 y 3.95 $g.l^{-1}$ de materia seca y 1.57 y 3.18 $g.l^{-1}$ de materia orgánica (PSLC), respectivamente. Los menores rendimientos se obtienen en los cultivos con amonio en la fase est-1. En ambas fases los cultivos con urea rinden menores producciones de biomasa que aquellos con N oxidado.

Al alcanzarse la fase estacionaria (est-1), en los cultivos con nitrato, nitrito y urea se obtienen rendimientos similares ($P > 0.05$) de pigmentos. Los mayores rendimientos de proteína se alcanzan en los cultivos con urea, y de carbohidratos, lípidos y ARN en aquellos con nitrato o nitrito.

En la fase est-2, en los cultivos con urea se obtienen las mayores producciones de pigmentos (clorofilas a y b , y carotenos) y proteína. En los cultivos con nitrato o nitrito se obtienen producciones similares de todos los constituyentes analizados, proporcionando los mayores rendimientos de carbohidratos, lípidos y ARN. En esta fase se alcanzan los máximos rendimientos de todos los constituyentes celulares.

Composición celular

El **peso seco celular** (PS) y **peso seco libre de cenizas** (PSLC) no son afectados por la variación en la fuente de N metabolizada ($P > 0.1$), pero sí por la

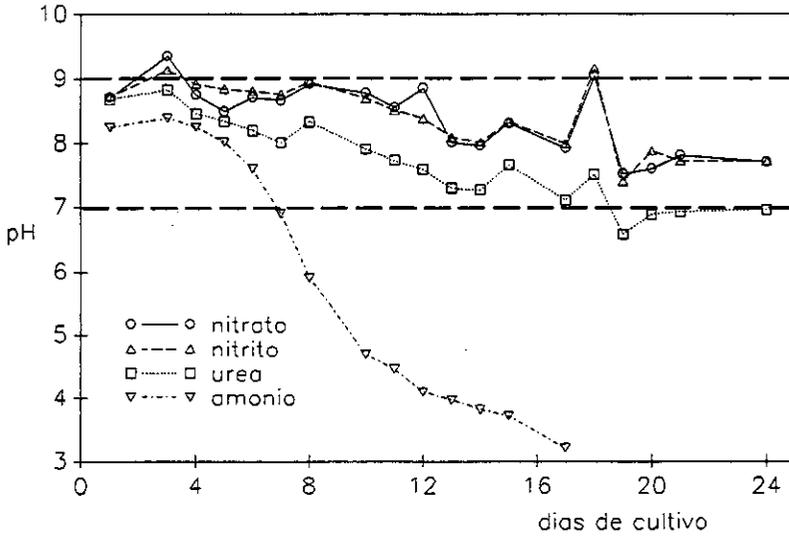


Fig. 17. Evolución temporal del pH extracelular en cultivos de *Tetraselmis suecica* con diferentes fuentes de N.

fase de crecimiento ($P < 0.001$), no existiendo interacción ($P > 0.1$). Para todas las fuentes, el peso seco aumenta con la edad del cultivo, desde 168 - 198 pg.cel^{-1} en la fase logarítmica hasta 269 - 352 pg.cel^{-1} a los 10 días de fase estacionaria (Tabla XXIII). El mismo comportamiento muestra el peso seco libre de cenizas (PSLC), aumentando de 144 - 175 pg.cel^{-1} a 211 - 284 pg.cel^{-1} (Tabla XXIII). Aún cuando el incremento es continuo, el 96% se produce a partir del momento en que las poblaciones entran en fase estacionaria. En la fase est-2, peso seco y materia orgánica son significativamente más altos en los cultivos con nitrato o nitrito que en la urea.

El contenido en **cenizas** es afectado tanto por la fuente de N ($P < 0.001$) como por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), existiendo además interacción significativa entre ambos factores ($P = 0.003$). Esto implica que el efecto de la fase no es el mismo para cada fuente de N, y viceversa. Esta interacción es básicamente debida a los valores de cenizas observados en los cultivos con amonio. Cuando estos son eliminados del análisis, la significación de la F de interacción disminuye a 0.02. Bajo estas condiciones, no existen diferencias ($P > 0.05$) entre los contenidos de cenizas en la fase logarítmica (11.6 - 16.4% del PS) y est-1 (11.6 - 14.2%), aumentando al 18.9 - 21.7% en la fase est-2 (Tabla XXIII). En los cultivos con amonio, el contenido en cenizas disminuye hasta el 3.0% del PS cuando el crecimiento se detiene.

Tabla XXII. Producciones de biomasa seca, materia orgánica, pigmentos y constituyentes macromoleculares (media±DT) en cultivos de *Tetraselmis suecica* con diferentes fuentes de N.

fase		nitrate	nitrite	urea	ammonio
día desde inicio fase	log	6	6	6	6
logarítmica	est-1	18	18	18	11
	est-2	24	24	24	- ⁽¹⁾
peso seco (g.l ⁻¹)	log	0.48±0.02	0.45±0.01	0.45±0.01	0.36±0.02
	est-1	1.83±0.01	1.67±0.05	1.31±0.05	0.51±0.01
	est-2	3.95±0.03	3.38±0.31	2.41±0.25	-
PSLC (g.l ⁻¹)	log	0.41±0.02	0.40±0.01	0.38±0.01	0.32±0.02
	est-1	1.57±0.03	1.46±0.04	1.15±0.03	0.49±0.01
	est-2	3.18±0.01	2.74±0.23	1.88±0.18	-
clorofila a (mg.l ⁻¹)	log	6.78±0.49	6.30±0.33	8.50±0.28	7.20±0.44
	est-1	14.49±0.15	13.69±0.43	13.86±0.36	10.82±0.53
	est-2	29.62±0.79	28.81±0.51	33.39±2.71	-
clorofila b (mg.l ⁻¹)	log	3.01±0.25	2.77±0.14	3.81±0.19	3.25±0.27
	est-1	14.30±0.24	12.80±0.47	12.70±1.16	4.98±0.12
	est-2	15.20±0.41	15.39±0.91	18.86±2.22	-
carotenos (mg.l ⁻¹)	log	2.38±0.16	2.27±0.06	3.03±0.05	2.62±0.15
	est-1	5.52±0.12	5.28±0.16	5.36±0.15	4.18±0.17
	est-2	12.71±0.37	12.10±0.11	13.80±0.90	-
proteínas (mg.l ⁻¹)	log	81.00±12.94	72.42±1.22	84.80±0.02	55.25±8.88
	est-1	282.20±41.88	358.44±43.33	390.98±17.49	111.67±3.50
	est-2	442.49±7.77	442.23±8.14	494.08±0.75	-
carbohidratos (mg.l ⁻¹)	log	30.70±4.35	29.00±0.06	26.07±0.09	19.41±0.95
	est-1	131.93±0.09	148.99±3.01	91.08±3.17	36.26±0.78
	est-2	188.88±5.43	186.03±14.20	153.82±17.43	-
lípidos (mg.l ⁻¹)	log	140.00±5.00	110.00±7.50	110.00±2.50	127.50±2.50
	est-1	322.50±7.50	325.00±10.00	262.50±2.50	132.50±7.50
	est-2	605.00±25.00	565.00±5.00	475.00±55.00	-
ARN (mg.l ⁻¹)	log	27.50±1.80	23.69±0.24	26.55±1.84	15.18±0.64
	est-1	77.92±1.39	68.95±7.16	68.46±0.37	20.79±4.91
	est-2	196.72±21.84	166.95±28.26	111.97±2.45	-

El contenido celular de **pigmentos** (clorofilas *a* y *b*, y caroteno) sigue pautas similares al de cenizas, con variaciones significativas en función de la fuente de N, fase de crecimiento e interacción significativa entre ambos factores. En este caso la interacción no desaparece al eliminar del análisis los datos de los cultivos con amonio.

Para cada fuente de N, los menores contenidos celulares de clorofila *a* se observan al comienzo de la fase estacionaria, recuperándose luego a valores iguales a los de la fase logarítmica (Tabla XXIII). No obstante, como consecuencia del incremento del peso celular, la clorofila *a* disminuye del 1.8 - 2.3% del PSLC en la fase logarítmica al 0.9 - 1.8% en la fase est-2 (Tabla XXIV). Para cada fase de crecimiento, el efecto de la fuente de N sobre el contenido de clorofila *a* (pg. cel⁻¹) puede ordenarse: amonio > urea > nitrato = nitrito, según el test de Duncan al nivel 0.05, excepto en la fase est-1 donde no existen diferencias significativas entre los cultivos con urea y aquellos con nitrato o nitrito.

En el caso de la clorofila *b*, el análisis resulta más complejo. No obstante, para cada fase de crecimiento, los cultivos con amonio y urea tienden a presentar contenidos significativamente más altos que los cultivos con nitrato o nitrito (amonio = urea > nitrato = nitrito, Tabla XXIII). Los contenidos celulares en pg. cel⁻¹ tienden a aumentar con la edad del cultivo (Tabla XXIII), mientras como % del PSLC varían entre 0.8 - 1.1% en la fase logarítmica e inicio de la fase estacionaria, decreciendo luego al 0.5 - 0.6% en la fase est-2 en los medios con N oxidado (Tabla XXIV).

El contenido celular de carotenos sigue el mismo patrón de comportamiento que la clorofila *a*: amonio > urea > nitrato = nitrito, para cada fase, y fase log > fase est-1 < fase est-2, para cada fuente (Tabla XXIII). El porcentaje respecto de la materia orgánica decrece del 0.7 - 0.8% en la fase logarítmica al 0.4 - 0.7% en la fase est-2, correspondiendo los porcentajes más altos a los cultivos con amonio y urea (Tabla XXIV).

La relación clorofila *a*:carotenos disminuye continuamente con la edad del cultivo, desde 2.75 - 2.84 en la fase logarítmica a 2.33 - 2.42 en la fase est-2 (Fig. 18). La relación clorofilas *a*:*b* decrece entre las fases log y est-1 desde 2.22 - 2.27 a 1.01 - 1.11, excepto para los cultivos con amonio (2.20 en ambas fases), y aumenta posteriormente a 1.78 - 1.96 en la fase est-2 (Fig. 18).

La **proteína** celular soluble es afectada tanto por la fuente de N ($P < 0.001$) como por la fase de crecimiento ($P < 0.001$), no existiendo interacción ($P > 0.1$).

Tabla XXIII. Peso seco celular, peso seco libre de cenizas (PSLC), y contenidos celulares de pigmentos y constituyentes macromoleculares de *Tetraselmis suecica* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrite	urea	amonio
peso seco (pg.cel ⁻¹)	log	168.19 ± 1.34	179.30 ± 1.51	195.82 ± 7.41	198.14 ± 4.45
	est-1	209.63 ± 2.32	197.55 ± 0.79	171.96 ± 0.34	181.28 ± 3.03
	est-2	351.69 ± 35.21	339.20 ± 38.40	269.26 ± 58.25	- ⁽¹⁾
cenizas (% PS)	log	14.50 ± 0.30	12.54 ± 0.99	16.39 ± 0.92	11.59 ± 0.13
	est-1	14.21 ± 0.95	12.53 ± 0.40	11.61 ± 0.50	2.98 ± 2.00
	est-2	19.27 ± 0.36	18.93 ± 0.67	21.66 ± 0.62	-
PSLC (pg.cel ⁻¹)	log	143.81 ± 0.65	156.82 ± 3.09	163.66 ± 4.40	175.18 ± 4.19
	est-1	179.87 ± 3.99	172.80 ± 0.09	151.99 ± 0.56	175.95 ± 6.56
	est-2	284.04 ± 29.69	274.72 ± 28.85	210.59 ± 43.95	-
clorofila a (pg.cel ⁻¹)	log	2.82 ± 0.15	2.81 ± 0.09	3.69 ± 0.09	3.99 ± 0.07
	est-1	1.66 ± 0.01	1.63 ± 0.09	1.83 ± 0.11	3.87 ± 0.15
	est-2	2.64 ± 0.21	2.89 ± 0.12	3.73 ± 0.72	-
clorofila b (pg.cel ⁻¹)	log	1.25 ± 0.06	1.24 ± 0.04	1.65 ± 0.07	1.80 ± 0.01
	est-1	1.64 ± 0.02	1.52 ± 0.02	1.67 ± 0.10	1.78 ± 0.03
	est-2	1.35 ± 0.11	1.54 ± 0.13	2.11 ± 0.48	-
carotenos (pg.cel ⁻¹)	log	0.99 ± 0.06	1.01 ± 0.01	1.31 ± 0.01	1.45 ± 0.03
	est-1	0.63 ± 0.01	0.63 ± 0.04	0.71 ± 0.04	1.50 ± 0.05
	est-2	1.13 ± 0.09	1.21 ± 0.04	1.54 ± 0.27	-
proteínas (pg.cel ⁻¹)	log	28.12 ± 3.57	28.62 ± 0.17	36.79 ± 0.26	30.37 ± 2.53
	est-1	32.38 ± 4.69	42.39 ± 4.00	51.50 ± 0.63	40.00 ± 1.63
	est-2	39.41 ± 3.56	44.34 ± 1.81	54.65 ± 6.09	-
carbohidratos (pg.cel ⁻¹)	log	10.66 ± 1.16	11.46 ± 0.10	11.31 ± 0.12	10.76 ± 0.31
	est-1	15.14 ± 0.04	17.21 ± 0.35	12.00 ± 0.03	12.99 ± 0.40
	est-2	16.90 ± 2.30	18.68 ± 1.84	17.24 ± 3.85	-
lípidos (pg.cel ⁻¹)	log	48.81 ± 0.11	43.95 ± 1.00	48.08 ± 0.50	70.87 ± 4.16
	est-1	37.02 ± 0.99	38.53 ± 0.16	34.64 ± 1.45	47.47 ± 3.13
	est-2	53.74 ± 3.58	56.64 ± 1.77	53.24 ± 12.02	-
ARN (pg.cel ⁻¹)	log	9.58 ± 0.31	9.36 ± 0.01	11.52 ± 0.88	8.42 ± 0.31
	est-1	8.94 ± 0.13	8.20 ± 1.07	9.03 ± 0.24	7.46 ± 1.83
	est-2	17.76 ± 3.84	16.80 ± 3.21	12.36 ± 1.13	-

⁽¹⁾ -: no analizado.

Tabla XXIV. Composición bioquímica, como porcentaje del PSLC, de *Tetraselmis suecica* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

	fase	nitrate	nitrite	urea	amonio
clorofila <i>a</i>	log	1.96 ± 0.11	1.79 ± 0.02	2.26 ± 0.12	2.28 ± 0.02
	est-1	0.92 ± 0.03	0.94 ± 0.05	1.20 ± 0.07	2.21 ± 0.17
	est-2	0.93 ± 0.02	1.06 ± 0.07	1.78 ± 0.03	- ⁽¹⁾
clorofila <i>b</i>	log	0.87 ± 0.04	0.79 ± 0.01	1.01 ± 0.07	1.03 ± 0.03
	est-1	0.91 ± 0.03	0.88 ± 0.01	1.10 ± 0.07	1.01 ± 0.05
	est-2	0.48 ± 0.01	0.56 ± 0.01	1.00 ± 0.02	-
carotenos	log	0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.01	0.80 ± 0.03	0.83 ± 0.00
	est-1	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.85 ± 0.06
	est-2	0.40 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.74 ± 0.02	-
proteínas	log	19.55 ± 2.39	18.25 ± 0.25	22.49 ± 0.44	17.38 ± 1.86
	est-1	18.07 ± 3.01	24.54 ± 2.33	33.89 ± 0.54	22.73 ± 0.08
	est-2	13.89 ± 0.20	16.25 ± 1.05	26.50 ± 2.64	-
carbohidratos	log	7.41 ± 0.77	7.31 ± 0.21	6.91 ± 0.11	6.14 ± 0.03
	est-1	8.42 ± 0.16	9.96 ± 0.73	7.90 ± 0.05	7.38 ± 0.05
	est-2	5.93 ± 0.19	6.80 ± 0.04	8.16 ± 0.13	-
lípidos	log	33.94 ± 0.08	28.59 ± 0.50	28.61 ± 0.30	40.42 ± 1.41
	est-1	20.58 ± 0.09	22.30 ± 0.10	22.79 ± 0.87	26.95 ± 0.77
	est-2	19.00 ± 0.73	20.78 ± 1.54	25.19 ± 0.45	-
ARN	log	6.66 ± 0.18	5.97 ± 0.12	7.03 ± 0.35	4.81 ± 0.06
	est-1	4.98 ± 0.18	4.75 ± 0.62	5.94 ± 0.14	4.21 ± 0.88
	est-2	6.18 ± 0.71	6.06 ± 0.53	6.02 ± 0.72	-

⁽¹⁾ -: no analizado.

Para cada fuente de N, el contenido celular en pg.cel^{-1} aumenta con la fase de crecimiento: logarítmica < est-1 < est-2 (Tabla XXIII). No obstante, cuando se expresa como % del PSLC, la proteína aumenta durante la fase logarítmica, alcanzando su máximo valor al comienzo de la fase estacionaria (18.1 - 33.9%) y decreciendo posteriormente en la fase est-2 (13.9 - 26.5%) (Tabla XXIV). Las células cultivadas con urea presentan los contenidos celulares más altos en todas las fases (Tabla XXIII), no existiendo diferencias significativas entre nitrato y nitrito.

Los **carbohidratos** no presentan variaciones significativas en función de la fuente de N ($P > 0.1$) pero sí en función de la fase de crecimiento ($0.01 > P > 0.001$). Su contenido se mantiene estable en torno al 6 - 8% de la materia orgánica (Tabla XXIV), excepto para los cultivos con nitrito en fase est-1 que aumenta al

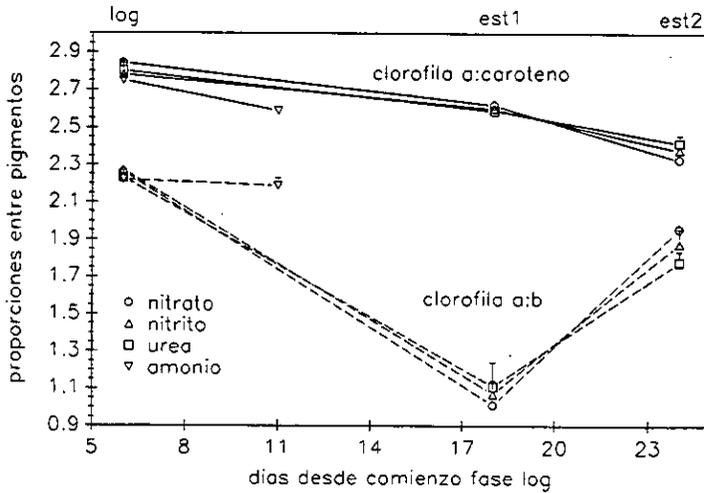


Fig. 18. Evolución de las relaciones entre pigmentos a lo largo del ciclo de crecimiento en cultivos de *Tetraselmis suecica* con diferentes fuentes de N.

10.0%. No obstante, se observa un incremento significativo y continuo desde 10.7 - 11.5 $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ hasta 16.9 - 18.7 $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ a lo largo del tiempo de cultivo (Tabla XXIII).

El contenido celular de **lípidos** es afectado tanto por la fuente de N ($0.01 > P > 0.001$) como por la fase de crecimiento ($P = 0.001$), sin interacción significativa ($P > 0.1$). El contenido celular ($\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$) alcanza un mínimo al comienzo de la fase estacionaria, recuperándose luego a valores superiores a los de la fase logarítmica (Tabla XXIII). No obstante, y debido al incremento del peso celular, el porcentaje que los lípidos representan en la materia orgánica total decrece continuamente desde el 28.6 - 40.4% en la fase logarítmica hasta el 19.0 - 25.2% al final del cultivo (Tabla XXIV). Las células cultivadas con amonio presenta siempre los valores más altos de lípidos, no existiendo diferencias significativas entre los cultivos con las restantes fuentes nitrogenadas.

El contenido de **ARN** es únicamente afectado por la fase de crecimiento ($0.01 > P > 0.001$). Los contenidos celulares de ARN no difieren entre el crecimiento exponencial y el comienzo de la fase estacionaria, incrementándose posteriormente con el transcurso de la fase estacionaria (Tabla XXIII). Su contenido como % del PSLC se mantiene en torno al 5 - 7 %, con ligeras variaciones según la fase de crecimiento (Tabla XXIV).

La relación **lípidos:proteínas** decrece hasta alcanzar la fase estacionaria (1.30 - 2.36 a 0.67 - 1.19), aumentando posteriormente con el envejecimiento del cultivo (0.96 - 1.37) (Fig. 19A). La relación **lípidos:carbohidratos** sigue la misma

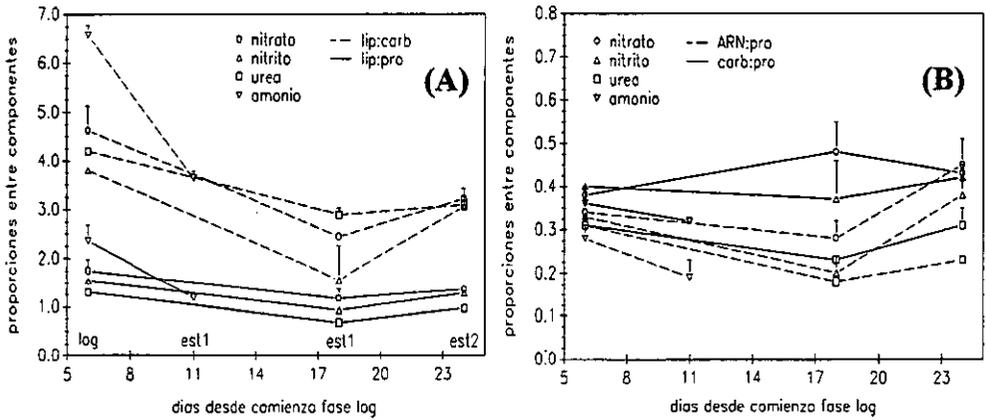


Fig. 19. Evolución de las relaciones entre constituyentes macromoleculares a lo largo del ciclo de crecimiento en cultivos de *Tetraselmis suecica* con diferentes fuentes de N. carb: carbohidratos; pro: proteínas; lip: lípidos.

tendencia, con valores máximos en fase logarítmica (3.80 - 6.58) y mínimos al comienzo de la fase estacionaria (1.56 - 3.65) (Fig. 19A). La relación entre los carbohidratos y la proteína soluble celular se mantiene en valores del 0.3 - 0.5 a lo largo de todo el cultivo, con una tendencia al incremento dentro de este rango (Fig. 19B). La relación ARN:proteínas (Fig. 19B) decrece entre la fase logarítmica (0.28 - 0.34) y comienzo de la estacionaria (0.18 - 0.28), para alcanzar posteriormente su máximo valor en la fase estacionaria avanzada (0.38 - 0.45), con excepción de los cultivos con urea (0.23), debido al alto contenido proteico de estas células.

Perfil de ácidos grasos (Tabla XXV)

El contenido total de ácidos grasos tiende a aumentar con el tiempo de cultivo, alcanzando el máximo al comienzo de la fase estacionaria o al final del cultivo. En la fase logarítmica las células cultivadas con amonio presentan los contenidos más altos en ácidos grasos, con 126 mg por g de peso seco (Tabla XXV). Al comienzo de la fase estacionaria los contenidos celulares aumentan hasta 135 - 162 mg.g⁻¹ PS, variando en la fase est-2 entre 106 - 147 mg.g⁻¹ PS.

El perfil de ácidos grasos de *Tetraselmis suecica* incluye los siguientes:

*saturados: 14:0, 16:0 y 18:0.

*monoinsaturados: 16:1 ω 9, 18:1 ω 9 y 20:1 ω 9.

*diinsaturados: 16:2 ω 6, 16:2 ω 4, 18:2 ω 6 y 20:2 ω 6.

Tabla XXV. Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de PS, de *Tetraselmis suecica* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

AG	nitrato						nitrito					
	log		est-1		est-2		log		est-1		est-2	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	0.28	0.31	0.25	0.41	0.44	0.59	0.52	0.40	0.31	0.43	0.33	0.49
16:0	15.22	16.78	15.30	24.76	19.29	25.73	18.66	14.49	15.30	21.46	16.74	24.68
16:1 ω 9	4.92	5.42	4.49	7.26	4.82	6.43	5.56	4.32	5.06	7.10	4.42	6.52
16:2 ω 6	0.28	0.31	0.21	0.33	0.38	0.51	tr	tr	-	-	0.05	0.07
16:2 ω 4	(2) -	-	0.05	0.09	tr	tr	0.43	0.34	0.19	0.26	0.26	0.39
16:3 ω 6	0.41	0.46	0.59	0.95	0.80	1.07	0.40	0.31	0.70	0.98	0.61	0.90
18:0	0.11	0.12	0.09	0.14	0.25	0.33	0.23	0.18	tr	tr	0.17	0.24
16:3 ω 3	1.67	1.85	1.34	2.17	1.42	1.90	1.66	1.29	1.52	2.13	1.36	2.01
18:1 ω 9	6.99	7.70	14.77	23.90	15.60	20.81	7.79	6.05	13.05	18.31	15.42	22.74
16:4 ω 3	20.03	22.08	17.15	27.76	19.01	25.35	20.55	15.96	20.33	28.51	18.36	27.07
18:2 ω 6	3.49	3.85	4.27	6.91	3.71	4.94	2.97	2.30	3.21	4.51	3.41	5.03
18:3 ω 6	0.47	0.51	1.17	1.89	0.85	1.14	0.99	0.77	1.51	2.12	1.01	1.49
18:3 ω 3	24.19	26.67	19.62	31.75	16.14	21.53	20.94	16.26	19.34	27.13	17.88	26.36
20:1 ω 9	1.26	1.38	0.86	1.39	0.70	0.93	1.31	1.02	0.88	1.23	0.88	1.30
18:4 ω 3	10.65	11.75	5.50	8.90	4.12	5.49	9.97	7.75	7.94	11.13	6.09	8.98
20:2 ω 6	0.65	0.71	0.41	0.66	0.41	0.54	0.82	0.64	tr	tr	0.42	0.62
Δ 2.12 ⁽¹⁾	0.94	1.04	1.07	1.73	0.88	1.17	0.98	0.76	1.69	2.42	0.90	0.86
20:3 ω 6	-	-	0.42	0.68	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr
20:4 ω 6	0.63	0.69	0.97	1.57	0.76	1.01	0.84	0.65	0.84	1.18	0.87	1.29
20:3 ω 3	0.46	0.51	(3) tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
20:4 ω 3	1.14	1.25	1.14	1.85	1.14	1.52	0.90	0.70	1.23	1.73	0.63	0.92
20:5 ω 3	5.73	6.31	10.33	16.72	8.57	11.44	4.47	3.47	8.60	12.06	9.41	13.88
21:5 ω 3	0.49	0.54	-	-	0.69	0.92	tr	tr	tr	tr	0.44	0.65
total(mg.g ⁻¹ PS):	110.23		161.84		133.37		77.66		142.70		147.45	
%(S+MI):	28.77		35.75		41.10		34.08		34.01		38.29	
%PI:	71.23		64.25		58.90		65.92		65.99		61.71	
(S+MI)/PI:	0.40		0.56		0.70		0.52		0.52		0.62	
ω 6/ ω 3:	0.09		0.15		0.14		0.11		0.11		0.12	

(1) Δ i: no identificado, siendo i el tiempo de retención relativo; (2) -: no detectado; (3) tr: traza.

AG: ácido graso; S: ácidos grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: poliinsaturados.

*triinsaturados: 16:3 ω 6, 16:3 ω 3?, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3 y 20:3 ω 3.

*tetrainsaturados: 16:4 ω 3, 18:4 ω 3, 20:4 ω 6 y 20:4 ω 3.

*pentainsaturados: 20:5 ω 3.

El 20:3 ω 6 aparece en cantidades traza en algunas muestras, al igual que el 20:3 ω 3 en la mitad de las muestras. Se observa un pico correspondiente con el del 21:5 ω 3 del patrón cualitativo PUFA-3, cuya identidad no pudo ser confirmada por espectrometría de masas.

Tabla XXV (continuación). Composición de ácidos grasos, como % del total y mg por g de PS, de *Tetraselmis suecica* cultivada con diferentes fuentes de N en las fases logarítmica (log), inicio estacionaria (est-1) y estacionaria avanzada (est-2) del ciclo de crecimiento.

AG	urea						amonio			
	log		est-1		est-2		log		est-1	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
14:0	0.28	0.25	0.26	0.35	0.28	0.29	0.24	0.30	0.33	0.45
16:0	16.04	14.25	13.54	18.31	18.15	19.24	12.02	14.95	12.24	16.90
16:1 ω 9	5.10	4.53	5.10	6.89	2.69	2.85	5.57	6.93	4.16	5.75
16:2 ω 6	0.36	0.32	0.21	0.29	0.14	0.15	0.32	0.40	0.61	0.84
16:2 ω 4	0.14	0.12	tr	tr	0.10	0.11	-	-	0.13	0.18
16:3 ω 6	0.42	0.38	0.57	0.76	0.35	0.37	0.70	1.62	0.93	1.29
18:0	0.17	0.15	0.16	0.21	0.26	0.27	tr	tr	0.28	0.38
16:3 ω 3	2.16	1.92	1.49	2.02	1.05	1.11	2.22	2.76	1.57	2.17
18:1 ω 9	6.76	6.01	6.70	9.06	8.77	9.30	5.15	3.32	4.46	6.15
16:4 ω 3	21.13	18.77	20.71	28.02	16.50	17.49	23.83	11.71	23.11	31.91
18:2 ω 6	3.15	2.80	3.42	4.63	4.59	4.86	3.03	3.77	4.73	6.53
18:3 ω 6	0.44	0.39	1.18	1.60	1.15	1.22	1.37	1.70	1.38	1.91
18:3 ω 3	23.50	20.88	22.36	30.25	22.14	23.47	22.68	28.21	24.73	34.16
20:1 ω 9	1.18	1.04	0.76	1.03	1.42	1.51	0.85	1.05	0.82	1.13
18:4 ω 3	9.27	8.24	10.16	13.74	7.40	7.84	9.42	11.71	9.24	12.75
20:2 ω 6	0.60	0.53	0.48	0.64	0.60	0.64	0.72	0.89	0.58	0.80
Δ 2.12 ⁽¹⁾	1.66	1.47	1.94	2.62	1.24	1.32	2.02	2.51	1.44	1.99
20:3 ω 6	⁽³⁾ tr	tr	tr	tr	0.31	0.33	⁽²⁾ -	-	tr	tr
20:4 ω 6	0.50	0.44	0.91	1.23	1.01	1.08	1.07	1.33	0.85	1.17
20:3 ω 3	0.34	0.30	0.60	0.81	0.24	0.25	tr	tr	tr	tr
20:4 ω 3	1.22	1.08	1.22	1.65	1.16	1.23	1.05	1.31	0.82	1.13
20:5 ω 3	5.09	4.53	8.24	11.15	9.39	9.95	6.83	8.50	6.96	9.61
21:5 ω 3	0.49	0.44	nc	nc	0.44	0.47	0.91	1.13	0.33	0.46
total (mg.g ⁻¹ PS):		88.86		135.27		106.00		124.35		138.10
%(S+MI):		29.52		26.51		32.20		23.83		22.58
%PI:		70.48		73.49		67.80		76.17		77.42
(S+MI)/PI:		0.42		0.36		0.47		0.31		0.29
w6/w3:		0.09		0.10		0.14		0.11		0.14

⁽¹⁾ Di: no identificado, siendo i el tiempo de retención relativo; ⁽²⁾ -: no detectado; ⁽³⁾ tr: traza.

AG: ácido graso; S: ácidos grasos saturados; MI: monoinsaturados; PI: poliinsaturados.

Los principales ácidos grasos cuantitativamente son el 16:0 (12.0 - 19.3% del total), 16:1 ω 9 (2.7 - 5.6%), 16:4 ω 3 (16.5 - 23.8%), 18:1 ω 9 (4.5 - 15.6%), 18:2 ω 6 (3.0 - 4.7%), 18:3 ω 3 (16.1 - 24.7%), 18:4 ω 3 (4.1 - 10.7%) y 20:5 ω 3 (4.5 - 12.1%).

Durante el crecimiento logarítmico no existen diferencias en los perfiles de ácidos grasos de las células cultivadas con diferentes fuentes de N. Esto se mantiene para los cultivos con nitrato y nitrito a lo largo de todo el cultivo. Sin embargo, a partir de la fase estacionaria, los cultivos con urea y amonio se

comportan de modo diferente. En los medios de urea o amonio, el α -linolénico y octadecatetraenoico (18:4 ω 3) mantienen porcentajes más altos durante todo el crecimiento. En general, el porcentaje de poliinsaturados es más alto en los cultivos con urea y amonio a lo largo del cultivo.

Los ácidos grasos saturados + monoinsaturados (S+MI) y poliinsaturados (PI) se mantienen en una relación próxima a 30:70 durante el crecimiento logarítmico e inicio fase estacionaria. En los cultivos con nitrato y nitrito esta relación cambia hasta 40:60 (S+MI):PI al final del cultivo, mientras en los cultivos con urea se mantiene en valores próximos a 30:70.

La relación entre ácidos grasos poliinsaturados de las series ω 6 y ω 3 (ω 6/ ω 3), aumenta con la edad del cultivo, de 0.09 - 0.11 en la fase logarítmica a 0.12 - 0.14 al final del cultivo.

El % del total de los ácidos grasos saturados alcanza generalmente un mínimo al comienzo de la fase estacionaria. Palmitoleico y eicosenoico tienden a ser más abundantes durante el crecimiento logarítmico, excepto el 20:1 ω 9 en el medio de urea donde presenta niveles más altos en la fase est-2. En las fuentes de N oxidado la abundancia relativa del oleico aumenta continuamente con la edad del cultivo, mientras en el medio con urea aumenta sólo a lo largo de la fase estacionaria.

Los niveles más altos de 20:2 ω 6 (y 16:2 ω 6 en el medio de urea) se observan en la fase logarítmica, mientras 16:2 ω 6, 18:2 ω 6, 16:3 ω 6 y 18:3 ω 6 son más abundantes (% del total) en la fase est-1 o est-2. Los mayores porcentajes de 16:3 ω 3 y 18:3 ω 3 se observaron en la fase logarítmica.

El 16:4 ω 3 y el 18:4 ω 3 son más abundantes en la fase logarítmica o al comienzo de la fase estacionaria (urea). Los mayores contenidos de 20:4 ω 6 y 20:5 ω 3 se observan en la fase estacionaria, mientras el 20:4 ω 3 se mantiene constante a lo largo del cultivo.

El contenido absoluto en cualquier ácido graso saturado ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) aumenta continuamente a lo largo del ciclo de crecimiento. Los ácidos grasos mono- y poliinsaturados tienden a alcanzar los valores máximos al comienzo de la fase estacionaria, manteniéndose o decreciendo posteriormente.

Los contenidos más altos en ácidos grasos esenciales fueron ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS): α -linoleico, 6.91 (nitrato, est-1), γ -linolénico, 2.12 (nitrito, est-1), α -linolénico, 34.16, (amonio, est-1); araquidónico, 1.57 (nitrato, est-1), EPA, 16.72.

ENSAYOS SOBRE EL EFECTO TÓXICO DEL AMONIO A ELEVADAS CONCENTRACIONES

Diseño experimental

Debido a la inhibición del crecimiento observada en los cultivos de *D. tertiolecta*, *T. suecica* y *P. tricornutum* a concentraciones de sulfato amónico 2 mM (4 mM de amonio), nos planteamos analizar si este efecto inhibitorio es debido a la toxicidad del amonio, o al descenso del pH extracelular observado en estos medios. Al mismo tiempo, se plantea comprobar si el aumento del pH extracelular observado en los cultivos con nitrato influye sobre el crecimiento observado en los cultivos de estas microalgas.

En este ensayo, las microalgas *T. suecica* y *P. tricornutum* se cultivaron con nitrato sódico o sulfato amónico como fuente de N. De cada una de las fuentes de N se establecen dos series de cultivos: una de ellas tamponada con HEPES-NaOH 20 mM y otra sin tampón. En todos los casos la concentración final de nitrógeno en el medio es de 4 mg.átom N.l⁻¹.

Los cultivos se realizan en botellas de 500 ml con 300 ml de medio de cultivo, manteniendo las condiciones experimentales citadas en el apartado de "Cultivo", con excepción del tamponamiento del medio. Los cultivos se mantienen aireados, mediante un turbosoplante con filtración del aire a 0.25 µm mediante filtros Millipore, y un flujo de 2 l.min⁻¹.

Los inóculos se toman a partir de cultivos "stock" en medio con nitrato y en fase exponencial tardía de crecimiento, añadiéndose el volumen necesario para obtener una densidad celular inicial de 0.5 x 10⁶ células.ml⁻¹ para *T. suecica* y 1.5 x 10⁶ células.ml⁻¹ para *P. tricornutum*.

En cada cultivo se determina diariamente la densidad celular y el pH del medio. Los análisis por citometría de flujo y determinación de la tasa de fotosíntesis se iniciaron el primer día en que se observaron cambios en el pH del medio con amonio no tamponado. Esto correspondió a días diferentes (3^{er} o 4^o día de cultivo) según la experiencia y especie, y las figuras se presentan en función del día de análisis.

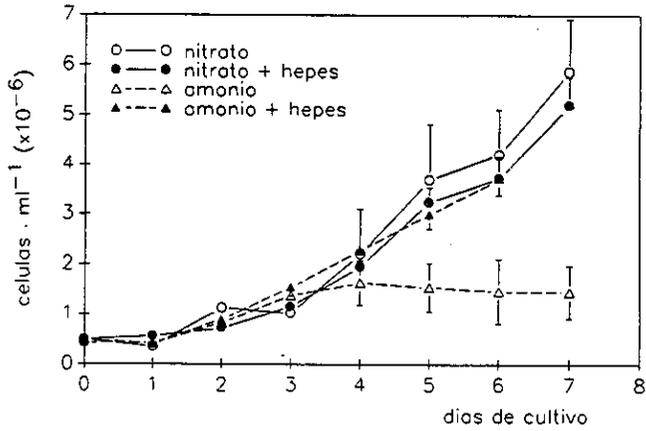


Fig. 20.A. Crecimiento en cultivos de *T. suecica* en medios con nitrato o amonio, tamponados o no con HEPES 20 mM.

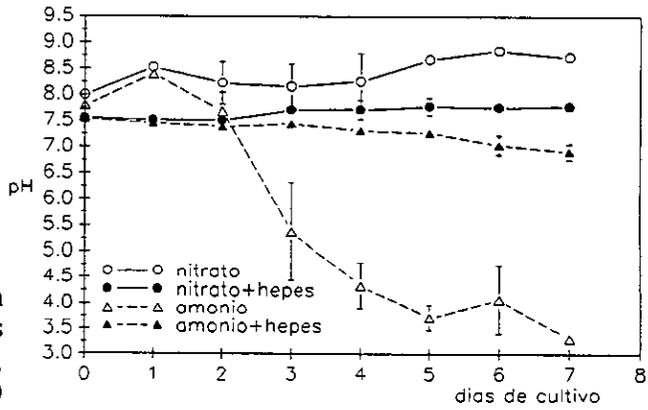


Fig. 20.B. Evolución del pH en cultivos de *T. suecica* en medios con nitrato o amonio, tamponados o no con HEPES 20 mM.

Crecimiento y pH extracelular (pHe)

El tamponamiento del medio no incrementa el crecimiento durante el período ensayado (8 días) cuando la fuente de N es nitrato sódico (Figs. 20A y 21A), aún cuando en estos cultivos el pH del medio aumenta por encima de 8 a partir del 2º día de cultivo cuando no se tampona el medio (Figs. 20B y 21B). Sin embargo, el crecimiento es inhibido en los medios de amonio no tamponados a partir del 3^{er} ó 4º día de cultivo, coincidiendo en ambas especies con una fuerte disminución del pH extracelular. No se produce una inhibición del crecimiento relacionada con la alta concentración de amonio, siendo similares los crecimientos con amonio tamponado a los observados en nitrato tamponado.

En ambas especies, el tamponamiento del medio con Hepes-NaOH 20 mM pH 7.5 permite mantener el pH extracelular en valores óptimos durante el período

Fig.21.A. Crecimiento en cultivos de *P. tricornutum* en medios con nitrato o amonio, tamponados o no con HEPES 20 mM.

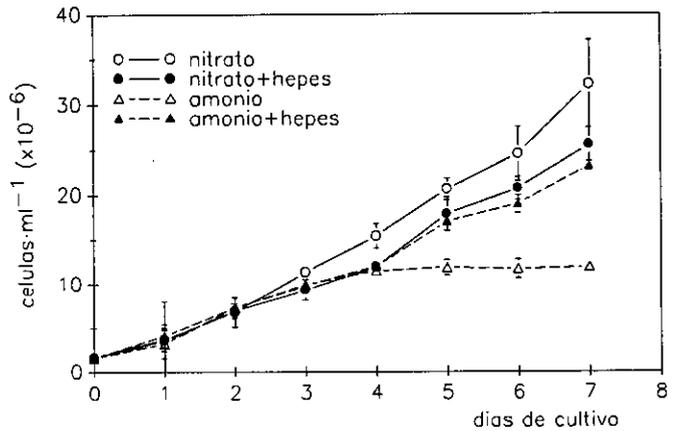


Fig.21.B. Evolución del pH extracelular en cultivos de *P. tricornutum* en medios con nitrato o amonio, tamponados o no con HEPES 20 mM.

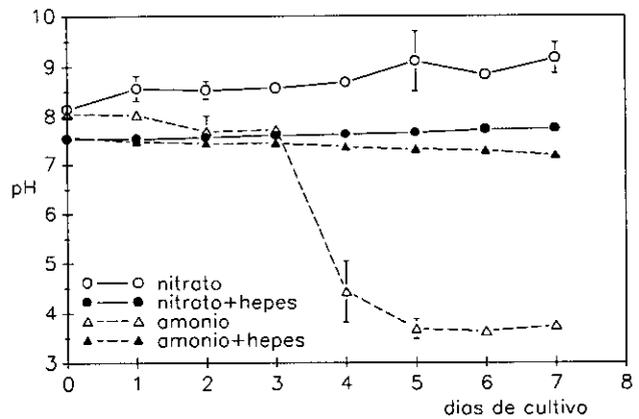


Tabla XXVI. Tasa de crecimiento (k , doblajes.día⁻¹) en cultivos de *T. suecica* y *P. tricornutum* en medios con nitrato o amonio, tamponados o no con HEPES 20 mM.

	Medio de cultivo			
	nitrate	nitrate + HEPES	amonio	amonio + HEPES
<i>T. suecica</i>	0.51 ± 0.04	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.05	0.49 ± 0.01
<i>P. tricornutum</i>	0.65 ± 0.06	0.60 ± 0.01	0.63 ± 0.07	0.60 ± 0.07

experimental, aún cuando se produzca un aumento continuo en los medios con nitrato y una disminución continua en aquellos con amonio, de un pH inicial 7.6 a un pH final entre 6.9 y 7.8 (Figs. 20B y 21B).

La tasa de crecimiento obtenida en los diferentes medios no difiere ni en función de la fuente de N ni en función del tamponamiento del medio (Tabla XXVI), para las dos microalgas. Las tasas de crecimiento obtenidas en los medios

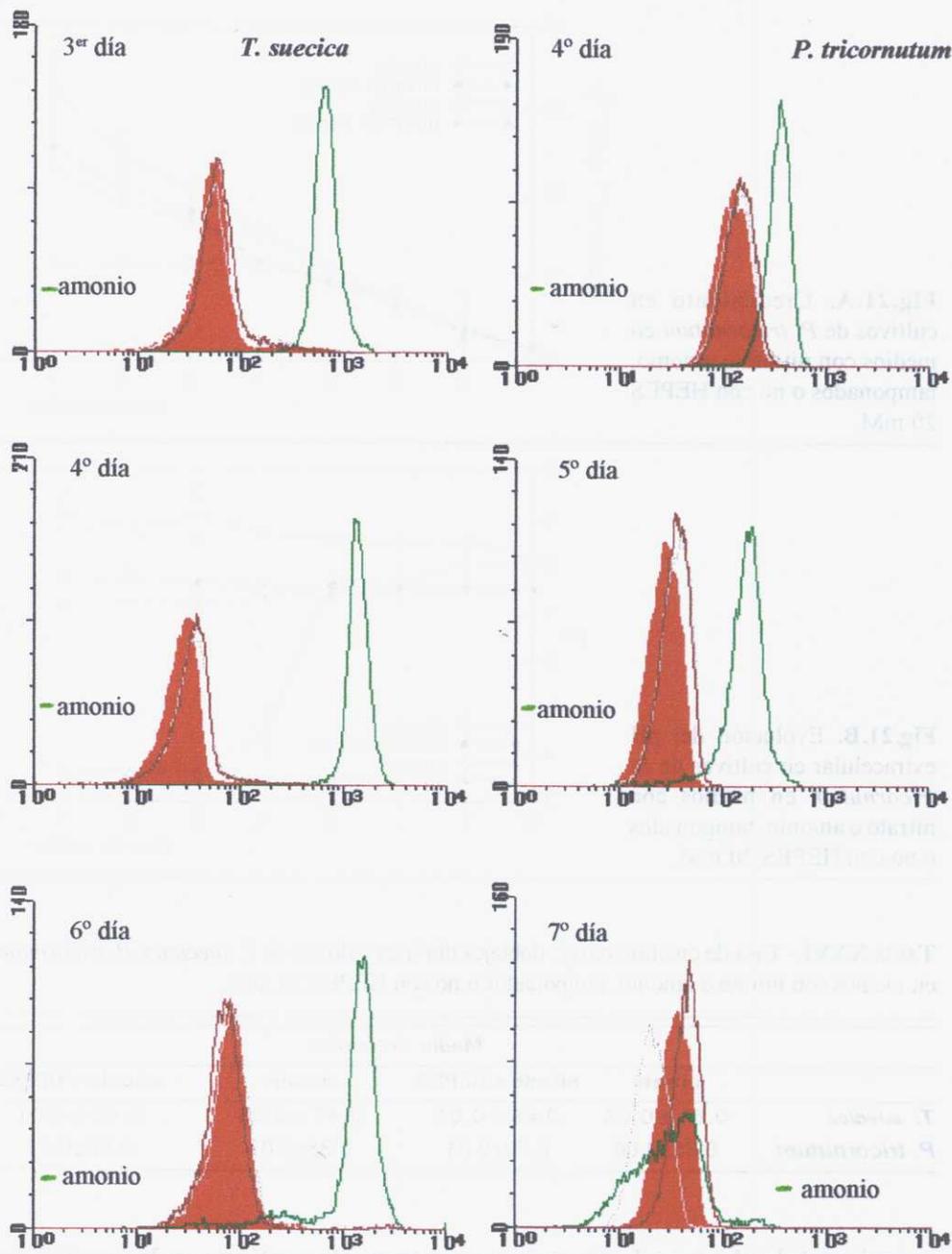


Fig. 22. Histogramas de la fluorescencia emitida por el fluorocromo diclorofluoresceína (DCF) que reflejan los cambios del pH intracelular (eje X) en células de *T. suecica* y *P. tricornutum* cultivadas con nitrato o amonio en medios tamponados o no con HEPES 20 mM. El análisis se inició el día de cultivo que se observaron variaciones en el pH del medio con amonio. En el eje Y se representa el número de células correspondiente a cada uno de los canales de fluorescencia.

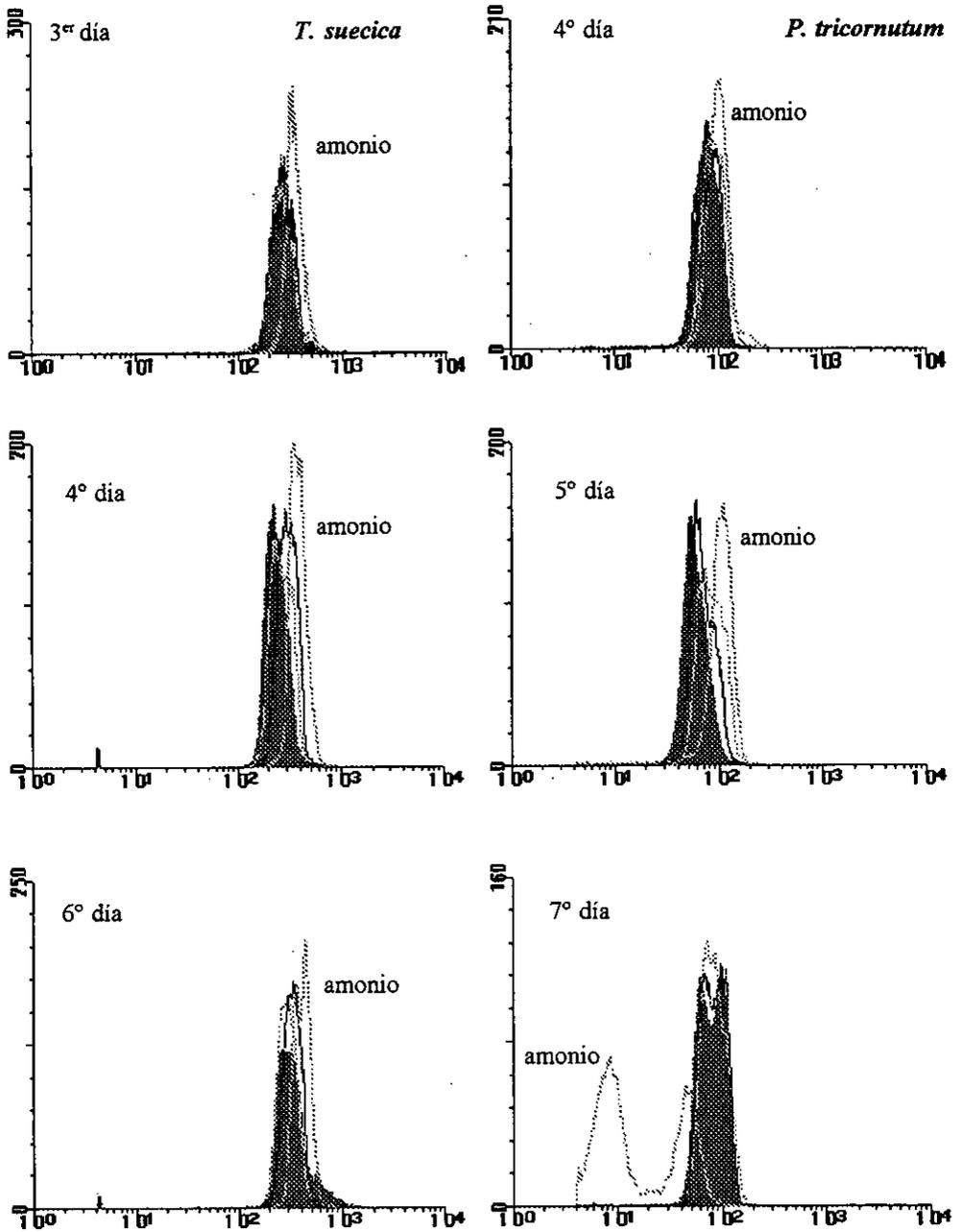


Fig. 23. Histogramas de fluorescencia de la clorofila *a* de células de *T. suecica* y *P. tricornutum* cultivadas con nitrato o amonio en medios tamponados o no con HEPES 20 mM. El análisis se inició el día de cultivo que se observaron variaciones en el pH del medio con amonio. En el eje X se representa la autofluorescencia celular (expresada en números canales) y en el eje Y el número de células.

con nitrato no tamponados, en los cuales se produce un aumento del pH extracelular, es superior a aquella observada en los medios tamponados: 0.65 doblajes.día⁻¹ (*P. tricornutum*) y 0.51 doblajes.día⁻¹ (*T. suecica*) frente a 0.60 y 0.48 doblajes.día⁻¹, respectivamente.

pH intracelular (pHi) y autofluorescencia

Las células de *T. suecica* cultivadas con amonio no tamponado muestran un aumento en el pHi (Fig. 22) a medida que disminuye el pHe a lo largo del período experimental. La moda de la distribución (unidades arbitrarias de pH) aumenta de 626 el tercer día de cultivo (pHe = 4.42) a 1568 el sexto día (pHe = 3.27). En el medio con nitrato no tamponado, en el que el pH extracelular aumenta a lo largo del cultivo de un valor inicial de 7.60 a 8.82, y en los medios con nitrato o amonio tamponados, en los que el pH se mantiene en el rango 7 - 8 durante todo el período, no varía el pHi a lo largo del tiempo de cultivo (Fig. 22). Tampoco se observan diferencias si se comparan entre ellos para un mismo día de cultivo. Las células cultivadas con amonio tienden a presentar una fluorescencia de la clorofila *a* ligeramente mayor a lo largo del período experimental (Fig. 23).

El pHi de las células de *P. tricornutum* cultivadas con amonio es más alto que aquel observado en los restantes medios (Fig 22). A día 4 de cultivo, la moda de la distribución para los cultivos con amonio (pHe = 3.74) es de 358, mientras en los restantes cultivos (pHe = 7.37 - 8.70) los valores de la moda varían entre 122 y 144. Estas diferencias en el pHi se mantienen durante el tiempo de cultivo. No hay variaciones en la fluorescencia de la clorofila *a* hasta el último día de análisis, cuando tanto el análisis de la autofluorescencia celular como el del pHi reflejan una desorganización celular (Fig. 23).

Tasa de fotosíntesis

En la fig. 24 se representa la tasa de fijación de C en base a la clorofila *a* (*P. chlorophyll a-specific carbon assimilation rate*). Los cultivos de ambas especies en amonio no tamponado a día 4 muestran tasas fotosintéticas mayores a lo largo de todo el período de luz. No obstante, a día 7 esta tasa difiere de aquella de los cultivos en amonio tamponado sólo durante la primera hora de luz en el caso de *T. suecica*; en el caso de *P. tricornutum*, los cultivos en amonio no tamponado presentan sólo una asimilación residual de C, con un contenido de clorofila de 0.10 pg.cel⁻¹ frente a 0.40 - 0.51 pg.cel⁻¹ en los restantes medios.

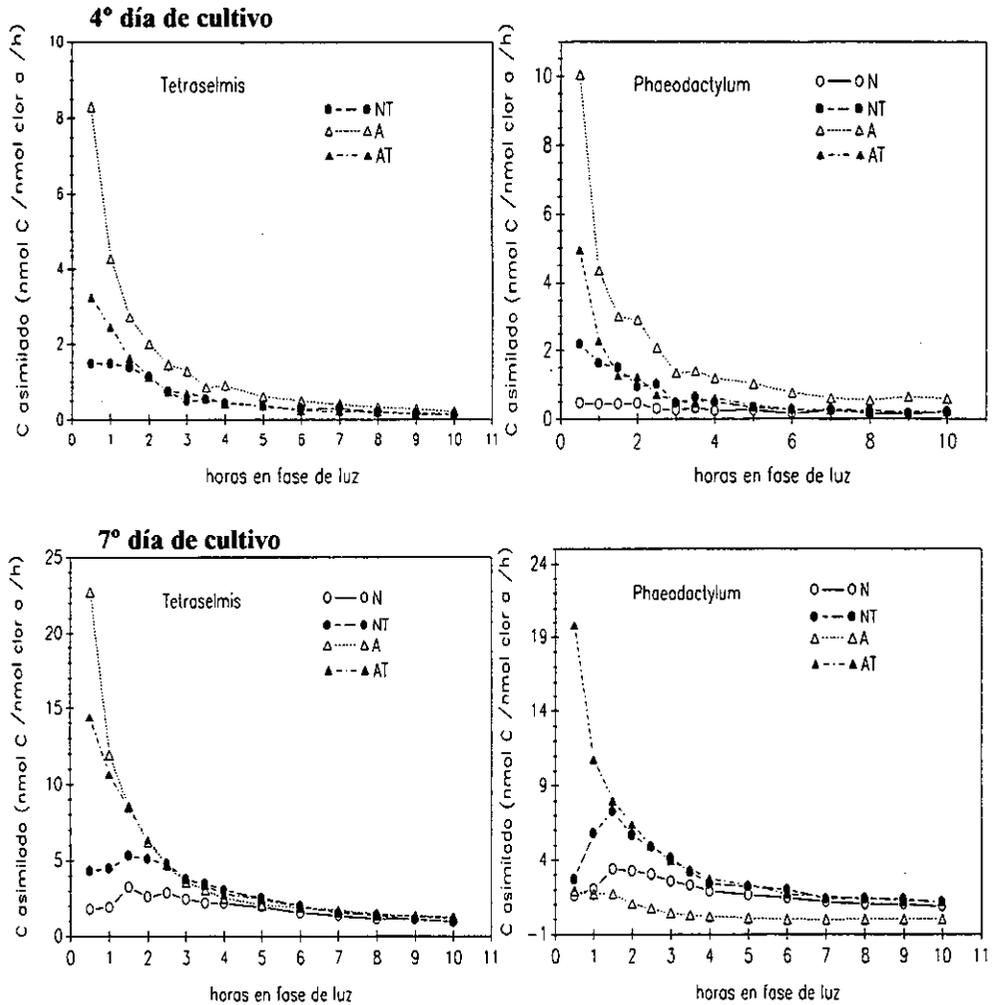


Fig. 24. Tasa fotosintética de *T. suecica* y *P. tricoratum* cultivadas en medios de nitrato o amonio, tamponados o no con HEPES 20 mM. N: nitrato; NT: nitrato tamponado; A: amonio; AT: amonio tamponado.

En ambas especies, la única diferencia entre los medios tamponados se observa en una mayor asimilación de C durante la primera hora y media de luz cuando la fuente de N es amonio, igualándose a partir de este momento del ciclo de luz.

La producción de C a lo largo del período de luz ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cultivo) sigue cinéticas diferentes en función de la fuente de N del medio (Fig. 25). La asimilación es siempre más rápida en los cultivos con amonio que en aquellos con nitrato,

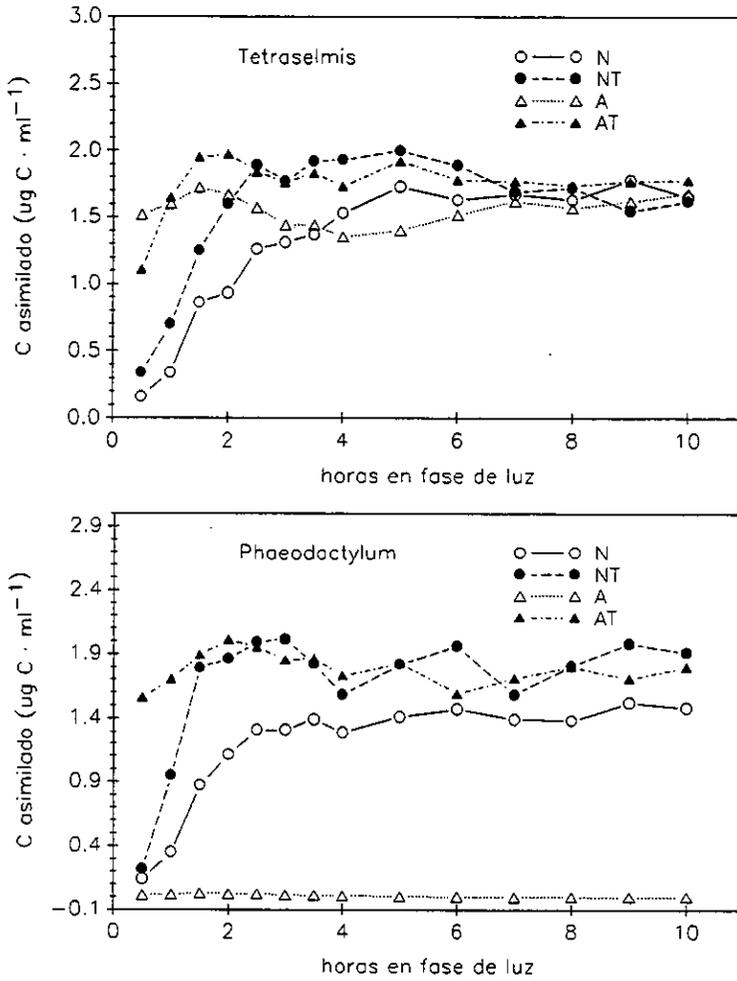


Fig. 25. Producción de C por volumen de cultivo de *T. suecica* y *P. tricornutum* cultivadas en medios de nitrato o amonio, tamponados o no con Hepes 20 mM, a día 7 de cultivo. N: nitrato; NT: nitrato tamponado; A: amonio; AT: amonio tamponado.

independientemente del tamponamiento del medio. En los medios con nitrato tamponados, la pendiente es mucho más pronunciada que cuando el medio no es tamponado, alcanzándose en los primeros valores de C asimilado equivalentes a los medios de amonio a la hora y media - dos horas del ciclo de luz, por tiempos superiores a las 5 h en los cultivos con nitrato no tamponado.

CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE JUVENILES DE MEJILLÓN GALLEGO (*Mytillus galloprovincialis* Lmk) ALIMENTADOS CON DIETAS DE MICROALGAS VIVAS

El cultivo extensivo de mejillón es una actividad de creciente importancia económica en diferentes áreas geográficas. La semilla del mejillón se ha obtenido tradicionalmente a partir de colectores sobre bateas o de bancos naturales en el litoral (Mariño *et al.*, 1983; Dardignac-Corbeil, 1990). Las primeras etapas del cultivo (semilla y juveniles) son críticas en el cultivo de moluscos bivalvos, y mejoras en la producción requieren mejoras en la calidad de la semilla.

Se ha estudiado ampliamente el valor nutricional de diferentes especies microalgales para almeja y ostra, pero sólo se han realizado unos pocos estudios con juveniles de mejillón (p. ej., Walne, 1970; Strömngren y Cary, 1984). Muy poco se conoce acerca de los requerimientos nutricionales del mejillón en las primeras etapas del desarrollo (Hawkins y Bayne, 1991).

El mejillón es, por otra parte, utilizado como organismo test o bioindicador en la investigación ambiental marina, habiéndose realizado un importante número de trabajos sobre su biología. Los resultados obtenidos en laboratorio mejoran notablemente con una alimentación adecuada (Martínez-Expósito *et al.*, 1994). Las especies microalgales utilizadas como alimento deben tener también una importante influencia sobre los resultados obtenidos a partir de experimentos fisiológicos.

La dieta algal debe aportar los nutrientes requeridos por los juveniles de bivalvos, proporcionando la energía necesaria para satisfacer las demandas metabólicas y crecimiento. El valor alimenticio de una especie microalgal depende de su tamaño celular, digestibilidad, toxicidad y composición bioquímica (Webb y Chu, 1983). Las dietas mixtas, constituidas por más de una especie microalgal, generalmente han promovido un mejor crecimiento que las dietas monoalgales (Strömngren y Cary, 1984).

Un procedimiento útil para la evaluación de diferencias en el valor alimenticio es estimar las eficiencias de crecimiento relativas de los organismos alimentados con diferentes dietas. La importancia de suministrar una dieta adecuada es muy clara: el crecimiento será más rápido y más eficiente, la semilla alcanzará un tamaño superior y reponderá mejor en el momento de ser transferida al medio natural (Laing y Millican, 1986).

El objetivo del presente estudio es evaluar el valor como alimento de diferentes dietas microalgales para semilla de mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk, medido en términos de tasa de crecimiento, composición bioquímica y eficiencia de conversión del alimento suministrado.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron tres microalgas marinas, *D. tertiolecta* (*Chlorophyceae*), *T. suecica* (*Prasynophyceae*) y *P. tricornutum* (*Bacillariophyceae*), cultivadas tal y como se describe en el apartado de "Cultivo", con nitrato como fuente de N. Los cultivos se utilizaron durante el crecimiento exponencial.

Los juveniles de mejillón se recogieron de la Ría de Arousa, Galicia, España. A la llegada al laboratorio, se seleccionaron individuos entre 6 y 13 mm y se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 20 individuos. Un grupo se utilizó para medir la longitud y el volumen; luego la vianda se separó y mezcló, almacenándose la muestra a -20°C hasta el análisis bioquímico; este grupo representa los mejillones "salvajes". Los restantes grupos se alimentaron con *T. suecica* durante un tiempo de aclimatación de 7 días; después se mezclaron y los mejillones se redistribuyeron aleatoriamente en grupos de 20 individuos. No se proporcionó alimento durante las 24 h previas al inicio de los experimentos de alimentación.

Los mejillones se cultivaron en tanques cilíndricos de 1 l de capacidad con agua de mar natural filtrada a 0.45 µm y tratada con luz ultravioleta. Los tanques se mantuvieron en una cámara de cultivo a 18±1°C y 12:12 h luz:oscuridad. Se proporcionó aireación para mantener una tensión de O₂ adecuada y evitar la sedimentación del alimento. El pH del agua utilizada fue 7.9. Los tanques se vaciaron, limpiaron y rellenaron con agua de mar filtrada dos veces por semana. Cada día, el agua de mar de los tanques se filtró (5 µm) para retirar las heces y pseudoheces, se registró el pH y se retiraron y midieron los mejillones muertos.

La duración de los experimentos fue 60 días. Las dietas algales testadas, tanto monoalgales como mixtas, fueron: *T. suecica* (dieta Ts), *D. tertiolecta* (dieta Dt), *P. tricornutum* (dieta Pt), *T. suecica* + *D. tertiolecta* (dieta TsDt), *T. suecica* + *P. tricornutum* (dieta TsPt), y *D. tertiolecta* + *P. tricornutum* (dieta DtPt), manteniéndose asimismo un control no alimentado.

Durante el período de aclimatación, el alimento suministrado se incrementó gradualmente, estableciéndose en un nivel dietario de 1.20 mg de biomasa seca algal por mejillón y día. Esta ración alimenticia se suministró en varias dosis a lo

Tabla XXVII. Longitud y volumen iniciales de juveniles del mejillón *M. galloprovincialis* para experimentos de alimentación con diferentes dietas microalgales (I.C. = intervalo de confianza).

Dieta	longitud (mm)		volumen (mm ³)	
	media	I.C. 95%	media	I.C. 95%
Ts	10.07	9.78-10.38	93.06	84.55-102.42
Dt	9.03	8.12 -10.03	70.00	50.00-97.00
Pt	10.52	9.83-11.27	116.32	96.23-140.62
TsDt	10.38	10.00-10.70	100.01	85.66-116.77
TsPt	8.86	8.16-9.61	70.96	57.30-87.87
DtPt	8.52	8.06-8.99	62.03	51.44-75.66

Dietas: *T. suecica* (Ts), *D. tertiolecta* (Dt), *P. tricornutum* (Pt) y dietas mixtas (1:1 en peso seco).

largo del período de luz. Antes de añadir las suspensiones algales, se retiraba de los tanques un volumen de agua de mar equivalente al volumen de suspensión algal, para mantener un volumen constante.

Se establecieron densidades celulares equivalentes en base al peso seco celular de las diferentes especies microalgales utilizadas. Para las dietas mixtas, las raciones se ajustaron de modo que cada microalga contribuyó a la ración en igual peso seco.

La ración alimenticia se incrementó hasta 1.81 mg de biomasa seca algal por semilla y día a lo largo del período experimental.

Las condiciones iniciales de las diferentes dietas experimentales se presentan en la Tabla XXVII.

Se registró el crecimiento en longitud y volumen a intervalos periódicos tal y como se describe en "Materiales y Métodos". Al final de los experimentos, se separó la vianda de los mejillones alimentados con cada dieta y se liofilizó. El análisis bioquímico de la carne liofilizada se realizó tal y como se describe en "Materiales y Métodos".

Resultados

Crecimiento en longitud de la concha

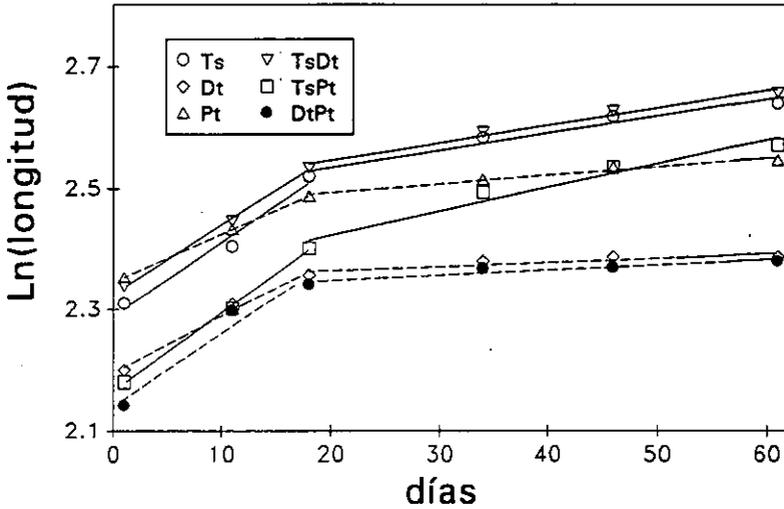
En la fig. 26 se representa la evolución temporal de la longitud de la concha para cada dieta. El crecimiento tiende a ajustarse a curvas, con puntos de inflexión

Tabla XXVIII. Comparación de las líneas de regresión obtenidas para el crecimiento en longitud de la concha de juveniles de mejillón alimentados con diferentes dietas microalgales. X: tiempo (días); Y: Ln(longitud) medio.

	g.l.	Σx^2	Σxy	Σy^2	Coeficiente de regresión	Desviaciones de la regresión		
						g.l.	SC	CM
Dentro								
Ts	3	996.75	2.792	0.00820	0.00280	2	0.00038	0.00019
Dt	3	996.75	0.688	0.00061	0.00069	2	0.00014	0.00007
Pt	3	1010.00	1.443	0.00211	0.00143	2	0.00005	0.00002
TsDt	3	1010.00	2.885	0.00838	0.00286	2	0.00014	0.00007
TsPt	3	998.75	3.954	0.01616	0.00396	2	0.00051	0.00025
DtPt	3	998.75	0.862	0.00082	0.00086	2	0.00008	0.00004
						12	0.00128	0.00011
Combin., W	18	6011.00	12.624	0.03628	0.00210	17	0.00977	0.00057
					Diferencia entre pendientes:	5	0.00848	0.00170
Comparación de varianzas residuales:				F = 2.00	P > 0.05			
(Test de Barlett)								
Comparación de pendientes:				F = 15.85(5,12)	P < 0.01			

sobre el día 18 de cultivo. En función de ello, el período experimental se dividió en dos subperíodos: el primero, hasta el día 18, y el segundo después del día 18. Utilizando regresión lineal se ajustó a una recta el crecimiento en cada uno de estos subperíodos; los coeficientes de regresión se compararon mediante análisis de covarianza. Las pendientes no fueron significativamente diferentes durante el primer período experimental ($P > 0.05$). Las diferencias aparecen en el segundo período experimental. En la Tabla XXVIII se presentan los resultados del ANCOVA para los datos del segundo período experimental. Dado que se observaron diferencias significativas, se realizó una comparación de las pendientes entre la dieta de *T. suecica* (Ts) y cada una de las restantes dietas (análisis no mostrados). No se observaron diferencias significativas entre los coeficientes de regresión obtenidos en las dietas Ts, TsDt y TsPt ($P > 0.05$); el coeficiente de la dieta Ts sí fue significativamente diferente de las pendientes para las dietas Dt, Pt y DtPt ($0.05 > P > 0.01$). La pendiente para la dieta Dt no fue significativamente diferente de 0 ($P > 0.05$).

A partir de estos resultados, las dietas se dividieron en dos grupos. Las tasas de crecimiento más altas se obtuvieron con dietas que contienen *T. suecica* (Ts, TsDt y TsPt); entre ellas, la dieta mixta TsPt soportó el mejor crecimiento a lo largo



	Días 1 - 18			Días 18 - 61		
	b_0	$b_1 (x10^{-3})$	r	b_0	$b_1 (x10^{-3})$	r
Ts	2.29±0.03	11.41±2.07	0.988	2.48±0.02	2.81±0.44	0.978
Dt	2.20±0.01	8.86±0.81	0.993	2.35±0.01	0.69±0.26	0.891
Pt	2.35±0.00	7.37±0.16	0.999	2.46±0.01	1.43±0.16	0.983
TsDt	2.33±0.01	10.69±0.71	0.999	2.49±0.01	2.86±0.26	0.990
TsPt	2.17±0.01	12.14±0.89	0.999	2.34±0.02	3.96±0.50	0.978
DtPt	2.14±0.03	11.41±2.11	0.978	2.33±0.01	0.86±0.20	0.937

Fig. 26. Crecimiento en longitud de la concha de juveniles de mejillón alimentados con diferentes dietas microalgales: *T. suecica* (Ts), *D. tertiolecta* (Dt), *P. tricorutum* (Pt), y dietas mixtas (1:1 en peso seco). Las ecuaciones de las rectas, para los dos períodos de crecimiento, se ajustaron mediante regresión por mínimos cuadrados: $Y = b_0 + b_1 X$; donde Y es la longitud como Ln(long), y X el tiempo en días. Los coeficientes obtenidos (media±ES) se dan bajo la figura.

de todo el período experimental. En las restantes dietas se observaron tasas de crecimiento inferiores.

Los mismos patrones de crecimiento se observan cuando se comparan los histogramas de talla para las diferentes dietas (Fig. 27). En las dietas que incluyen *T. suecica* (Figs. 27A, D, E), y en la dieta de *P. tricorutum* (Fig. 27C), la distribución de tallas presenta un desplazamiento continuo a clases de mayor tamaño durante el curso del experimento. Por el contrario, en las dietas de *D. tertiolecta* y *D. tertiolecta + P. tricorutum*, la distribución de tallas permaneció invariable después del día 18 y 35, respectivamente (Figs 27B, F).

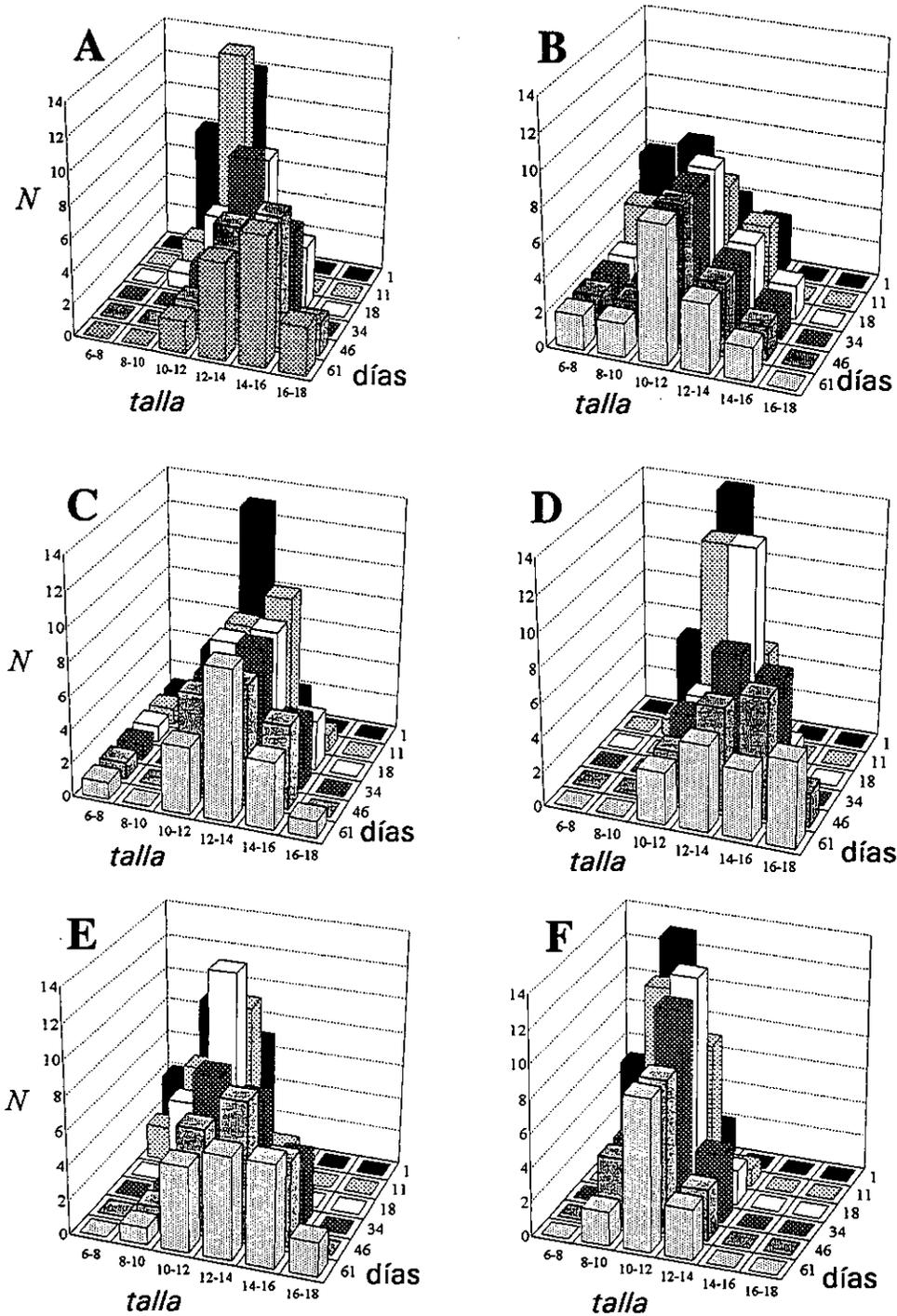


Fig. 27. Histogramas de talla (mm) vs. tiempo (días) de juveniles de mejillón alimentados con diferentes dietas microalgales: *T. suecica* (A), *D. tertiolecta* (B), *P. tricorutum* (C), *T. suecica* + *D. tertiolecta* (D), *T. suecica* + *P. tricorutum* (E) y *D. tertiolecta* + *P. tricorutum* (F).

Tabla XXIX. Tasa relativa de crecimiento en longitud (Gr) a los 11, 18, 34, 46 y 60 días, de mejillones alimentados con diferentes dietas microalgales.

Dieta	Gr_{11}	Gr_{18}	Gr_{34}	Gr_{46}	Gr_{60}
control	29	16	15	12	8
Ts	100	100	100	100	100
Dt	97	69	61	56	52
Pt	82	64	59	59	59
TsDt	110	94	95	94	97
TsPt	126	107	114	115	120
DtPt	163	97	83	75	72

Se calculó la tasa relativa de crecimiento en longitud (Gr , Tabla XXIX), con la dieta *T. suecica* como control, según la fórmula:

$$Gr = (G \text{ dieta} / G \text{ control}) \times 100$$

donde G es la tasa de crecimiento en longitud, calculada como:

$$G = \text{Ln}(L_t) - \text{Ln}(L_0) / t$$

siendo L_t la longitud a tiempo t , L_0 la longitud inicial a día 1, y t el tiempo en días.

La tasa de crecimiento relativa obtenida en la dieta TsPt aumentó con respecto a la dieta *T. suecica* a lo largo del período experimental, mientras que la sustitución de un 50% de *T. suecica* con *D. tertiolecta* (dieta TsDt) resultó en una tasa de crecimiento relativa similar a la dieta Ts. En la dieta Pt, la tasa de crecimiento relativa se mantuvo estable, con valores en torno al 60%, después de 18 días de cultivo. En las dietas Dt y DtPt, las tasas de crecimiento en longitud relativas disminuyeron continuamente a lo largo del período experimental, dado que el crecimiento fue casi 0 desde el día 35 (Fig. 27).

Se observó un efecto sinérgico en las dietas mixtas respecto a sus respectivas dietas monoalgales (Tabla XXIX). En base a una interrelación lineal entre concentración celular de la suspensión y tasa de crecimiento (Strömngren y Cary, 1984), si sólo fueran ciertos efectos aditivos entre las dietas, las tasas de crecimiento relativas de las dietas mixtas deberían ser similares a las medias de las tasas relativas de las dietas monoalgales. Los valores Gr para las dietas mixtas fueron más altos que la media de los valores Gr de las dietas monoalgales.

La longitud de los mejillones aumentó ligeramente durante los primeros 11 días ($Gr = 29$), permaneciendo constante durante el restante tiempo experimental.

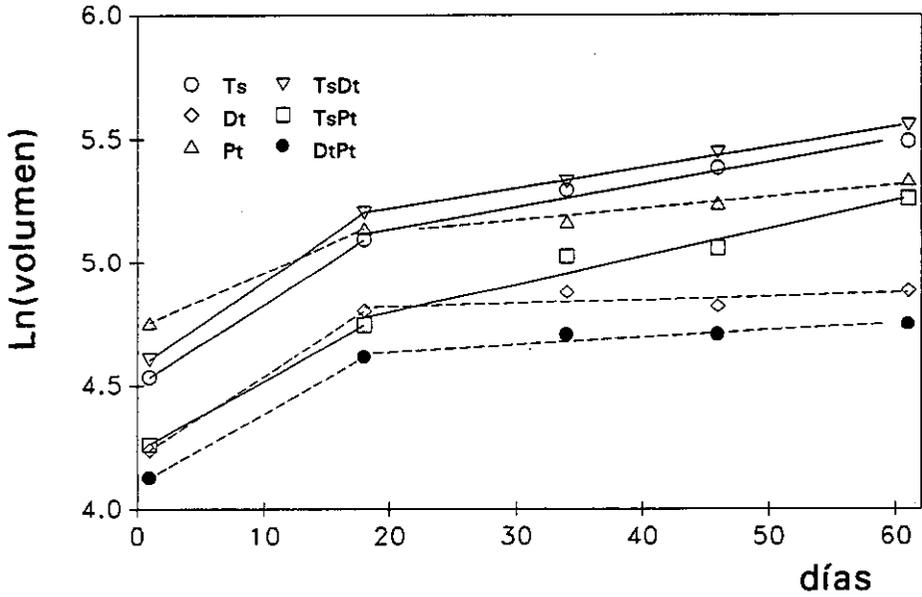
Tabla XXX. Comparación de las líneas de regresión obtenidas para el crecimiento en volumen de juveniles de mejillón alimentados con diferentes dietas microalgales. X: tiempo (días); Y: Ln(volumen) medio.

	g.l.	Σx^2	Σxy	Σy^2	Coeficiente de regresión	Desviaciones de la regresión		
						g.l.	SC	CM
Dentro								
Ts	3	996.75	9.077	0.08463	0.00911	2	0.00197	0.00098
Dt	3	996.75	1.478	0.00528	0.00148	2	0.00309	0.00154
Pt	3	1010.00	4.667	0.02319	0.00462	2	0.00162	0.00081
TsDt	3	1010.00	8.293	0.06813	0.00821	2	0.00004	0.00002
TsPt	3	998.75	11.318	0.13452	0.01133	2	0.00626	0.00313
DtPt	3	998.75	2.973	0.00984	0.00298	2	0.00099	0.00050
						12	0.01397	0.00116
Combin., W18	6011.00	37.806	0.32559	0.00629	17	0.08781	0.00517	
Diferencia entre pendientes:					5	0.07384	0.01477	
Comparación de varianzas residuales: $F = 1.77$						$P > 0.05$		
(Test de Barlett)								
Comparación de pendientes:				$F = 12.68(5,12)$		$P < 0.01$		

Crecimiento en volumen

En la fig. 28 se representa la evolución temporal del volumen (como la media de los logaritmos naturales del volumen) para cada dieta. Los datos se trataron del mismo modo que los datos de longitud, y los coeficientes obtenidos mediante regresión lineal se presentan bajo la figura. Todas las pendientes fueron significativamente diferentes de 0, excepto la pendiente para los mejillones alimentados con la dieta de *D. tertiolecta* ($P > 0.05$) durante el segundo período experimental. En la Tabla XXX se dan los resultados de la comparación de las pendientes observadas a partir del día 18. De nuevo se pueden diferenciar dos grupos de dietas: el crecimiento observado para mejillones alimentados con dietas que contienen *T. suecica* en su formulación no difirió entre ellas ($P > 0.05$), y fue más rápido que en las restantes dietas, Dt y DtPt ($P < 0.01$) y Pt ($0.05 > P > 0.01$).

Se calcularon las tasas de crecimiento en volumen (Gv) y las tasas relativas de crecimiento en volumen (Gvr) tal y como se explica para el crecimiento en longitud, reemplazando L_t y L_o por V_t y V_o , expresado en mm^3 . En la Tabla XXXI se representan las tasas de crecimiento relativas. En la dieta Pt, la tasa de crecimiento relativa se mantuvo estable (50 - 60%) a lo largo del período experimental, mientras que las tasas de crecimiento relativas en las dietas Dt y



	Días 1 - 18		Días 18 - 61		r
	b_0	$b_1 (\times 10^{-3})$	b_0	$b_1 (\times 10^{-3})$	
Ts	4.500	33.01	4.94±0.04	9.11±0.99	0.988
Dt	4.207	33.17	4.79±0.05	1.48±1.24	0.644
Pt	4.734	22.52	5.03±0.04	4.62±0.90	0.967
TsDt	4.570	35.22	5.05±0.07	8.21±0.15	0.999
TsPt	4.234	28.42	4.56±0.08	11.32±1.17	0.974
DtPt	4.099	28.67	4.57±0.03	2.98±0.71	0.942

Fig. 28. Crecimiento en volumen de juveniles de mejillón alimentados con diferentes dietas microalgales: *T. suecica* (Ts), *D. tertiolecta* (Dt), *P. tricorutum* (Pt) y dietas mixtas (1:1 en peso seco). Las ecuaciones de las rectas, para los dos periodos de crecimiento, se ajustaron mediante regresión por mínimos cuadrados: $Y = b_0 + b_1 X$; donde Y es el Ln(volumen) y X el tiempo en días. Los coeficientes obtenidos (media±ES) se presentan bajo la Figura.

DtPt descendieron hasta valores un 40% más bajos al final de los ensayos. Después del día 18, *P. tricorutum* soportó un crecimiento más rápido que las dietas Dt y DtPt, aunque no significativamente diferente ($P > 0.05$).

El volumen de los mejillones no alimentados no varió durante el transcurso del experimento ($Gvr = 0$).

Las tasas de crecimiento en longitud y volumen para el período experimental completo ($t=60$ días; Tabla XXXII) mostraron una correlación positiva y significativa ($r = 0.95$, $P < 0.01$) (Tabla XXXIII).

Tabla XXXI. Tasa relativa de crecimiento en volumen (G_{vr}) a los 18, 34, 46 y 60 días de mejillones alimentados con diferentes dietas microalgales.

Dieta	G_{vr}_{18}	G_{vr}_{34}	G_{vr}_{46}	G_{vr}_{60}
control	1	0	0	0
Ts	100	100	100	100
Dt	100	80	65	65
Pt	68	53	56	60
TsDt	107	95	99	99
TsPt	86	101	94	105
DtPt	87	76	69	64

Crecimiento en peso

Las tasas de crecimiento en peso seco (G_{PS}) y peso orgánico (G_{PO}) (Tabla XXXII) se calcularon según la fórmula:

$$G_p = \text{Ln} (P_t / P_o) / t$$

donde P_t y P_o son o el peso seco (PS) o el peso orgánico (PO = PSLC, peso seco libre de cenizas), final e inicial, respectivamente. Las tasas de crecimiento en peso más altas correspondieron a aquellas dietas que promovieron el crecimiento más rápido en longitud y volumen: *T. suecica* + *P. tricornutum*, *T. suecica* y *T. suecica* + *D. tertiolecta* ($20.63 - 24.78 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$).

G_{PS} y G_{PO} están significativamente correlacionadas con la tasa de crecimiento en longitud, G_{60} ($r = 0.99$ y 0.97 , respectivamente; $P < 0.001$), y con la tasa de crecimiento en volumen, Gv_{60} ($r = 0.93$ y 0.89 , respectivamente, $P < 0.001$) (Tabla XXXIII).

Tabla XXXII. Tasas de crecimiento en longitud (G_{60} , $\times 10^{-3}$), volumen (Gv_{60} , $\times 10^{-3}$), peso seco de la vianda (G_{PS} , $\times 10^{-3}$) y peso orgánico (G_{PO} , $\times 10^{-3}$); tasa de mortalidad (Z_{60}), índice de condición (C_i), y eficiencia bruta de crecimiento (K_f), para mejillones alimentados con diferentes dietas microalgales durante 60 días.

	G_{60}	Gv_{60}	G_{PS}	G_{PO}	Z_{60}	C_i	K_f
Ts	5.41	15.70	21.12	20.94	0.05	93.91	32.11
Dt	3.07	10.63	7.48	5.19	0.11	51.07	2.81
Pt	3.17	9.50	10.51	8.85	0.05	67.96	10.73
TsDt	5.19	15.56	20.71	20.63	0.11	95.93	31.59
TsPt	6.41	16.35	24.78	24.75	0.00	93.02	27.85
DtPt	3.93	10.23	13.78	14.85	0.36	69.42	9.47
Salvajes	-	-	-	-	-	69.13	-

Índice de condición, eficiencia de crecimiento bruta y mortalidad

El índice de condición elegido relaciona el peso seco de la vianda (mg) con el volumen total (mm^3):

$$Ci = \text{PS vianda} / V \text{ total}$$

El Ci tradicionalmente utilizado en estudios con bivalvos relaciona el peso seco de la vianda con el volumen interno. No obstante, los mejillones juveniles presentan conchas de escaso grosor, y el índice de condición calculado se consideró útil.

Ci tomó valores entre 90 y 100 en los mejillones alimentados con las dietas que llevan *T. suecica* (Tabla XXXII). El Ci para mejillones recolectados del litoral de volumen equivalente al volumen final alcanzado en estas dietas fue 59.88. En las dietas Pt y DtPt, Ci tomó valores similares al de los mejillones "salvajes" (69.13), y Ci fue inferior al de los mejillones "salvajes" para aquellos alimentados con *D. tertiolecta* (51.07). Ci cayó a 25.80 para los mejillones no alimentados.

La eficiencia de crecimiento bruta (K_1) es la proporción de la materia orgánica algal filtrada a partir de la suspensión que es transformada en crecimiento orgánico de los animales (Laing y Millican, 1986):

$$K_1 = I / C$$

donde I es el incremento en peso orgánico de la vianda del mejillón en un tiempo dado (en estos ensayos, 60 días), y C es la materia orgánica de las células algales filtradas por mejillón en el mismo período. Dado que la sedimentación de células sobre los contenedores fue mínima, se asume que toda la biomasa algal suministrada fue filtrada por los mejillones. Esto puede considerarse válido para todas las dietas excepto la dieta monoalgal de *D. tertiolecta*, en la cual la ración suministrada no siempre era consumida antes de la adición de la siguiente dosis, por lo que ésta no se añadía. No obstante, este hecho se tuvo en cuenta para el cálculo de las diferentes tasas restando el número de dosis no suministradas.

Los valores más altos (Tabla XXXII) se observaron en las dietas de crecimiento más rápido, aquellas con *T. suecica* en su formulación: Ts, TsDt y TsPt. K_1 está correlacionada con G_{60} ($r = 0.90$, $P < 0.01$), Gv_{60} ($r = 0.93$, $P < 0.01$), G_{PS} ($r = 0.94$, $P < 0.01$), G_{PO} ($r = 0.91$, $P < 0.01$) e índice de condición ($r = 0.98$, $P < 0.001$) (Tabla XXXIII).

La tasa de mortalidad instantánea (Ricker, 1973) se calculó usando la ecuación:

$$Z = \text{Ln} (N_o - N_t)$$

Tabla XXXIII. Matriz de correlaciones entre los parámetros de crecimiento y bioquímicos calculados para mejillones alimentados con diferentes dietas microalgales

	G ₆₀	Gv ₆₀	G _{PS}	G _{PO}	Z ₆₀	K _i	Ci	D _p	D _c	D _L	carb/pro	lip/pro	lip/carb
G ₆₀	1.00												
Gv ₆₀	.945*	1.00											
G _{PS}	.987**	.930**	1.00										
G _{PO}	.972**	.892**	.992**	1.00									
Z ₆₀	-.340	-.431	-.293	-.178	1.00								
K _i	.899*	.932*	.937*	.910*	-.410	1.00							
Ci	.903*	.893*	.956*	.947*	-.277	.980**	1.00						
D _p	.895*	.935*	.932*	.899*	-.444	.998**	.977**	1.00					
D _c	.643	.744	.698	.711	.126	.747	.786	.745	1.00				
D _L	.946*	.978**	.961*	.940*	-.306	.964**	.959*	.964**	.824	1.00			
carb/pro	-.225	-.197	-.237	-.116	.848	-.345	-.309	-.369	.289	-.151	1.00		
lip/pro	.804	.917*	.815	.782	-.262	.850	-.216	.865	.905*	.932*	.135	1.00	
lip/carb	.350	.299	.375	.303	-.812	.457	-.020	.483	-.154	.279	-.544	.747	1.00
lip (%PS)	.946*	.933*	.976**	.953*	.376	.972**	-.118	.977**	.744	.972**	.046	.990**	.801*
cen (%PS)	-.945*	-.945*	-.982**	-.987**	-.164	-.986*	-.613	.991**	-.789	-.847	-.053	-.575	-.502

Nº mínimo de datos pareados: 6; * P < 0.01, ** P < 0.001

G₆₀, Gv₆₀, G_{PS}, G_{PO}: tasas de crecimiento en longitud, volumen, peso seco de la vianda y peso orgánico, respectivamente

Z₆₀: tasa de mortalidad

K_i: eficiencia bruta de crecimiento

Ci: índice de condición

D_p, D_c, D_L: incrementos en proteínas, carbohidratos y lípidos (mg por mejillón), respectivamente
 pro, carb, lip, cen: proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas, respectivamente

Tabla XXXIV. Composición bioquímica (mg por mejillón) y relaciones entre componentes de mejillones alimentados con diferentes dietas microalgales.

	PS	pro	carb	lip	cenizas	carb/pro	lip/pro	lip/carb
Ts	22.77	14.63	3.24	1.07	3.83	0.22	0.073	0.33
Dt	6.70	3.70	1.22	0.22	1.82	0.35	0.063	0.18
Pt	14.11	8.57	1.28	0.53	3.38	0.14	0.059	0.41
TsDt	24.78	14.53	4.99	1.21	4.06	0.34	0.083	0.24
TsPt	17.90	12.35	2.31	0.89	2.88	0.20	0.075	0.39
DtPt	8.04	4.88	2.02	0.30	1.83	0.41	0.061	0.15
Salvaje	3.50	1.85	0.41	0.29	0.51	0.30	0.154	0.54

PS, peso seco de la vianda; PRO, proteínas; CHO, carbohidratos, y LIP, lípidos.

donde N_t es el número de mejillones vivos a tiempo t , y N_0 el número inicial de mejillones. Los valores Z_{60} ($t = 60$ días) se presentan en la Tabla XXXII. Los mejillones no alimentados mantuvieron una alta supervivencia hasta el día 40. A partir de este momento, el efecto de la inanición resultó en una Z_{60} de 0.43. La tasa de mortalidad no se correlacionó con ningún otro parámetro (Tabla XXXIII); no obstante, las dietas que contenían *D. tertiolecta* presentaron las mayores tasas de mortalidad (Tabla XXXII).

Composición bioquímica y conversión del alimento

La composición bioquímica, como mg por mejillón y proporciones entre componentes, se presenta en la Tabla XXXIV. Los mayores contenidos de todos los componentes se obtuvieron en los mejillones que crecieron más rápido (dietas con *T. suecica*).

Expresando los datos de la Tabla XXXIV como porcentaje del peso seco (% PS), la proteína representa el componente más abundante, entre 54.60 - 69.02% PS. Los carbohidratos constituyen el 9.04 - 25.14% PS; los mejillones alimentados con dietas que incluyen *D. tertiolecta* presentaron los contenidos más elevados (18.05 - 25.14% PS). Los lípidos representan el 3.27 - 4.99% PS para los mejillones cultivados, y 9.02% PS para los mejillones "salvajes".

La relación lípidos:proteínas alcanzó el máximo valor en los mejillones "salvajes" (0.15); los mejillones cultivados mostraron valores entre 0.059 - 0.083, siendo máximos en las dietas que incluyen *T. suecica*. La relación carbohidratos:proteínas fue mínima en la dieta de *Phaeodactylum*, y máxima en los mejillones alimentados con las tres dietas de *D. tertiolecta* y en los mejillones

Tabla XXXV. Eficiencias de conversión de proteínas, carbohidratos y lípidos aportados por las dietas por mejillones alimentados con dietas que incluyen *T. suecica*. Los datos corresponden al período experimental completo (60 días).

Dieta	proteínas			carbohidratos			lípidos		
	aport.	D _p	%	aport.	D _c	%	aport.	D _l	%
Ts	24.9	10.9	43.8	5.5	2.4	44	11.7	0.49	4.2
TsDt	23.1	10.4	44.9	6.4	4.1	61	12.5	0.56	4.5
TsPt	21.3	10.0	46.9	5.5	1.8	33	12.1	0.53	4.4

aport., mg aportados en las dietas; D_p, D_c, D_l, deposiciones de proteína, carbohidratos y lípidos (mg por mejillón), respectivamente.

"salvajes". La relación lípidos:carbohidratos fue mínima en las dietas de *Dunaliella* (0.15 - 0.24), aumentando a valores >0.30 en las restantes dietas y mejillones "salvajes".

En base a la composición bioquímica de las células microalgales, se calcularon las eficiencias de conversión de la proteína, carbohidratos y lípidos de las dietas en proteína, carbohidratos y lípidos depositados como constituyentes corporales por el mejillón. Los componentes depositados como constituyentes corporales se calcularon sustrayendo los contenidos iniciales de los contenidos finales. En las dietas de mayor valor alimenticio (dietas con *T. suecica*) entre el 44 y 47% de la proteína ofrecida en la dieta fue transformada en proteína corporal, en comparación con el 33 - 64% de los carbohidratos y el 4.2 - 4.5% de los lípidos (Tabla XXXV). Esto representa una tasa de deposición media de 0.17 - 0.18 mg d⁻¹ de proteína, 0.03 - 0.07 mg d⁻¹ de carbohidratos y 0.009 mg d⁻¹ de lípidos.

Interrelaciones entre parámetros

Se realizó un análisis de correlación entre los parámetros de crecimiento, fisiológicos y bioquímicos, utilizando la aplicación estadística SPSS/PC+ (v. 4.01). Los parámetros considerados fueron las tasas de crecimiento en longitud (G_{60}), volumen (Gv_{60}), peso seco de la vianda (G_{PS}), y peso seco libre de cenizas o peso orgánico (G_{PO}); eficiencia de crecimiento bruta (K_I), índice de condición (Ci); tasa de mortalidad (Z_{60}); incrementos (deposición) en proteína (D_p), carbohidratos (D_c) y lípidos (D_l) (mg por mejillón); composición bioquímica final (como porcentaje del peso seco), y relaciones entre componentes bioquímicos. La matriz de coeficientes

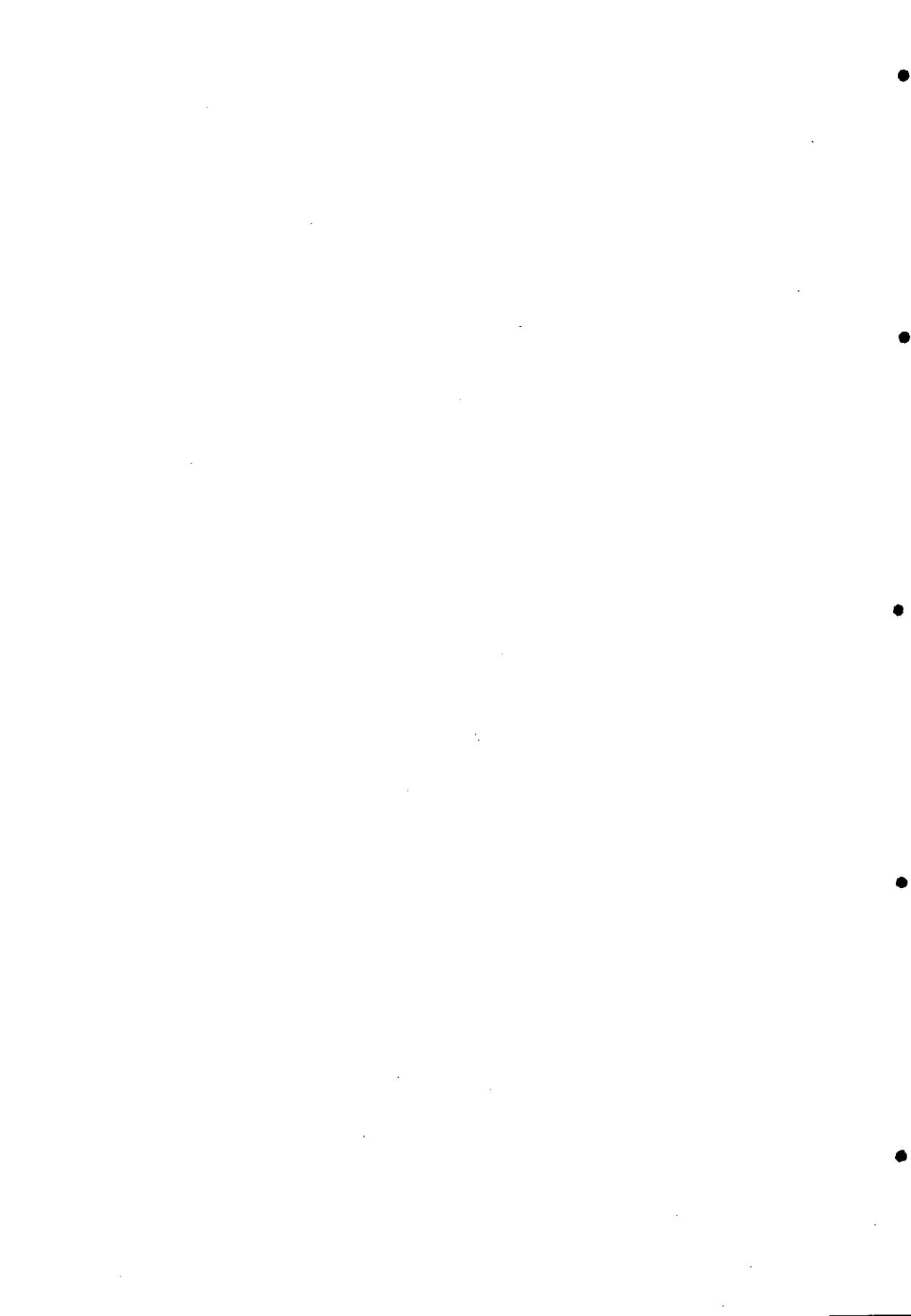
de correlación resultante se presenta en la Tabla XXXIII. El análisis se realizó sin los datos de los mejillones no alimentados.

Las deposiciones de proteína o lípidos mostraron correlaciones positivas y significativas entre ellas y con todas las tasas de crecimiento, eficiencia de crecimiento bruta e índice de condición; la deposición de carbohidratos no mostró correlación con ninguno de estos parámetros.

Se detectaron también interrelaciones positivas y significativas entre los lípidos (% PS) con todas las tasas de crecimiento, K_1 , deposiciones de proteína y lípidos por mejillón, y relación lípidos:proteína. Los contenidos de cenizas (% PS) mostraron una correlación significativa y negativa con las tasas de crecimiento, K_1 y deposiciones de proteína o lípidos. Los contenidos de proteína o carbohidratos (% PS) no mostraron correlación con los demás parámetros.

La proporción lípidos:proteínas está correlacionada con la tasa de crecimiento en volumen (Gv_{60}) y lípidos corporales (%PS).

Discusión



CULTIVO MASIVO DE MICROALGAS MARINAS CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

La utilización de cultivos masivos microalgales para diferentes objetivos ha concentrado el esfuerzo investigador durante las últimas décadas en la importancia de controlar y optimizar la producción y composición bioquímica de las microalgas cultivadas. Como se ha expuesto en la "Introducción", este control puede ser ejercido mediante la manipulación de factores físicos y químicos (luz, temperatura, salinidad, composición del medio de cultivo) que influyen en el metabolismo microalgal.

La modificación del medio de cultivo ha sido un método ampliamente utilizado para incrementar la producción de biomasa o variar su composición. A partir de medios base descritos en la literatura como óptimos para el cultivo de una especie o un grupo de ellas, la mayor parte de los estudios han utilizado la estrategia de la modificación cuantitativa en los nutrientes suministrados. Así, se han obtenido variaciones importantes en la productividad y composición bioquímica bruta (proporción y contenido celular de proteínas, carbohidratos y lípidos) de una manera sencilla modificando la concentración de N, P o la relación entre ellos (p. ej. Myklestad y Haug, 1972; Wikfors *et al.*, 1984; Fábregas *et al.*, 1984, 1985a; Utting, 1985; Wikfors, 1986). El contenido y composición de ácidos grasos (Sriharan *et al.*, 1989; Molina-Grima *et al.*, 1992), vitaminas (Becker, 1986; Abalde, 1986) y aminoácidos libres (Flynn *et al.*, 1992) también varía con las condiciones de nutrientes del medio. En relación con ello, se han utilizado condiciones de deficiencia de nutrientes, normalmente N, P ó Si, para modificar la composición bioquímica celular. La deficiencia en N ó P, necesarios para la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos, conduce a una desviación del C fotosintetizado hacia la biosíntesis de productos de reserva - carbohidratos y/o lípidos - (Myers, 1980). De esta manera la deficiencia, suficiencia o exceso de nutrientes puede ser utilizada como estrategia para modificar el metabolismo microalgal hacia la biosíntesis de un producto de interés: proteína (Venkataraman y Nigan, 1979; Boussiba y Richmond, 1980), polisacáridos (Myklestad, 1988), lípidos y ácidos grasos (Shifrin y Chisholm, 1981; Sriharan *et al.*, 1989; Sukenik y Wahnou, 1991), etc.

Menor atención han recibido las modificaciones cualitativas del medio de cultivo. La utilización de diferentes fuentes de N, en cultivo fotoautotrófico (Fábregas *et al.*, 1989a,b) o mixotrófico (Cid *et al.*, 1992a,b), o fuentes orgánicas de C, en cultivo mixotrófico o heterotrófico (Cid *et al.*, 1992a,b), es determinante

de importantes cambios en el crecimiento y composición bioquímica bruta de una especie microalgal. La utilización de medios de cultivo de diferente formulación da lugar también a sustanciales variaciones en el crecimiento y composición bioquímica microalgal (Herrero *et al.*, 1991). El contenido y composición de ácidos grasos y aminoácidos libres varía también en función de la fuente de N asimilada (Flynn *et al.*, 1992).

Los cultivos microalgales limitados por nutrientes son de gran importancia en estudios fisiológicos y ecológicos, pero desde el punto de vista del cultivo masivo industrial la productividad decrece sustancialmente. No obstante, el cultivo continuo en quimiostato (limitado por nutrientes) es de interés biotecnológico de cara a la producción de productos de interés farmacológico. Alternativas a este modo de producción son cosechar el cultivo microalgal en diferentes fases del ciclo de crecimiento o el cultivo semicontinuo. En el caso de la acuicultura, la estrategia preferida es la obtención de cultivos microalgales densos para la alimentación de invertebrados y la obtención de cosechas máximas en espacios limitados (Ukeles, 1980). Ello conlleva el mantenimiento de cultivos semicontinuos en crecimiento logarítmico o la recolección de cultivos masivos en la fase estacionaria de crecimiento. Esta última estrategia debería ser próxima al cultivo limitado por nutrientes cuando se proporcionan las condiciones físicas adecuadas para que los nutrientes sean la causa última de la detención del crecimiento. Así, las variaciones en la composición bioquímica entre fases de crecimiento exponencial y estacionaria son con frecuencia similares a las que se encuentran entre células sometidas a deficiencia y suficiencia de nutrientes (Myklestad y Haug, 1972; Myklestad, 1974; Utting, 1985)

La capacidad de las células microalgales de utilizar diferentes fuentes de N a bajas o altas concentraciones tiene varios puntos de interés. En el cultivo masivo, la productividad aumenta en correlación con la concentración de N hasta un máximo donde la producción es probablemente limitada por el aporte de luz (Fábregas *et al.*, 1985b). Por otro lado, el cultivo microalgal es utilizado como método de retirada de nutrientes a partir de purines de granjas donde las fuentes nitrogenadas y fosfatos pueden alcanzar altos niveles en derivados amoniacales y fosfatos. El nitrato es la fuente de N normalmente utilizada para la producción de microalgas en empresas de acuicultura, pero cuando el cultivo microalgal se añade a los tanques de cultivo de moluscos o rotíferos, las células estarán expuestas a amonio, liberado como producto de excrección por los animales en cultivo, fuente de N asimilada por las microalgas con preferencia al nitrato (Syrett, 1987). El metabolismo microalgal puede alterarse como resultado de la

exposición a diferentes fuentes de N así como, en función del tiempo de residencia de las células en los tanques de cultivo, como resultado del agotamiento del N (Flynn *et al.*, 1992), particularmente en las "nurseries" modernas y en sistemas de cultivo exterior, donde el alimento es suministrado vía corrientes de agua (Rice y Pechenik, 1992).

Por otra parte, la urea es una fuente de N muy interesante para el cultivo microalgal dado que es más barata que el nitrato y además aporta un mol de C por mol de urea, que es liberado al medio de cultivo como CO₂ (Price y Harrison, 1988), contribuyendo al mantenimiento del pH y a evitar la posible limitación del crecimiento por carbono asimilable.

En este trabajo, para cada especie y fuente de N, se analiza la composición bioquímica en las fases logarítmica y estacionaria del ciclo de crecimiento, lo cual permite elegir el punto de recogida de la biomasa microalgal en función de las necesidades. El valor nutritivo de una especie microalgal puede incrementarse significativamente en función de la composición bioquímica en el momento de ser suministrada a los consumidores (Wikfors *et al.*, 1984; Enright *et al.*, 1986b; Thompson y Harrison, 1992). Esta interrelación entre composición bioquímica microalgal y nutrición de invertebrados herbívoros es uno de los aspectos más prácticos que resultan del estudio del efecto del los nutrientes sobre el crecimiento y bioquímica de las microalgas en cultivo.

Dada la variación de la composición bioquímica a lo largo del ciclo diario (Ganf *et al.*, 1986; Flynn *et al.*, 1992), los cultivos se analizaron siempre a las 3 - 4 h del comienzo de la fase de luz.

Crecimiento de la población

En todas las experiencias, los inóculos se toman de cultivos "stock" creciendo en nitrato, sin someterlos a ningún período de preadaptación. En general, para las fuentes de nitrógeno utilizadas, este período no es necesario para la mayoría de las microalgas marinas, comenzando el crecimiento en la nueva fuente de nitrógeno con períodos de latencia similares a los que presentan en la fuente original, nitrato. No obstante, los cultivos de *C. calcitrans* con fuentes amónicas, así como aquellos de *D. tertiolecta* con amonio o urea, precisaron de fases de adaptación de duración variable: 5 - 15 días para *C. calcitrans* (Fig. 1) y 0 - 7 días para *D. tertiolecta*. No se observan fases de adaptación para *I. galbana*, *P. tricornutum* o *T. suecica* (Figs. 8, 12 y 16). Determinadas microalgas pueden

presentar fases de latencia de hasta 20 días en cultivos con urea (Oliveria y Antia, 1986) o con determinados aminoácidos (Landymore y Antia, 1977).

La intensidad de luz a la cual la tasa de crecimiento es máxima ha sido establecida en $50 - 100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para *C. calcitrans*, *D. tertiolecta*, *I. galbana* y *P. tricornutum* (Thompson *et al.*, 1990), por lo que la intensidad de luz incidente utilizada ($116 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y las concentraciones iniciales de nutrientes son suficientes para estimular tasas de crecimiento máximas de las microalgas estudiadas. La diferencia entre tasas máximas (normalmente observadas durante los días iniciales del cultivo) y medias podría relacionarse con el aumento del pH en los cultivos con nitrato, nitrito o urea. Molina-Grima *et al.* (1992) observaron esta disminución de la tasa de crecimiento de *Isochrysis* con el incremento de la biomasa tras 3 - 4 días de cultivo, para tasas de aireación de 1 V/V/min, relacionándola con una limitación impuesta por la transferencia del CO_2 entre las fases gas y líquido, la que causaría el aumento del pH por desplazamiento del sistema tampón carbonato a $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ disuelto consumido por las células, hasta que se alcance el equilibrio entre la transferencia gas-líquido y el consumo celular. Esta limitación no la observaron a una tasa de flujo de 2.5 V/V/min. La adición de CO_2 a cultivos semicontinuos de *Phaeodactylum* aumentó las tasas de crecimiento y productividades obtenidas (Chrimadha y Borowitzka, 1994). El CO_2 es asimilado por difusión pasiva, mientras la asimilación de bicarbonato requiere transporte activo y ser disociado por la anhidrasa carbónica. Según Levasseur *et al.* (1993), cuando la asimilación de un nutriente requiere etapas enzimáticas, estas etapas deben ser las limitantes de la tasa de crecimiento máxima, más que la concentración del nutriente como postulan los modelos clásicos.

El aumento del pH en los cultivos con nitrato es consecuencia directa del mecanismo asimilatorio, probablemente un cotransporte NO_3^-/H^+ con una estequiometría 1:1-2 (Fuggi *et al.*, 1981; Ullrich, 1987). Por su parte la asimilación de la urea produce 1 mol de CO_2 por mol de urea asimilado, que es liberado, al menos en *Thalassiosira*, al medio de cultivo (Price y Harrison, 1988). En los presentes estudios, el pH en los cultivos con urea tiende a mantenerse en valores inferiores a aquellos de los cultivos con nitrato o nitrito, particularmente en el caso de *T. suecica*. Este menor pH y mayor nivel de C en los cultivos con urea no se correlacionó, sin embargo, con mayores tasas de crecimiento o productividades. Por otra parte, el tamponamiento del medio de nitrato con HEPES mantiene el pH en el rango 7 - 8 para *T. suecica* y *P. tricornutum* (Figs. 20-21); sin embargo, el mantenimiento de valores inferiores de pH no aumenta la tasa de crecimiento o densidad celular con respecto al medio no tamponado, a pesar de que en este

último el valor del pH es mayor a 8 a lo largo del período experimental. Esto último debería reducir el crecimiento y la tasa de división de la mayoría de las microalgas, pero *Phaeodactylum* y algunas otras microalgas pueden tolerar altos niveles de pH (Goldman *et al.*, 1982).

La tasa de crecimiento es afectada además por la disminución constante de la intensidad de luz en el interior del cultivo (autoensombrecimiento) y de la concentración extracelular de nutrientes, inherentes al incremento exponencial de la biomasa (Raven, 1988). Un método sencillo adoptable en el cultivo masivo microalgal para evitar la limitación por autoensombrecimiento y las adaptaciones fisiológicas a este fenómeno sería el control de la intensidad luminosa en el interior del cultivo mediante el aumento gradual de la intensidad de luz incidente.

Las mayores tasas de crecimiento medias (promediadas para toda la fase logarítmica) se observaron en los cultivos con fuentes de N amónicas en el caso de *Chaetoceros* y en los cultivos con nitrato para *Tetraselmis* y *Phaeodactylum*, no existiendo diferencias significativas entre las diferentes fuentes de N para las demás microalgas. Diversos autores han encontrado que microalgas marinas pertenecientes a distintas clases taxonómicas pueden utilizar nitrato, nitrito, amonio o urea como únicas fuentes de nitrógeno y con tasas de crecimiento similares (Antia *et al.*, 1975; Ojeda y Afonso, 1986; Syrett, 1987; Fábregas *et al.*, 1989b). En la naturaleza, las microalgas raramente se encuentran en condiciones de abundancia de N, y así se han adaptado a explotar eficientemente diferentes fuentes de nitrógeno potencialmente disponibles en las aguas naturales sin diferencias apreciables en la tasa de crecimiento (Ginzburg, 1987). No obstante, ésta no parece ser una característica general de las microalgas. Así, Tadros y Johansen (1988) encuentran, en experimentos con 6 diatomeas, que éstas muestran un comportamiento distinto en cuanto a la capacidad de utilizar nitrato, amonio o urea como fuente de nitrógeno, con tan sólo 2 de las 6 especies creciendo bien en urea; asimismo, las concentraciones de nitrógeno que producen tasas de crecimiento máximas también fueron diferentes según la especie. Levasseur *et al.* (1993) también encontraron diferencias interespecíficas en las tasas de crecimiento obtenidas con nitrato, amonio y urea. Así, a intensidades de luz saturantes ($170 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) el nitrato estimuló las mayores tasas de crecimiento en *Chaetoceros gracilis*, mientras no hubo diferencias entre las tres fuentes para *D. tertiolecta*; a intensidades de luz subsaturantes ($8 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) no hubo diferencias entre las tres fuentes para ambas especies.

La incorporación de amonio por las células microalgales es acompañada por la extrusión de hidrogeniones (H^+) al medio en una relación equimolar (Fuggi *et al.*, 1981). En todas las especies el crecimiento en sulfato amónico está asociado con un descenso del pH del medio, y el comienzo de la fase estacionaria coincide normalmente con el descenso del pH por debajo de 7. Esto coincide con densidades de biomasa seca comprendidas entre 0.46 g.l^{-1} (*C. calcitrans*, *D. tertiolecta*) y 0.58 g.l^{-1} (*P. tricornutum*). En los cultivos de *Dunaliella*, *Phaeodactylum* y *Tetraselmis*, las células siguen metabólicamente activas (alta tasa de fotosíntesis, Fig. 24) y el pH del medio alcanza valores extremadamente ácidos (3.2 - 4.4). El comportamiento es diferente para *Chaetoceros* e *Isochrysis*, donde el pH es próximo a la neutralidad (6.6 y 6.0, respectivamente) al final de la fase estacionaria.

Se han descrito varias microalgas sensibles a altas concentraciones de amonio, observándose una inhibición del crecimiento a concentraciones mayores a 1mM de amonio (Kaplan *et al.*, 1986b). La causa de la inhibición del crecimiento por el amonio no se conoce (Kaplan *et al.*, 1986b), habiéndose sugerido que puede estar correlacionada con un aumento del pH intracelular por encima de pH 7 (Bertl *et al.*, 1984), tal vez debido a la penetración de moléculas de hidróxido amónico no disociadas (Morris, 1974).

Cuando *P. tricornutum* y *T. suecica* se cultivaron en amonio 4 mM en presencia y ausencia de HEPES 20 mM, el pH en el medio de amonio tamponado se mantuvo en el rango 7 - 8 (Fig. 20, 21), soportando un crecimiento similar al observado en el medio de nitrato. El amonio no es por tanto tóxico *per se* para estas microalgas marinas. Abalde (1986) no observó diferencias en el crecimiento de *D. tertiolecta* en medios con amonio y nitrato altamente tamponados con Tris-HCl. En nuestras experiencias, cuando se utilizó Tris-HCl 20 mM, tampón normalmente utilizado en el cultivo microalgal, el pH descendió por debajo de 6.5 en 7 días independientemente de la fuente de N asimilada, estimulando además un alto crecimiento bacteriano. La estimulación del crecimiento bacteriano por Tris en cultivos de *P. tricornutum* en presencia de sodio fosfato ha sido claramente demostrada (Fábregas *et al.*, 1993).

La utilización de diferentes fuentes de N afecta a la capacidad de carga de los distintos medios. En todas las especies, las mayores producciones de biomasa se obtuvieron en los cultivos con nitrato, estimada bien como células bien como materia seca por volumen de cultivo. Las productividades en biomasa no mostraron diferencias significativas con el medio de nitrito o urea para *Dunaliella* y *Tetraselmis*, urea para *Isochrysis*, y nitrito para *Chaetoceros*. Los cultivos de esta

última microalga colapsan rápidamente, con una corta fase estacionaria antes de la fase de muerte. La urea es una de las fuentes de nitrógeno más económicas, y, por ello, la capacidad de utilizar urea es una característica deseable para el cultivo masivo de microalgas.

Phaeodactylum y *Platymonas* (= *Tetraselmis*) metabolizan la urea mediante el enzima ureasa (Leftley y Syrett, 1973). Se ha demostrado que la presencia de Ni^{+2} es esencial para el desarrollo de una alta actividad ureasa en *Phaeodactylum* (Rees y Bekkett, 1982; Syrett y Peplinska, 1988). Un requerimiento de níquel puede ser universal para microalgas que producen ureasa (Oliveira y Antia, 1986). La concentración de Ni^{+2} necesaria para un crecimiento óptimo con urea fue 5 - 15 nM para 12 microalgas marinas (Oliveria y Antia, 1986), aunque concentraciones superiores a las cantidades presentes en el agua de mar (3.4 nM) inhibieron el crecimiento de algunas especies como *Chaetoceros gracilis* y *Pavlova lutheri*. En nuestro medio de cultivo, sin níquel como micronutriente, el crecimiento en urea fue similar al obtenido en nitrato, excepto con *C. calcitrans* que no creció en el medio con urea. El requerimiento de níquel para *I. galbana*, *P. tricornutum* y *T. suecica* debe ser satisfecho a partir del níquel presente en el agua de mar natural o como contaminante en las sales utilizadas para preparar el medio. Por otra parte, el Ni puede ser sustituido por el Co (Oliveira y Antia, 1984), el cual sí se ha añadido como micronutriente (0.1 μ M) al medio de cultivo (ver "Materiales y Métodos"). *D. tertiolecta* metaboliza la urea por el enzima urea-amido liasa, y no requiere por tanto la presencia de este metal (Antia *et al.*, 1991).

De acuerdo con el concepto de cuota celular de Droop (1975), en cultivos discontinuos la tasa de crecimiento decrece y la población entra en la fase estacionaria del ciclo de crecimiento cuando se agota el nutriente cuyo aporte es más escaso en relación a las necesidades metabólicas de la población microalgal.

Se puede establecer una relación matemática entre la eficiencia de transformación del N suministrado al medio de cultivo en N orgánico celular y la formulación logística. La formulación logística, limitación = $(C - N) / C = 1 - (N / C)$, donde N es la población y C la capacidad de carga del medio, puede ser transformada en la expresión:

$$\text{Lim (NUTE)} = 1 - ((\text{FITO} \times \text{NUTIR}) / \text{NUTT}) \quad (\text{Morrison } et \text{ al.}, 1987)$$

dónde: Lim (NUTE) = limitación por el nutriente NUT; FITO = biomasa (mg.l^{-1}); NUTIR = concentración interna del nutriente por unidad de biomasa ($\text{mg nutriente.mg biomasa}^{-1}$); NUTE = concentración externa del nutriente (mg.l^{-1});

$NUTI =$ concentración del nutriente en la biomasa ($mg.l^{-1}$) = $FITO \times NUTIR$; y $NUTT =$ concentración total del nutriente = $NUTE + NUTI$.

A partir de la definición de la eficiencia de transformación del N (Fábregas *et al.*, 1984; Wikfors, 1986), ésta se puede formular como sigue:

$$\text{Eficiencia} = (NUTI_f - NUTI_i) / NUTE_i$$

dónde $NUTI_f$ y $NUTI_i$ son las concentraciones de N en la biomasa ($mg.l^{-1}$) en la fase estacionaria y en el momento del inóculo respectivamente, y $NUTE_i$ es la concentración de N aportada al medio de cultivo. Dado que normalmente $NUTI_i \ll NUTI_f$, se puede asumir que $NUTI_i = 0$; por tanto, $NUTI_f - NUTI_i = NUTI_f = NUTI$, y $NUTE_i = NUTT$. De este modo,

$$\text{Eficiencia} = NUTI/NUTT = (FITO \times NUTIR) / NUTT$$

$$\text{Lim (NUTE)} = 1 - ((FITO \times NUTIR) / NUTT) = 1 - \text{Eficiencia}$$

Lim (NUTE) toma valores entre 0 y 1, de modo que vale 0 cuando la biomasa se equipara a la capacidad de carga del medio, indicando la limitación por el nutriente NUT (Morrison *et al.*, 1987). Por tanto, una eficiencia próxima a 1 (es decir, 100%) indica la limitación por el N.

Considerando que $NUTI$ para el N es la concentración de proteína dividida por 5.78 para microalgas marinas (Gnaiger y Bitterlich, 1984), las eficiencias alcanzadas en los presentes experimentos al comienzo de la fase estacionaria varían, en los cultivos con nitrato, nitrito y urea, entre 87 - 121% para *T. suecica* y 88 - 106% para *P. tricornutum* ($\text{Lim (NUTE)} = 0 - 0.13$), por lo que ambas especies han asimilado casi todo el N del medio en proteína al comenzar la fase estacionaria. Los cultivos con amonio de ambas especies (eficiencia = 23 - 34%) entran en la fase estacionaria a concentraciones de N en el medio aún elevadas.

En los cultivos de *C. calcitrans* la eficiencia toma valores tan bajos como 12 - 39% al comienzo de la fase estacionaria, aumentando a 32 - 59 al final del cultivo. En *I. galbana* las eficiencias al comienzo de la fase estacionaria son del orden del 43 - 65%, aumentando al 88 - 106% al final del cultivo. Estas dos últimas especies no entran en la fase estacionaria por el agotamiento del N del medio. La posibilidad de un alto contenido de N no proteico no parece probable, dado que el nivel máximo del N celular presente en aminoácidos libres en *Isochrysis* es del 5% (Flynn *et al.*, 1992). La limitación por el CO_2 disuelto en fase acuosa, y/o por la

disminución en la intensidad de luz debida al efecto de autoensombrecimiento a altas concentraciones de biomasa, son las causas más probables de la disminución de la tasa de crecimiento y comienzo de la fase estacionaria observada en *Chaetoceros* e *Isochrysis*. Intensidades de luz incidentes de $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se han encontrado como limitantes de la productividad en cultivos de la diatomea *Chaetoceros* sp. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1994); las células cultivadas a esta intensidad poseen elevados contenidos de clorofila *a* en comparación a las cultivadas a $565 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La limitación por fósforo tiene lugar cuando la relación N:P (20:1 átomo/átomo) es superior a la óptima para una especie particular. Las relaciones N/P determinadas experimentalmente son específicas para cada especie (Ryther y Dunstan, 1971; Rhee, 1978; Wynne y Rhee, 1986; Molina *et al.*, 1991) y varían entre 5 y 50, rango por encima del cual las tasas de crecimiento están limitadas por el P, y por debajo del cual el factor limitante es el N. La relación óptima para una especie varía además con la luz (Wynne y Rhee, 1986) y temperatura (Molina *et al.*, 1991). La relación N/P óptima (no limitante de la productividad) para *Tetraselmis* sp. a 15 - 20°C y $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ es 20 (Molina *et al.*, 1991). Por otra parte, Wynne y Rhee (1986) encuentran que la relación óptima para *P. tricornutum*, calculada a partir de las cuotas celulares de N y P, cambia de 37 a 30 entre 116 y $24 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mientras para *D. tertiolecta* aumenta de 12 a 17. No es probable por lo tanto, al menos para estas tres microalgas, la limitación por P en nuestras experiencias.

Por otra parte, Wikfors (1986) no encuentra ningún efecto de la relación N/P sobre la producción final de biomasa en un rango amplio de relaciones N/P, siendo esta producción final dependiente de las concentraciones iniciales de N ó P empleadas, más que de la relación N/P en sí misma.

La asimilación de N no denota necesariamente una necesidad metabólica. Bajo condiciones de abundancia de nitrógeno, en algunas microalgas se ha observado su consumo en exceso ("luxury consumption") y almacenamiento subsecuente en proteína (Werner, 1970; Sakshaug *et al.*, 1983; Abalde, 1986; Wikfors, 1986). Tal consumo probablemente explica las altas conversiones N-proteína alcanzadas en los cultivos de *T. suecica*, *P. tricornutum* e *I. galbana*, esta última al final del cultivo. Eficiencias muy inferiores al 100% indican un exceso de N en el medio respecto a las necesidades de la especie en cultivo (Herrero, 1985). Esto es importante a la hora de realizar cultivos masivos para la obtención de biomasa, pues debe evitarse que los nutrientes se hagan limitantes para el

crecimiento, pero, por otra parte, un exceso de nutrientes sin utilizar encarece el producto.

pH intracelular y fotosíntesis nitrato vs. amonio

El control del pH intracelular (pHi) es fundamental para cierto número de procesos fisiológicos como la síntesis de proteína, ADN, ARN y control del ciclo celular. El pHi modifica las propiedades de los canales iónicos (Köhler *et al.*, 1986) e interviene en la transducción de señales desde los fotosistemas en los cloroplastos a los canales de K^+ en la membrana citoplasmática (Kurkdjian y Guern, 1989). En condiciones normales, la célula mantiene el pH citoplasmático próximo a la neutralidad principalmente a través de la ATPasa y la bomba H^+/K^+ de la membrana, y la síntesis/degradación de malato.

Como respuesta al descenso del pH del medio, en los cultivos con amonio sin tamponar se produce una inhibición de la división celular. Los resultados obtenidos muestran un aumento en el pH intracelular (pHi), tanto en las células de *T. suecica* como en las de *P. tricornutum* cultivadas en el medio con sulfato amónico no tamponado (Fig. 22). Por el contrario, ni el crecimiento de la población ni el pHi muestran variaciones en los cultivos con amonio tamponados con HEPES y aquellos con nitrato (tamponados o no) en ambas especies.

En los sistemas animales el progreso del ciclo celular está asociado con un aumento del pHi y los estados de latencia presentan un pHi ácido (Busa y Nuccitelli, 1984). En vegetales la información es aún escasa, pero los trabajos realizados en plantas superiores indican que el pHi en los estados latentes o de crecimiento lento es más elevado que en las fases en crecimiento activo (revisado por Kurkdjian y Guern, 1989).

Independientemente del pH extracelular, la tasa de fijación de C es inicialmente más alta cuando las células asimilan amonio como fuente de N (Fig. 24), aunque tiende a igualarse a lo largo del período de luz. La incorporación de nitrato y amonio son dependientes de la disponibilidad de CO_2 , pero sólo la tasa de asimilación de nitrato muestra una fuerte dependencia de la tasa de fijación de C (Lara *et al.*, 1987). La luz induce la síntesis y activación de la nitrato reductasa, aumentando la actividad NR durante las primeras horas del ciclo de luz (Huppe y Turpin, 1994).

El amonio estimula la fijación de C, mientras la asimilación de nitrato produce una disminución en la fijación de CO₂ (Romero y Lara, 1987), por la competición por el poder reductor generado fotosintéticamente (Lara, 1992). El amonio es además un desacoplante de la fotofosforilación y debe ser asimilado rápidamente. La disminución del nivel de glutámico como consecuencia de la asimilación del amonio mediante el sistema enzimático GS/GOGAT provoca la activación de la piruvato quinasa (PK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa) y fosfofructoquinasa (PFK), efectos que también se producen cuando la fuente de N es nitrato pero a velocidades mucho más lentas (Huppe y Turpin, 1994).

La tasa de fotosíntesis es afectada también por el pH del medio. Cuando el pH es ácido (cultivos con amonio), la mayoría del carbono presente en el medio está en forma de CO₂, mientras que con el aumento de la alcalinidad aumenta la proporción relativa de C en forma de bicarbonato, cuya asimilación depende de transporte activo y su conversión en CO₂ por la enzima anhidrasa carbónica (Kaplan *et al.*, 1986b), localizada probablemente en el cloroplasto en *P. tricornutum* (Dixon y Merret, 1988).

La síntesis y degradación de malato se ha descrito como un proceso clave en el control del pH_i en células vegetales (Kurkdjian y Guern, 1989). Bajo tratamientos que inducen la alcalinización del citoplasma, se activa la incorporación de H⁺ y la extrusión de K⁺, así como la síntesis de malato (Tromballa, 1987), cuya acumulación en vacuolas conlleva en algunas plantas superiores un aumento del pH vacuolar. La síntesis de malato es también estimulada por la asimilación de amonio (Huppe y Turpin, 1994). La PEPCasa y la PFK son enzimas extremadamente sensibles al pH, y la actividad *in vitro* de la PEPCasa aumenta fuertemente con el aumento del pH entre 7 y 8 (Kurkdjian y Guern, 1989). En las microalgas, la PEPCasa se localiza en el citosol y la PFK en el cloroplasto (Huppe y Turpin, 1994). De esta manera, el aumento del pH_i conllevaría un marcado incremento en la fijación de C, principalmente de la fijación oscura o "anaplerótica". En los presentes ensayos, en los cultivos con amonio no tamponado de ambas especies, el 18% de la radioactividad inicial añadida se incorporó en la fracción celular durante los 30 minutos iniciales de incubación en fase de oscuridad, frente a menos del 2.5% en los cultivos con amonio tamponado y nitrato. Esta fijación oscura de C es dependiente de la actividad de la PEPCasa.

En situaciones de estrés prolongado, se rompe la capacidad homeostática de las células (Davies y Sigee, 1984; Gahan, 1984) y se ven afectados los sistemas de automantenimiento celular: se producen lesiones, se inhibe su reparación y,

posiblemente, el coste energético de dicha reparación aumenta (Penning de Vries, 1975). Después de tres días sometidas a estrés ácido, las células de *P. tricornutum* perdieron la capacidad fotosintética y mostraron síntomas de desorganización celular en el análisis de autofluorescencia y pH_i por citometría de flujo. La composición bioquímica también sufrió fuertes alteraciones, con un gran aumento del contenido lipídico (Tablas XIX y XX). En *T. suecica*, las células perdieron la movilidad celular y sedimentaron.

Composición bioquímica

La composición bioquímica celular refleja la historia fisiológica de la célula, a diferencia de las medidas fisiológicas de actividad celular que deben ser interpretadas con respecto al ambiente celular inmediato (Madariaga y Joint, 1992). Las microalgas muestran procesos de adaptación a la disminución de la intensidad luminosa y a la deficiencia en nutrientes, tal y como se ha expuesto en la "Introducción", por lo que las variaciones observadas en la composición celular de poblaciones en crecimiento logarítmico y estacionario serán el resultado de ambos factores.

El peso seco celular varía tanto en función de la fuente de N como de la fase de crecimiento, aunque no se pueden establecer patrones comunes para las diferentes especies. En el caso de *C. calcitrans*, *Dunaliella* y *Phaeodactylum*, las células cultivadas con amonio presentan pesos secos más altos que el de aquellas cultivadas con otras fuentes durante el crecimiento logarítmico. Las diferentes fuentes de N no provocan variaciones significativas durante esta fase en el caso de *Tetraselmis*, mientras los pesos de las células de *Isochrysis* cultivadas con fuentes oxidadas son más altos. Para la mayoría de las especies el peso celular aumenta con el tiempo de cultivo, con indiferencia de la fuente de N, principalmente a lo largo de la fase estacionaria. Excepciones son los cultivos de *C. calcitrans* con fuentes amónicas y de *P. tricornutum* con nitrato, nitrito y urea, en los cuales el peso celular es menor en la fase estacionaria que durante la logarítmica.

Utting (1985) no encontró variaciones del peso seco, peso seco libre de cenizas (PSLC) o volumen celular de *T. suecica* e *I. galbana* cuando fueron cultivadas en condiciones deficientes de nutrientes, mientras la diatomea *Chaetoceros* sp. mostró un incremento en el PSLC. Sin embargo, Wikfors *et al.* (1984) y Uriarte *et al.* (1993) observan aumentos significativos del peso seco de *D.*

tertiolecta y *T. maculata*, y *D. primolecta*, respectivamente, con la reducción de nutrientes aportados al medio de cultivo. El peso seco de *Isochrysis* sp. (clon T-ISO) es más alto durante la fase estacionaria (Brown *et al.*, 1993b), mientras el de *Pavlova lutheri* o *Nannochloropsis oculata* es significativamente mayor durante el crecimiento logarítmico. Sin embargo, en *Isochrysis* sp. (clon T-ISO) la adaptación a bajas intensidades de luz conlleva una disminución significativa en el peso seco celular (Brown *et al.*, 1993a). Sin embargo, la disminución de la intensidad de luz entre 225 y 5 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provocó la disminución del volumen celular con la intensidad de luz en 9 especies de microalgas, entre ellas *C. calcitrans*, *P. tricorutum*, *D. tertiolecta* e *I. galbana* (T-ISO) (Thompson *et al.*, 1991).

Al menos cuatro factores son importantes en acuicultura en cuanto a la nutrición de animales alimentados con dietas a base de microalgas vivas (Brown *et al.*, 1989; Flynn *et al.*, 1992): el número de células algales necesario, la biomasa total suministrada, su composición bioquímica (bruta y contenido en ácidos grasos esenciales), y el contenido y composición en aminoácidos libres, aspecto éste de importancia máxima en los estados juveniles caracterizados por un pobre desarrollo de los procesos digestivos. El número o densidad de células suministrado está relacionado con la estimulación de una actividad filtradora óptima (Riisgard, 1991). Sin embargo, y dadas las variaciones en peso seco según el momento de recogida de la biomasa microalgal, dietas basadas únicamente en el número de células por ml darán lugar a niveles dietarios muy diferentes en cuanto a biomasa suministrada, principalmente en términos de porcentaje del peso del animal cultivado.

Dada la diferente evolución del peso celular observada con la edad del cultivo y con la fuente de N según la especie, la normalización de la composición bioquímica microalgal al PSLC (% PSLC) es más indicativo de los cambios fisiológicos que el contenido celular, y permite establecer comparaciones entre diferentes especies y condiciones de cultivo. El trabajo de Brown *et al.* (1993a) demuestra claramente este efecto.

La evolución a lo largo del cultivo del contenido celular de pigmentos ($\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ ó %PSLC) sigue tendencias diferentes no sólo en función de la especie, sino además de la fuente de N del medio. Así, en *Dunaliella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis* y *Phaeodactylum*, cuando se cultivan con nitrato, nitrito o urea, el porcentaje de clorofila *a* y carotenos respecto a la materia orgánica total es inferior al inicio de la fase estacionaria que durante el crecimiento logarítmico. Para *Isochrysis* y *Tetraselmis*, aumenta además a lo largo de la fase estacionaria. En *Chaetoceros*, sin

embargo, sólo se observan variaciones a lo largo de la fase estacionaria, con una disminución de su porcentaje respecto al PSLC. En los cultivos con sulfato amónico de estas microalgas, las variaciones son más bajas entre las 2 ó 3 fases analizadas, excepto en *Phaodactylum* donde también decrecen como %PSLC.

Mientras la limitación por N en cultivos continuos provoca la disminución en el contenido celular de clorofilas (Roy, 1988; Sukenik y Wahnnon, 1991), en cultivos "batch" y masivos los contenidos de clorofila *a* en la fase estacionaria son muchas veces iguales o incluso superiores a los de la fase logarítmica, incluso a eficiencias de transformación del N próximas al 100% (Fábregas *et al.*, 1985, 1986a,b; Wilhelm y Manns, 1991; Nelson *et al.*, 1992), con un decrecimiento ulterior en cultivos muy envejecidos (Wilhelm y Manns, 1991).

En microalgas, el enzima ribulosa-1,5-bifostato carboxilasa / oxigenasa (RuBisCO) y los complejos antena ("light-harvesting chlorophyll-protein complexes"), ambos componentes del aparato fotosintético, se han propuesto como reservas celulares de nitrógeno (Prezelin, 1982; Falkowski *et al.*, 1989). Según Falkowski *et al.* (1989), la RuBisCO es la principal reserva de N en *Isochrysis*, mientras el complejo clorofila *a* / *c* / fucoxantina no representa una reserva importante; el porcentaje del N celular presente en la RuBisCO disminuye del 34 al 12% bajo limitación de N.

El análisis espectrofotométrico de las relaciones entre pigmentos se ha propuesto como un método rápido para determinar el estatus nutritivo microalgal (Flynn *et al.*, 1992). Roy (1988) encontró un aumento de la relación clorofilas *a/c* con la disminución de la tasa de crecimiento de *P. tricornutum* en cultivos continuos limitados por el aporte de N. Sin embargo, el comportamiento parece ser diferente para cada especie. Así, a partir de Sukenik y Wahnnon (1991) y Flynn *et al.* (1992), en *I. galbana* la relación clorofilas *a/c* no debería variar fuertemente con la limitación de N, mientras la relación clorofila *a*/carotenos decrecería. Por otra parte, aunque Dubinsky *et al.* (1986) encontraron la relación clorofilas *a/c* independiente de la intensidad de luz, Sukenik y Wahnnon (1991) observaron una disminución constante de la relación clorofilas *a/c* y un aumento de la relación clorofila *a*/carotenos con la disminución de la intensidad luminosa para *I. galbana*. La adaptación de *D. tertiolecta* a bajas intensidades bajo condiciones de saturación de nutrientes (Sukenik *et al.*, 1988) conlleva una disminución de la relación clorofilas *a/b*, mientras aumentan la relación clorofila *a*/luteína y el contenido celular de los tres pigmentos. Por lo tanto, como han propuesto Flynn *et al.* (1992), sólo la relación clorofila *a*/carotenos parece idónea para caracterizar el estatus

nutritivo microalgal. Su evolución en función de la intensidad de luz y nutrientes es diferente, y los resultados entre diferentes trabajos y especies son más consistentes.

En los presentes ensayos, la relación clorofila *a*/carotenos decrece, para cualquier fuente de N, con la edad del cultivo para *Dunaliella*, *Tetraselmis* e *Isochrysis*, mientras en *Chaetoceros* sólo decrece una vez iniciada la fase estacionaria. Ello indicaría una deficiencia en nutrientes progresiva, al menos a lo largo de la fase estacionaria. La disminución de las relaciones clorofilas *a/b* y *a/c* para estas microalgas entre la fase logarítmica y comienzo de la fase estacionaria es, por el contrario, más consistente con el autoensombrecimiento como factor principal que modula las proporciones relativas de ambas clorofilas a lo largo del crecimiento exponencial. Las relaciones clorofilas *a/b* o *a/c* aumentan a lo largo de la fase estacionaria en las tres microalgas analizadas en la fase estacionaria avanzada (*Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Chaetoceros*), así como para *P. tricornutum* al comienzo de la fase estacionaria, similar al resultado encontrado por Roy (1988) en cultivos sometidos a deficiencia de N en esta diatomea.

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la influencia de la composición bioquímica de las microalgas que componen la dieta en el crecimiento y supervivencia obtenidos en el cultivo de larvas, semilla y juveniles de moluscos, rotíferos, y larvas de crustáceos o peces (revisado por Brown *et al.*, 1989). Los requerimientos nutricionales son además diferentes en función del estadio de desarrollo y especie. Así, por ejemplo, el trabajo de Utting (1986) con la ostra plana *O. edulis* sugiere la necesidad de suministrar dietas ricas en proteína los días previos a la metamorfosis y fijación de la larva, pero la semilla crece mejor con dietas de bajo nivel proteico y alto de carbohidratos. Dietas con bajo nivel de proteína y/o alto de carbohidratos también incrementaron las tasas de crecimiento de larvas de ostra japonesa, *Crassostrea gigas* (Thompson y Harrison, 1992), así como de semilla de ostra americana, *C. virginica* (Flaak y Epifanio, 1978; Wikfors *et al.*, 1984). Sin embargo, el aumento de la tasa de crecimiento de semilla de *O. edulis* con el aumento de carbohidratos en la dieta sólo se produce cuando el aporte de proteína es óptimo (Enright *et al.*, 1986b). Por su parte, el crecimiento de la semilla de la almeja *Mercenaria mercenaria* sólo se correlacionó con los niveles de proteína y lípidos de la dieta (Wikfors *et al.*, 1992).

En todos estos estudios citados, las variaciones en el crecimiento de los animales en cultivo se observaron para la misma dieta monoalgal manipulando su composición bioquímica. Entre otros factores, el descenso de proteína en la dieta

puede conseguirse en función de la fuente de nitrógeno utilizada (Levasseur *et al.*, 1993) o del momento del ciclo de crecimiento en que se recoja la biomasa microalgal (Myklestad y Haug, 1972; Flaak y Epifanio, 1978; Utting, 1985).

Para las cinco especies microalgales presentadas en esta memoria, la composición bioquímica varía en función de la fuente de nitrógeno suministrada al medio de cultivo, así como, y más significativamente, de la fase de crecimiento en que se recoge la biomasa. En determinados casos también se observa un efecto interactivo entre ambos factores, principalmente en el contenido en pigmentos. Una importante variación de la composición bioquímica en función de la fuente de nitrógeno se ha observado también en cultivos estáticos de las microalgas marinas *T. suecica* (Liaño *et al.*, 1987), *D. tertiolecta* (Fábregas *et al.*, 1989b; Levasseur *et al.*, 1993), *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira pseudoenana* (Levasseur *et al.*, 1993), así como en cultivos masivos de *Chlorella*, *Isochrysis* y *Tetraselmis* (Ojeda y Afonso, 1986). Madariaga y Joint (1992) observaron, con *Pavlova lutheri* cultivada en quimiostato, que la repartición del C fijado entre las fracciones proteica, glucídica y lipídica, difiere en función de la fuente de N asimilada (nitrato, amonio o glicina) y las condiciones de cultivo (tasa de dilución). Levasseur *et al.* (1993) observaron variaciones en las cuotas celulares de C, N y clorofila *a* de *T. pseudoenana*, *C. gracilis* y *D. tertiolecta* en función de la fuente de N asimilada e intensidad de luz.

La fuente de N ejerce poco efecto sobre el contenido de proteína expresada como % del PSLC. Para *C. calcitrans*, las únicas variaciones se observan en un mayor contenido al final del cultivo cuando se cultiva con sulfato amónico (24% frente a 14 - 17% PSLC en los restantes medios), y para *I. galbana* en un mayor contenido de proteína durante el crecimiento exponencial cuando la fuente de N es urea o amonio (25% frente a 19 - 20% PSLC). En el caso de *T. suecica*, las células cultivadas con urea presentan los mayores contenidos de proteína a lo largo de todo el ciclo de cultivo (23 - 34% frente a 14 - 25% PSLC en los restantes medios) considerando todas las fases en conjunto. Las células cultivadas con urea de *Isochrysis*, *Phaeodactylum* y *Tetraselmis*, y con amonio carbonato de *C. calcitrans*, presentan contenidos proteicos ligeramente más altos que aquellas cultivadas con otras fuentes de N durante el crecimiento exponencial.

El contenido celular de proteína ($\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$) aumenta con el tiempo del cultivo para *C. calcitrans*, *I. galbana*, y *T. suecica*, alcanzando los valores máximos al final de la fase estacionaria, mientras decrece en *P. tricornutum*. Sin embargo, expre-

sada como % PSLC, la proteína decrece con el envejecimiento del cultivo en *I. galbana* (18 - 25% PSLC a 11 - 14%) y *P. tricornutum* (29 - 32% PSLC a 17 - 21%).

En *T. suecica* (y *C. calcitrans*, como se discutirá más adelante) el contenido proteico alcanza valores máximos al comienzo de la fase estacionaria (18 - 34% PSLC), decreciendo posteriormente al 14 - 26%, correspondiendo los valores máximos en ambas fases a los cultivos con urea. El alto contenido de proteína registrado al comienzo de la fase estacionaria de *T. suecica*, igual o superior al observado durante el crecimiento logarítmico (17 - 22%), es un efecto observado repetidamente en microalgas verdes cuando son cultivadas en altas concentraciones de N, y reflejan su consumo en exceso y almacenamiento en proteína (Wikfors, 1986). Tal efecto se ha observado para *Dunaliella bardawil* (Ben-Amotz, 1987), *D. tertiolecta* (Fábregas *et al.*, 1986a; Herrero *et al.*, 1994), *Tetraselmis maculata* (Wikfors, 1986), *T. suecica* (Fábregas *et al.*, 1985b; Utting, 1985) y *Tetraselmis* sp. (Molina *et al.*, 1991), a veces con un decrecimiento ulterior con la edad del cultivo (Utting, 1985).

En las diatomeas también se han descrito elevados contenidos celulares de N o proteína en condiciones de crecimiento no limitado por N (Sakshaug *et al.*, 1989), en altas concentraciones de N (Myklestad y Haug, 1972; Utting, 1985) y durante el crecimiento logarítmico (Myklestad y Haug, 1972). Tal es el caso de *Phaeodactylum*, donde la proteína representa el 29 - 32% PSLC durante el crecimiento logarítmico por el 17 - 21% en la fase estacionaria. Sin embargo, en los cultivos de *Chaetoceros* con nitrato, nitrito y amonio carbonato la proteína alcanzó los valores más altos al comienzo de la fase estacionaria (19 - 21% PSLC), decreciendo al 14 - 17% al final del cultivo; en aquellos con sulfato amónico aumentó continuamente con valores máximos al final del cultivo (24% PSLC). Las bajas eficiencias de transformación del N obtenidas para *C. calcitrans* (32 - 59% al final del cultivo), ponen de manifiesto que no se produce limitación por N en ningún momento del cultivo. Las condiciones utilizadas en el presente trabajo para el cultivo de *Chaetoceros* no son idóneas para obtener una elevada transformación de los nutrientes minerales en biomasa. Sin embargo, estas condiciones de cultivo permitirían obtener simultáneamente, al inicio de la fase estacionaria, altas densidades celulares y células con elevada proteína y una relación carbohidratos/proteína similar a la fase logarítmica, particularmente con fuentes de N oxidado.

En general, los contenidos en proteína celular obtenidos no son elevados en comparación otros publicados en la literatura. La comparación de los valores

obtenidos por diferentes investigadores es difícil dado que la proteína es determinada por métodos muy diferentes: Kjeldahl, análisis elemental, suma de residuos aminoácidos ó métodos espectrofotométricos (Bradford, Lowry o Smith). Berges *et al.* (1993) han encontrado que la proteína determinada por el método Bradford (utilizado para el análisis de proteína en la presente memoria) sólo representa el 47% del N celular de *Thalassiosira*. Los ensayos Lowry o Smith dan valores de proteína un 50 - 60% superiores al Bradford. Según la revisión realizada por estos investigadores, el N proteico representa entre el 33 y 75% del N celular para diferentes diatomeas y fases de crecimiento, y el análisis de aminoácidos de un hidrolizado microalgal explica el 75 - 85% del N celular. Aún cuando estos investigadores recomiendan el método Bradford con seroalbúmina bovina como patrón como análisis estándar de proteína, parece claro que el contenido de proteína celular es probablemente infraestimado por este método.

Las microalgas cultivadas en condiciones de suficiencia de nutrientes normalmente asimilan el C fijado fotosintéticamente en proteína para soportar el crecimiento y división celular (Myers, 1980). Sin embargo, cuando una población microalgal es privada de N, la tasa de división celular decrece y el C fijado fotosintéticamente es desviado hacia la síntesis de productos de reserva a expensas de la síntesis proteica, la cual decrece debido a la baja disponibilidad de N (Myklestad, 1988; Madariaga y Joint, 1992).

La transferencia a medio libre de N provoca la reducción del nivel de proteína (% PSLC) de *I. galbana* (T-ISO), *C. calcitrans* y *T. pseudoenana* (Harrison *et al.*, 1990). Brown *et al.* (1993b) obtuvieron contenidos proteicos (% PSLC) más altos durante la fase logarítmica para *I. galbana* (T-ISO) y *Nannochloropsis oculata*, mientras en *P. lutheri* la proteína se mantuvo constante entre ambas fases.

La disminución en el porcentaje de proteína, aún produciéndose a diferentes tiempos de cultivo según las especies, se correlacionó generalmente en nuestros estudios con un aumento relativo de los productos de reserva, como se observa por la evolución de las proporciones carb/prot para *C. calcitrans* (Fig. 4), y carb/prot y lip/prot para *I. galbana* (Fig. 11) y *P. tricornutum* (Fig. 15). Sin embargo, en el caso de *T. suecica* (Fig. 19) no existen variaciones en el valor de estas proporciones con la edad del cultivo.

Para todas las especies el contenido celular de carbohidratos (como $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ó % PSLC) aumenta con el envejecimiento del cultivo. El contenido, como % PSLC,

entre la fase logarítmica y final de cultivo aumentó (valores medios) del 16% al 29% para *Chaetoceros*, 9% al 12.5% para *Isochrysis*, y del 10.5% al 40% para *Phaeodactylum*. En *T. suecica*, aunque los carbohidratos aumentan continuamente de 11.05 a 17.61 pg.cel^{-1} (valores medios) entre las fases logarítmica y estacionaria avanzada, se mantienen en el 6 - 10% de la materia orgánica, con los mayores valores al comienzo (cultivos con nitrato, nitrito, amonio) o a los 10 días en fase estacionaria (cultivos con urea).

El aumento del contenido celular de carbohidratos (y/o lípidos) es una tendencia observada generalmente en las microalgas cuando disminuye la tasa de crecimiento, tanto cuando son sometidas a concentraciones limitantes de nutrientes (particularmente N) como cuando el cultivo entra en la fase estacionaria (Kaplan *et al.*, 1986b; Myklestad, 1988). No obstante no pueden establecerse generalizaciones dado que la respuesta es dependiente de la especie y condiciones de cultivo (Moal *et al.*, 1977; Brown *et al.*, 1989).

La baja acumulación de carbohidratos observada en los cultivos de *T. suecica* parece estar relacionada con las condiciones ambientales utilizadas, dado que Fábregas *et al.* (1985b) tampoco encontraron variaciones importantes en el contenido celular de carbohidratos de *T. suecica* entre las fases logarítmica y estacionaria avanzada bajo condiciones de cultivo similares y nitrato como fuente de N.

El efecto de la fuente de N sobre el contenido celular de carbohidratos es dependiente de la especie. En general, el contenido (pg.cel^{-1}) es más alto en las fuentes de N oxidadas al inicio de la fase estacionaria (*C. calcitrans*, *P. tricornutum*, *T. suecica*), igualándose al final del cultivo en el caso de *T. suecica*. Este mismo resultado se obtuvo anteriormente para *D. tertiolecta* (Abalde, 1986) a 4 mM de N. En *I. galbana* no se observan variaciones en función de la fuente de N asimilada.

Las variaciones en función del % PSLC son aún menores. En *C. calcitrans* las células cultivadas con N oxidado presentan altos porcentajes de carbohidratos durante todo el ciclo de crecimiento (21 - 27% PSLC). Las células de *Chaetoceros*, y en menor grado, *T. suecica* cultivadas con fuentes de N reducido presentan menores niveles de carbohidratos durante el crecimiento exponencial y comienzo de la fase estacionaria (Tablas IV y XXIV).

En los cultivos de *Chaetoceros* y *Tetraselmis* con fuentes que aportan C además de N (amonio carbonato para *C. calcitrans* y urea para *T. suecica*) los carbohidratos aumentan a lo largo de la fase estacionaria, presentando al final del cultivo porcentajes de carbohidratos ligeramente superiores con respecto a las demás fuentes: 32% frente a 27% (*Chaetoceros*), y 8.2 frente a 6.4% (*Tetraselmis*). Este efecto no se observa ni en *I. galbana* ni en *P. tricornutum*. En relación con esto, mayores contenidos celulares de carbohidratos en cultivos semicontinuos de *T. maculata* que en cultivos discontinuos en fase estacionaria parecen estar relacionados con el aporte de CO₂ (Wikfors *et al.*, 1984; Wikfors, 1986). En *P. tricornutum* el suministro de CO₂ a cultivos semicontinuos incrementa fuertemente el contenido celular de carbohidratos (Chrismadha y Borowitzka, 1994).

El contenido celular de lípidos sigue tendencias diferentes en función de la especie y fuente de N. En las diatomeas *C. calcitrans* y *P. tricornutum* los lípidos se mantienen constantes como % del PSLC a lo largo del ciclo de crecimiento en los cultivos con N oxidado, urea o amonio carbonato (9 - 16% PSLC para *C. calcitrans* y 23 - 26% PSLC para *P. tricornutum*). Sin embargo, cuando se cultiva cualquiera de estas diatomeas con sulfato amónico, se observa una acumulación de lípidos del 12 al 22% PSLC en *C. calcitrans* y del 21 al 32% PSLC para *P. tricornutum*. *I. galbana* responde acumulando lípidos como reserva energética desde el inicio de la fase estacionaria de crecimiento, representando entre el 31 - 42% de la materia orgánica en cultivos en fase estacionaria avanzada. Sin embargo, en el caso de *T. suecica*, aún cuando los lípidos son sintetizados activamente durante la fase estacionaria, como se observa a partir del incremento en el contenido celular (pg.cel⁻¹), su abundancia relativa se mantiene constante durante esta fase (19 - 27% PSLC), y es inferior a la observada durante el crecimiento logarítmico (29 - 40%). Las células cultivadas con amonio o urea tienden a presentar los mayores contenidos celulares de lípidos.

El cultivo a bajas concentraciones o deficiencia de N produce, frente a aquel a elevadas concentraciones de N, un aumento en el nivel de carbohidratos, pero no de lípidos (como % PS ó % PSLC) en *Dunaliella primolecta* (Uriarte *et al.*, 1993), *D. bardawil* (Ben-Amotz, 1987), *Chaetoceros affinis* (Myklestad y Haug, 1972), *C. calcitrans* (Utting, 1985; Harrison *et al.*, 1990), *C. gracilis* (Enright *et al.*, 1986b), *T. suecica* (Utting, 1985) y *Tetraselmis maculata* (Wikfors, 1986). Se ha observado acumulación tanto de carbohidratos como de lípidos para *D. tertiolecta* (Wikfors, 1986). La deficiencia en P ó S provoca en *D. bardawil* el aumento de carbohidratos y descenso de lípidos a intensidades de luz bajas, mientras el nivel de lípidos no es afectado a intensidades altas (Ben-Amotz, 1987).

Los resultados para las diferentes cepas de *Isochrysis* - *I. galbana* (ISO), *I. galbana* clon T-ISO (= *Isochrysis* sp. T-ISO ó *Isochrysis* aff. *galbana* T-ISO) e *I. galbana* (C-ISO) - son confusos. Utting (1985) observó acumulación de lípidos y carbohidratos para *I. galbana* (ISO). Kaplan *et al.* (1986a) observaron la acumulación constante de lípidos por *I. galbana* durante los 10 días siguientes al agotamiento del N del medio, mientras la proteína decreció durante los primeros 4 días manteniéndose luego constante. Sukenik y Wahnnon (1991) observan acumulación tanto de carbohidratos como lípidos (pg.cel⁻¹) para *I. galbana* (T-ISO) Sin embargo, Nelson *et al.* (1992) y Brown *et al.* (1993b) sólo observaron acumulación de carbohidratos (% PS) para *Isochrysis* sp. (T-ISO) en fase estacionaria, mientras *Pavlova lutheri* (también primnesiofícea) mostró acumulación de lípidos y carbohidratos. El mismo resultado (acumulación sólo de carbohidratos) se obtuvo para *I. galbana* (T-ISO) tras 6 días en medio libre de N (Harrison *et al.*, 1990). Los principales productos de reserva en *Isochrysis* C-ISO son también los carbohidratos (Nelson *et al.*, 1992).

En su revisión bibliográfica sobre las diversas cepas de *Isochrysis galbana*, Wikfors y Patterson (1994) recomiendan no considerar las cepas T-ISO ("*Isochrysis taitiana*") y C-ISO ("*Isochrysis caribeña*") como *I. galbana*, siendo dudosa incluso su adscripción al género según estos autores. Como se discutirá más adelante, los perfiles de ácidos grasos publicados para *I. galbana* (ISO) y las otras dos cepas son cualitativamente diferentes. La cepa utilizada en nuestro laboratorio se obtuvo inicialmente del "Culture Center of Algae and Protozoa" (cepa LB 927/1), y es considerada descendiente del cultivo a partir del cual Parke (1949) hizo la descripción del género y especie, y aislada en la Isla de Man (Wikfors y Patterson, 1994).

La disminución de la intensidad de luz ejerce efectos diferentes en función de la especie. Las células de *Isochrysis* sp. (clon T-ISO) cultivadas a 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se caracterizaron (frente a aquellas cultivadas a 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) por menores contenidos celulares (pg.cel⁻¹) de proteína, carbohidratos y lípidos; sin embargo, como % PSLC, sólo la disminución de carbohidratos y aumento de clorofila *a* fueron significativas (Brown *et al.*, 1993a). Para *D. bardawil*, Ben-Amotz (1987) sólo observó un aumento significativo en el contenido de lípidos a bajas intensidades de luz; el contenido de proteína en condiciones de suficiencia de nutrientes (5 mM N y 0.2 mM P) o deficiencia de N ó S fue independiente de la luz, y decreció del 27 - 30% PSLC al 10% en 6 días de estrés de N, mientras no fue afectado por la deficiencia en S, y la deficiencia en P decreció el nivel de proteína sólo a altas intensidades. *Chaetoceros* sp. cultivado a baja intensidad de luz mostró mayores

contenidos de lípidos y cenizas y menores de proteína y carbohidratos que a altas intensidades (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1994). El nivel de intensidad luminosa tuvo escaso efecto sobre la composición de *P. tricorutum* (% PSLC) en cultivo semicontinuo (Chrismadha y Borowitzka, 1994).

El alto contenido en lípidos de *T. suecica* durante el crecimiento logarítmico y su decrecimiento en fase estacionaria concuerda con los resultados para otras algas verdes marinas relacionadas. Utting (1985) observa un mayor contenido en lípidos para esta especie cultivada en exceso de N respecto a cultivos en deficiencia de N. Otras microalgas de este género, como *T. maculata*, tampoco responden a la deficiencia de nutrientes con cambios en el contenido de lípidos (Wikfors, 1986). El contenido en lípidos de *Tetraselmis* sp. en fase estacionaria (Uriarte *et al.*, 1993), cultivada en el mismo medio de cultivo utilizado en este trabajo (Fábregas *et al.*, 1984) mostró valores máximos a una relación N:P 20:1 (11.4% PS) sobre el rango de relaciones N/P 0.5 - 80 realizadas variando únicamente la concentración de N, decreciendo a relaciones N/P < 20 (limitación por N) y manteniéndose constante a relaciones N/P > 20.

Las especies de *Dunaliella* siguen tendencias semejantes. Así, como % PS ó % PSLC, Uriarte *et al.* (1993) observaron un mayor contenido en lípidos de *D. primolecta* cultivada en altas concentraciones de N respecto a la cultivada en deficiencia de N. Shifrin y Chisholm (1981) no observaron acumulación de lípidos de *D. tertiolecta* en medio libre de N, y Ben-Amotz (1987) no observó acumulación de lípidos en medio deficiente en N, P ó S para *D. bardawil*. Herrero *et al.* (1994) sólo observaron ligeras variaciones entre las fases logarítmica y estacionaria en el contenido lipídico (pg.cel^{-1}) de *D. tertiolecta* cultivada con urea, obteniéndose los mayores contenidos en las concentraciones de urea más altas (8 - 16 mM N). Sin embargo, Wikfors (1986) encuentra acumulación de lípidos para *D. tertiolecta* a bajas concentraciones iniciales de N y P.

Werner (1970) ha sugerido para algunas diatomeas una acumulación inicial de carbohidratos en condiciones de deficiencia de nutrientes y que éstos sean sustituidos por lípidos a más largo plazo. En las microalgas con esta característica metabólica, los carbohidratos actuarían como una reserva intermediaria, debido a que se requiere un tiempo después de que el N se vuelve limitante para que se produzcan los enzimas esenciales para la síntesis de lípidos (Fogg, 1956). Sin embargo, en *I. galbana* la deficiencia en N impone una acumulación de lípidos y ácidos grasos (Sukenik y Livne, 1991), decrecimiento del contenido celular de proteína, actividad acetyl-CoA carboxilasa, y una variación en la composición de

ácidos grasos (Livne y Sukenik, 1992). La enzima acetil-CoA carboxilasa es responsable de la localización del C celular en la ruta biosintética de lípidos. La acumulación de lípidos resultante bajo deficiencia de N en esta especie se atribuyó a una reducción diferencial en la división celular y en la tasa de síntesis lipídica. A intensidades menores de $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ la tasa de síntesis *de novo* de lípidos también decrece en cultivos suficientes en nutrientes, pero el contenido celular permaneció constante (Sukenik y Livne, 1991).

En *C. calcitrans* y *P. tricornutum* los productos inicialmente acumulados como reserva energética son los carbohidratos, los cuales no son sustituidos a largo plazo por lípidos en *C. calcitrans*. Aunque en *P. tricornutum* sólo se realizó un análisis en la fase estacionaria, ésta responde probablemente a una fase estacionaria más avanzada. Ello es debido a que *P. tricornutum* es capaz de mantener altas tasas de crecimiento durante varias generaciones en medio libre de N. La capacidad de mantener el crecimiento en medio libre de N es común para muchas microlagas (Shifrin y Chisholm, 1981; Sukenik y Livne, 1991; Flynn *et al.*, 1992), pero la tasa de crecimiento decrece rápidamente. En estas dos diatomeas, la acumulación de lípidos parece estar más bien relacionada con la fuente de N asimilada (sulfato amónico) y asociado además con un estrés ácido en el caso de *P. tricornutum*. Esta síntesis no aparenta producirse a partir de polisacáridos de reserva, dado que los carbohidratos totales incrementan sus valores como % PSLC. Los carbohidratos (crisolaminarina principalmente) son la principal fuente de reserva energética en muchas diatomeas, además de cumplir otras funciones fisiológicas (Myklestad, 1988).

El contenido de ARN expresado como $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$, muestra diferentes tendencias en función de la especie y fuente de N. Sin embargo, cuando se expresa como % PSLC desciende continuamente a lo largo del ciclo de crecimiento, con la excepción de los cultivos de *P. tricornutum* con sulfato amónico, y aquellos de *T. suecica* con N oxidado o urea, en los que se produce un incremento a lo largo de la fase estacionaria. Pocos trabajos han analizado las variaciones en el contenido celular de ARN con la intensidad de luz, deficiencia de nutrientes o interacciones de ambos. No obstante la deficiencia en N ó P conlleva normalmente la disminución del contenido celular de ARN (Kaplan *et al.*, 1986b).

Los cultivos de microalgas limitados por nutrientes experimentan cambios predecibles en la composición bioquímica y, por ello, se han propuesto relaciones entre distintos componentes celulares para estimar el "status" nutritivo de una población. La relación carbohidratos/proteína (carb/prot) es un parámetro muy

útil porque responde a la disponibilidad de los nutrientes más comúnmente limitantes, N y P (Ganf *et al.*, 1986). Sin embargo, grandes fluctuaciones diurnas en las proporciones de estos constituyentes celulares pueden enmascarar las tendencias a largo plazo. Por ejemplo, en poblaciones en crecimiento activo los carbohidratos se acumulan durante el período de luz, pero son consumidos durante la noche para proporcionar la energía y esqueletos carbonados para la síntesis proteica (Myklestad, 1988) y de ácidos grasos (Flynn *et al.*, 1992). Por ello, las variaciones en la relación carb/prot encontradas entre la fase logarítmica y estacionaria pueden ser del mismo orden que las variaciones diarias en la fase logarítmica; no obstante, la magnitud de los cambios diarios decrece constantemente con la edad del cultivo, y, además, desciende con la disminución de la intensidad luminosa (Ganf *et al.*, 1986). Con todo, para muestras recogidas en el mismo momento del ciclo diario luz-oscuridad, la relación carb/prot en cultivos de *Scenedesmus quadricauda* aumenta constantemente a lo largo del ciclo de crecimiento, y además esta proporción responde a cambios en las concentraciones de N y P de una manera predecible (Ganf *et al.*, 1986; Myklestad, 1988). Cuando el N ó P del medio se agotan, esta proporción aumenta, si bien su aumento con el tiempo es lineal mientras la tasa de crecimiento decrece exponencialmente. Además, el valor de esta relación es independiente de las condiciones de luz (Wynne y Rhee, 1986).

En los presentes ensayos, la relación carb/prot aumenta al detenerse el crecimiento en todos los cultivos y para todas las especies, excepto *T. suecica* para la cual se mantiene estable a lo largo del cultivo con ligeras variaciones.

Sólo en los cultivos de *P. tricornutum* con nitrato, nitrito y urea, se dan todas las respuestas bioquímicas esperadas bajo limitación únicamente de nutrientes: disminución de los contenidos celulares de proteína, ARN y pigmentos fotosintéticos, junto a un aumento de los productos de reserva, en esta especie los carbohidratos. En la fase estacionaria de los cultivos de *P. tricornutum*, los efectos sobre la composición bioquímica pueden ser fácilmente atribuidos a la deficiencia de nutrientes; las poblaciones han cesado de dividirse como una consecuencia directa de que todo el N ha sido asimilado.

Células microalgales con bajo contenido proteico y alto en carbohidratos se han asociado con frecuencia con la deficiencia de N, tanto en cultivo (Myklestad y Haug, 1972; Wikfors, 1986; Ben-Amotz, 1987), como en la naturaleza, especialmente bajo condiciones de "blooms" (Haug *et al.*, 1973; Barlow, 1984). Las poblaciones de *P. tricornutum* cultivadas con amonio, no limitadas por el agota-

miento de nutrientes ni por la luz sino por el pH del medio externo, presentan una respuesta totalmente diferente: descenso de las concentraciones celulares de proteína y aumento de las de carbohidratos, lípidos, ARN, peso seco y PSLC. Concretamente, la fracción lipídica representa el 32% del PSLC. Por otro lado, mientras la relación ARN/prot no varía con la fase de crecimiento en los cultivos con nitrato, nitrito y urea, en los cultivos con amonio aumenta notablemente, indicando un desacoplamiento entre la síntesis de ARN y proteína.

Perfil de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos de una especie microalgal cobra especial importancia en cuanto el cultivo masivo de microalgas se presenta como una alternativa para la producción de ácidos grasos esenciales en nutrición humana y acuicultura. Los animales marinos pueden producir ácidos grasos poliinsaturados de 20 y 22C a partir de ácidos grasos poliinsaturados de cadena más corta obtenidos del alimento, pero los pasos de elongación y desaturación son ineficientes (Kanazawa *et al.*, 1979, 1980), por lo que requieren eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) que deben obtener de la dieta (Brown *et al.*, 1989). Larvas y juveniles de ostra alimentados con dietas ricas en estos ácidos grasos crecen mejor que aquellos alimentados con dietas similares pobres en EPA y DHA (Langdon y Waldock, 1981; Enright *et al.*, 1986a,b; Thompson y Harrison, 1992). Por otra parte, el ácido araquidónico (AA) es precursor de la síntesis de prostaglandinas y parece proteger la mucosa gástrica y duodenal contra los daños producidos por el etanol. Dietas ricas en EPA reducen los niveles de colesterol. γ -linolénico y EPA tienen aplicaciones potenciales en la prevención de enfermedades del corazón y sistema circulatorio, procesos inflamatorios y cáncer (Yongmanitchai y Ward, 1989). Por ello, el conocimiento de la composición de ácidos grasos de diferentes especies con buen crecimiento en cultivo masivo (Volkman *et al.*, 1989; Mourente *et al.*, 1990; Dunstan *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1992b), así como el análisis de diferentes estrategias para alcanzar una sobreproducción en ácidos grasos esenciales (Yongmanitchai y Ward, 1991; Cohen *et al.*, 1992; López-Alonso *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 1993; Dunstan *et al.*, 1993) han recibido un interés creciente en los últimos años.

La síntesis de ácidos grasos es influenciada por intensidad de luz (Thompson *et al.*, 1990; Sukenik y Wahnon, 1991), CO₂ (Tsuzuki *et al.*, 1990; Chrysmadha y Borowitzka, 1994), temperatura y calidad de luz (Thompson y Harrison, 1992), estatus nutritivo (Livne y Sukenik, 1992; Sukenik y Wahnon, 1991; Veloso *et al.*,

1991), fuente de N (Yongmanitchai y Ward, 1991; Flynn *et al.*, 1992), fase del ciclo de crecimiento y sistema de cultivo (Dunstan *et al.*, 1993). Las variaciones observadas implican normalmente variaciones cuantitativas sobre el mismo perfil de ácidos grasos, aunque algunas microalgas, como *D. tertiolecta*, parecen sintetizar determinados ácidos grasos sólo bajo determinadas condiciones de cultivo (Thompson *et al.*, 1990).

El perfil de ácidos grasos de *C. calcitrans* coincide básicamente con el publicado por Volkman *et al.* (1989), Thompson *et al.* (1990) y Shamsudin (1992), aunque no observan la presencia de 16:3 ω 6, 16:3 ω 3 y 20:1. La principal diferencia cuantitativa es la menor proporción de mirístico (17.5 - 20.4% del total de ácidos grasos) y la mayor de EPA (11 - 16%) observadas por Volkman *et al.* (1989) y Thompson *et al.* (1990) respecto a la detectada en nuestros cultivos, similares sin embargo a las encontradas por Shamsudin (1992).

Los perfiles de *D. tertiolecta* coinciden con el publicado por Volkman *et al.* (1989) y Thompson *et al.* (1990). El 16:3 ω 6 no es encontrado por estos autores, aunque sí ha sido publicado para *D. salina* (Mourente *et al.*, 1990). Los ácidos grasos 20:2 ω 6 y araquidónico, presentes en cantidades traza, no son detectados por Volkman *et al.* (1989), quienes no encuentran ácidos grasos de 20 ó 22 átomos de C. Thompson *et al.* (1990) y Herrero *et al.* (1992) sí observan la presencia de ácidos grasos C20 y C22 poliinsaturados para esta especie, aunque a partir del trabajo de Thompson *et al.* (1990), la síntesis de estos ácidos grasos por *D. tertiolecta* parece estar modulada por la intensidad luminosa.

El perfil de *I. galbana* coincide cualitativamente con el de las cepas de Volkman *et al.* (1989), Mourente *et al.* (1990) y Dunstan *et al.* (1993), el clon T-ISO, pero presenta grandes diferencias cuantitativas. Teniendo en cuenta estos 3 trabajos, de los cuales el último incluye análisis en las fases logarítmica y estacionaria, las principales diferencias son un menor contenido en 16:1 (5 - 11% del total para la suma de diferentes isómeros) y EPA (0.2 - 0.8%) y un mayor contenido en oleico (8 - 26%), α -linoleico (2.5 - 10%) y α -linolénico (4 - 7%) que los observados en nuestros cultivos. Entre los poliinsaturados de más de 20C, Dunstan *et al.* (1993) observan la presencia de 22:5 ω 6 además de 22:5 ω 3 y DHA, y López Alonso *et al.* (1992) dan sólo la presencia de 22:3 y DHA. Volkman *et al.* (1989) hacen referencia a la amplia variedad en la composición de ácidos grasos publicada por diferentes grupos para *I. galbana*. 59 clones aislados por López-Alonso *et al.* (1992) a partir de la misma población parental que la utilizada en nuestro estudio mostraron básicamente la misma composición de ácidos grasos

pero una amplia variabilidad en cuanto al contenido de cada ácido graso. No obstante, las variaciones observadas para los 59 clones fueron: 10 - 24% para el 16:1 ω 7; 0 - 1.6%, oleico; 0 - 1.7%, α -linoleico; 13 - 32%, EPA y 4 - 13%, DHA, variaciones de orden similar a las observadas en el presente trabajo entre las fases logarítmica y estacionaria de los cultivos con urea (Tabla XV). El bajo contenido en 16:1 ω 7 y EPA, y alto en oleico y α -linoleico, parecen así características de *Isochrysis* sp. (T-ISO) (= *Isochrysis galbana* T-ISO) que la diferencian de *I. galbana* (ISO).

El perfil de *P. tricorutum* coincide con el publicado por Thompson *et al.* (1990), quienes detectaron además 14:1 ω 5 y 22:5 ω 3, mientras el AA sólo a muy bajas intensidades de luz (14 μ E.m⁻².s⁻¹). Tanto para esta especie como para *I. galbana* (T-ISO) señalan la presencia de 18:5 ω 3, el cual no hemos identificado y podría corresponder al pico desconocido D2.28, presente en ambas especies.

Comparando el perfil de ácidos grasos de *T. suecica* con el de Volkman *et al.* (1989) y Mourente *et al.* (1990), el pico detectado como 16:1 debe ser la suma de los isómeros 16:1 ω 9, ω 7 y ω 13t, siendo el primero el más abundante. El pico identificado como 16:2 ω 4 no es observado por estos autores. Mourente *et al.* (1990) detectan además 22:5 ω 6 y 22:5 ω 3. No obstante, estos autores encuentran mayores contenidos de 16:3 ω 6 (5 - 6% del total de ácidos grasos), y contenidos más bajos de 16:4 ω 3 (8 - 14%) y 18:3 ω 3 (5 - 11%), mientras el contenido de 16:1 ω 9 es muy variable (0.9 - 17.2%).

Volkman *et al.* (1989) comentaron las marcadas diferencias encontradas en diferentes laboratorios en el contenido y composición de ácidos grasos para algunas especies microalgales, particularmente *I. galbana*, y plantearon la cuestión de si pueden obtenerse resultados consistentes para la misma especie cultivada bajo condiciones similares. Probablemente, una cuestión más importante es si diferentes aislamientos corresponden a la misma especie. Los resultados encontrados en el presente estudio se corresponden ampliamente con los de diferentes autores, y las diferencias cuantitativas observadas entre diferentes trabajos son el resultado de diferentes condiciones experimentales, así como del análisis en diferentes fases de crecimiento. Por otra parte, a pesar de la variabilidad genotípica (López-Alonso *et al.*, 1992) y fenotípica (presente trabajo) observada para *I. galbana*, esta variabilidad no solapa las variaciones observadas entre *I. galbana* (ISO) e *Isochrysis* sp. (T-ISO), lo cual apoyaría la separación entre estas dos cepas propuesta por Wikfors y y Patterson (1994). Por otra parte, el perfil de

ácidos grasos observado para *I. galbana* (ISO) coincide muy estrechamente con el observado para el primnesiófito *Pavlova lutheri* por Volkman *et al.* (1989).

Los cultivos con amonio presentan contenidos más altos de ácidos grasos poliénoicos en la fase logarítmica, excepto para *Dunaliella* y *Chaetoceros* donde no se observaron diferencias con las demás fuentes de N. El contenido en ácidos grasos poliinsaturados de las microalgas estudiadas, excepto *Dunaliella*, alcanza los mayores valores en los medios con N reducido (amonio o urea) en la fase logarítmica o inicio de la fase estacionaria, aunque en los cultivos de *Isochrysis* con sulfato amónico la abundancia relativa de poliinsaturados aumenta durante la fase estacionaria. El contenido en ácidos grasos poliinsaturados de *D. tertiolecta* se mantuvo constante entre las fases logarítmica y estacionaria disminuyendo únicamente en los cultivos en medio de amonio. En los cultivos de *Chaetoceros*, *Isochrysis* y *Tetraselmis*, se analizó una fase estacionaria avanzada; en las dos primeras el contenido de ácidos grasos saturados + monoénoicos aumentó a lo largo de la fase estacionaria, con la excepción ya mencionada de *Isochrysis* en medio de amonio. En *Tetraselmis* aumentó continuamente con la edad del cultivo en los medios con N oxidado, manteniéndose constante en los cultivos con urea.

Dunstan *et al.* (1993) observaron una disminución del contenido en ácidos grasos poliinsaturados entre las fases logarítmica y estacionaria para 3 microalgas marinas. Sukenik y Wahnon (1991) obtuvieron un aumento del contenido de ácidos grasos poliinsaturados para *I. galbana* de 35.2 al 48.3% con el aumento de la carga de N en cultivos en régimen de quimiostato, mientras decreció del 50.3 al 48.4% con el aumento en la intensidad de luz de 30 a 175 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Molina-Grima *et al.* (1992) también observaron una disminución continua del contenido de PUFAs de *I. galbana* (ISO) con el aumento en la intensidad de luz y con la disminución de la concentración inicial de nitrato por debajo de 4 mM. El máximo en el porcentaje de poliinsaturados al inicio de la fase estacionaria observado en nuestros cultivos debería así ser debido al efecto de autoensombrecimiento, mientras el aumento en ácidos saturados a lo largo la fase estacionaria sería reflejo de una deficiencia progresiva en nutrientes.

Flynn *et al.* (1992) encontraron que en *I. galbana* (T-ISO) la deficiencia en N conllevó el aumento del contenido (% del total) de mirístico, oleico, α -linoleico, 18:4 ω 3 y DHA, y disminución en la mayoría de los restantes ácidos grasos. Estos resultados son contrarios a los de Sukenik y Wahnon (1991) y Livne y Sukenik (1992) para *I. galbana* (T-ISO), quienes encontraron que la abundancia relativa de palmítico y oleico (componentes de los triglicéridos) aumenta durante la

deficiencia en N, mientras disminuye la de mirístico y 18:4 ω 3 (ácidos grasos asociados con galactolípidos estructurales), y ligeramente la de DHA (presente principalmente en fosfolípidos). La disminución en la luz incidente provoca el aumento del 18:4 ω 3 y palmitoleico y un ligero decrecimiento en oleico y DHA (Sukenik y Wahnou, 1991). Nuestros datos para *I. galbana* (ISO) concuerdan con estos resultados y reflejan una abundancia más alta de mirístico durante la fase logarítmica y de 18:4 ω 3 al inicio de la fase estacionaria, mientras la abundancia máxima de palmítico, palmitoleico y oleico se produce tras 10 días en fase estacionaria. La mayor abundancia de EPA y DHA se observa generalmente al comienzo de la fase estacionaria. El efecto de la intensidad de luz es diferente según la especie; así, por ejemplo, en *C. calcitrans*, la disminución en la intensidad luminosa conlleva el aumento en ácidos grasos poliinsaturados de 16C, pero con una disminución en 16:4 ω 1 y 18:4 ω 3 (Thompson *et al.*, 1990).

Las proporciones (S+MI)/PI y ω 6/ ω 3 se consideran indicativas del valor nutricional en el cultivo de moluscos bivalvos. Dietas con valores bajos de la relación (S+MI)/PI (altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados) y proporciones ω 6/ ω 3 < 0.5 resultaron óptimas para el cultivo de larvas y semilla de ostra (Webb y Chu, 1983; Enright *et al.*, 1986a,b). Ambos requisitos se alcanzan en *C. calcitrans* cuando se cultiva con carbonato o sulfato de amonio y la recolección se hace en la fase estacionaria. Para *D. tertiolecta*, las relaciones (S+MI)/PI y ω 6/ ω 3 fueron óptimas en todas las muestras, con valores inferiores a 0.8 y 0.3 respectivamente. En *I. galbana*, la relación (S+MI)/PI alcanza el valor más bajo (0.61) al comienzo de la fase estacionaria de los cultivos con urea, mientras la relación ω 6/ ω 3 es inferior a 0.5 para todas las fuentes de N y fases de crecimiento. El cultivo en urea y recolección al inicio de la fase estacionaria proporciona la mejor combinación entre alta productividad y bajos valores de ambas relaciones para *P. tricorntutum* y *T. suecica*. No obstante, la relación ω 6/ ω 3 fue menor a 0.5 para *P. tricorntutum* en 7 de 8 muestras. Para *T. suecica*, el cultivo en nitrato, urea o amonio en fase logarítmica o en urea en cualquier fase de crecimiento da lugar a combinaciones óptimas de ambas relaciones: (S+MI)/PI < 1 y ω 6/ ω 3 < 0.2.

Pocos trabajos han analizado el efecto de diferentes fuentes de N sobre la producción o composición de ácidos grasos. Yongmanitchai y Ward (1991) encontraron que el contenido en EPA de *P. tricorntutum* aumenta con la concentración de N del medio y es superior en medios de urea que nitrato o amonio. El contenido total de ácidos grasos (mg.g⁻¹ peso seco) encontrado por estos autores fue muy similar en valor al obtenido en las presentes experiencias, observando también el mismo efecto de la fuente de N (amonio > urea > nitrato), aún dadas sus diferentes

condiciones de cultivo. Por otra parte, sólo observaron un aumento significativo del contenido total de ácidos grasos de esta diatomea a concentraciones iniciales muy bajas de N en el medio. Flynn *et al.* (1992) encontraron mayores contenidos de ácidos grasos poliinsaturados para *I. galbana* (T-ISO) cultivada con nitrato que con amonio en condiciones de suficiencia de N. En nuestras experiencias el contenido total de ácidos grasos no difiere entre los medios con amonio y nitrato durante el crecimiento logarítmico, siendo superior en los últimos en fase estacionaria avanzada.

La fuente de N y fases de crecimiento afectan significativamente a la estructura bioquímica de las células microalgales. Esta variabilidad en la composición bruta y de ácidos grasos de una determinada especie hace necesario diseñar las dietas no sólo en función de especies digeribles y no tóxicas, sino tener en cuenta la influencia de las condiciones de cultivo sobre la calidad nutricional de una microalga en particular. Como se ha demostrado anteriormente (Wikfors *et al.*, 1984; Enright *et al.*, 1986b) no es suficiente seleccionar como alimento microalgas consideradas óptimas a partir de los datos bibliográficos, sino que los resultados obtenidos en crecimiento y supervivencia de los animales en cultivo puede variar ostensiblemente en función de la composición bioquímica de esas microalgas en el momento de ser suministradas, composición que además variará en función del tiempo de residencia de las células en el agua de los tanques de cultivo. Como ejemplo, la diatomea marina *P. tricornutum* ha dado resultados muy variables para el cultivo moluscos bivalvos, con un valor nutritivo bajo para juveniles de *Ostrea edulis* en comparación a *I. galbana* o *Chaetoceros* spp. (Enright *et al.*, 1986a) pero un valor similar a *I. galbana* para el crecimiento de larvas de *O. edulis* (Wilson, 1978; Ferreiro *et al.*, 1990) y juveniles de *Mercenaria mercenaria* y *Mytilus edulis* (Walne, 1970). Además del grado de digestibilidad (Epifanio, 1983), la gran variabilidad bioquímica de esta diatomea en función de la fase de crecimiento (presente trabajo), formulación del medio de cultivo (Herrero *et al.*, 1991), así como la variación de la composición de ácidos grasos con el aumento de la densidad celular (Chrismadha y Borowitzka, 1994) o de la fuente de N (presente trabajo; Yongmanitchai y Ward, 1991) debe tener gran influencia en los resultados obtenidos con esta especie.

CULTIVO DE JUVENILES DE *Mytilus galloprovincialis* Lmk CON DIETAS DE MICROALGAS VIVAS

Un procedimiento útil para la evaluación de diferencias en el valor alimenticio es estimar las eficiencias de crecimiento relativas de los organismos alimentados con diferentes dietas. La importancia de suministrar una dieta adecuada es muy clara: el crecimiento será más rápido y más eficiente, la semilla alcanzará un tamaño superior y reponderá mejor en el momento de ser transferida al medio natural (Laing y Millican, 1986).

En el presente estudio, la ración alimenticia se incrementó gradualmente, durante el período de aclimatación, desde bajos niveles hasta un nivel dietario de 1.20 mg de materia seca algal por mejillón y día, equivalente al 21% del peso corporal seco por día, o 10 - 15% de la materia orgánica dependiendo de la dieta. Raciones alimenticias del 10 - 20% del peso seco por día se han recomendado para mejillones de 0.2 g (Bayne *et al.*, 1976). A lo largo del período experimental la ración de alimento se incrementó hasta 1.81 mg de materia algal por mejillón y día en todas las dietas. No obstante, las tasas de alimentación para cada dieta fueron diferentes a lo largo del período experimental dado el diferente incremento en peso corporal para cada dieta. Así, la ración alimenticia final osciló entre el 22 - 27% del peso seco corporal (dietas *Dunaliella* y *Dunaliella* + *Phaeodactylum*) y el 7.5 - 13% (restantes dietas).

El grupo control no alimentado se incluyó para comprobar que ningún otro factor que las dietas microalgales indujeron crecimiento. Los datos obtenidos muestran que los mejillones no alimentados no experimentaron variaciones significativas en la longitud o volumen. Por lo tanto, los crecimientos observados en los otros grupos de mejillones se debieron a las dietas microalgales aportadas.

Los mejillones no alimentados tuvieron una alta tasa de supervivencia ($Z=0$) durante los primeros 20 días. La tasa de mortalidad aumentó a valores de 0.43 al final de los experimentos. Un ligero incremento en la longitud se observó durante los primeros 11 días ($Gr = 29$). Riisgard y Randlöw (1981) encontraron que *M. edulis* también puede sostener un pequeño crecimiento de la concha cuando no es alimentado o lo es por debajo de los niveles de mantenimiento. En nuestros experimentos, durante el período de inanición la pérdida de peso seco de vianda fue de 0.32 mg por día (64% del peso seco inicial), 0.17 mg d⁻¹ de proteína, 0.09 mg d⁻¹ de carbohidratos y 0.03 mg d⁻¹ de lípidos. En mejillones sexualmente maduros se ha observado también una utilización preferente de la proteína como sustrato

metabólico (revisado por Gabbot, 1976). Hawkins y Bayne (1991), con mejillones de 10 mg de peso seco, también encontraron un aumento del catabolismo de la proteína endógena con la disminución de la energía aportada en la dieta, para soportar los requerimientos metabólicos.

Para los mejillones alimentados, las tasas de crecimiento en longitud y volumen no fueron constantes a lo largo del período experimental. Se pueden diferenciar claramente dos períodos en el crecimiento en longitud y volumen (Figs. 26, 28). En todas las dietas, las tasas de crecimiento fueron más altas durante los primeros 18 días. Nielsen (1988) observó este mismo comportamiento en juveniles de *M. edulis*, como respuesta aguda (incremento inicial) y aclimatación al aumento de la temperatura. La temperatura media en las aguas de la Ría de Arousa es 12 - 13°C en abril, y los experimentos se realizaron a 18°C. Por lo tanto este incremento puede haber provocado un aumento en la tasa de crecimiento. No obstante, los mejillones habían sido aclimatados a las condiciones de laboratorio durante 8 días antes de comenzar los experimentos. En estos experimentos, la tasa de crecimiento alcanzó un nuevo estado de equilibrio ("steady-state") después de 18 días (Figs. 26 y 28). También se ha observado un fuerte descenso en la tasa de crecimiento a 18°C (Nielsen, 1988). Otros parámetros fisiológicos, tales como la tasa de filtración, tasa de respiración o potencial de actividad ("scope for activity"), muestran una aclimatación a la temperatura entre 10 y 20°C (revisado por Bayne *et al.*, 1976), alcanzándose una nueva situación de equilibrio en un período de 15 días tras la perturbación. No obstante, el crecimiento es un proceso fisiológico más complejo.

Los efectos de la dieta sobre el crecimiento fueron más evidentes durante el segundo período (días 18 - 60). Se pueden establecer dos tipos de dietas en función de su valor alimenticio (Fig. 26, 28): a) dietas que incluyen *T. suecica* en su formulación, y b) las dietas monoalgales de *P. tricornutum*, *D. tertiolecta* y la dieta mixta de ambas. También se observaron diferentes valores alimenticios en las tasas de crecimiento en peso, eficiencias de crecimiento, e índices de condición (Tabla XXXII), estando todos estos parámetros significativa y positivamente correlacionados entre ellos (Tabla XXXIII). Los mejillones alimentados con *T. suecica*, en dieta monoalgal o mixta, utilizaron la ración filtrada más eficientemente para el crecimiento (K_1 aprox. 30%), alcanzando índices de condición próximos a 100, frente a 60 para mejillones recolectados en el litoral de volumen equivalente.

El crecimiento en longitud de la concha de los mejillones alimentados con dietas que incluyen *T. suecica* fue de 0.10 - 0.14 mm día⁻¹ durante los primeros 18

días, decreciendo a 0.04 - 0.05 mm día⁻¹ desde este momento. Estos valores son inferiores a otros publicados para mejillones en la naturaleza: 0.10 - 0.34 mm día⁻¹ para mejillones de 26 mm (Aguirre, 1979), 0.24 mm día⁻¹ para mejillones de 18.2 mm (Pérez y Roman, 1979), para mejillones cultivados sobre batea en la Ría de Arousa; 7 - 11 mm mes⁻¹ a partir de otros estudios en la naturaleza (revisado por Jorgensen, 1990). No obstante, el crecimiento obtenido en nuestros experimentos fue similar a otros obtenidos en el laboratorio (Jorgensen, 1990). De acuerdo a Jorgensen (1990), mejillones con un crecimiento de 0.34 mm día⁻¹ explotan su potencial completo de crecimiento; por lo tanto, en los presentes experimentos los mejillones habrían explotado 1/2 del potencial de crecimiento durante el primer período experimental, pero sólo 1/5 después del día 18 de cultivo.

Se observó un efecto sinérgico en las dietas mixtas, principalmente en aquellas que incluyen *T. suecica*. En base a una interrelación lineal entre la concentración celular de la suspensión y la tasa de crecimiento (Strömngren y Cary, 1984), si sólo se produjeran efectos aditivos entre las dietas, las tasas de crecimiento relativas observadas en las dietas mixtas serían similares a la media de las tasas de crecimiento relativas de las dietas monoalgales. Las tasas de crecimiento relativas fueron más altas que las medias de las tasas de las dietas monoalgales respectivas (Tablas XXIX, XXXI). La dieta *Tetraselmis* + *Phaeodactylum* proporcionó la tasa de crecimiento más alta, mientras las dietas *Tetraselmis* y *Tetraselmis* + *Dunaliella* soportaron crecimientos similares. *P. tricornutum* tuvo un valor alimenticio más alto que *Dunaliella*, y mantuvo una tasa de crecimiento relativa constante en relación a *Tetraselmis* a lo largo del período experimental.

Las dietas de *Dunaliella* y *Dunaliella* + *Phaeodactylum* soportaron un buen crecimiento sólo durante el primer período experimental; en estas dietas las tasas de crecimiento relativas descendieron continuamente a lo largo del período experimental.

Se han sugerido diferentes factores asociados con las células microalgales para explicar por qué algunas especies de microalgas son mejores que otras como alimento para moluscos: tamaño celular, composición de la pared, digestibilidad, metabolitos tóxicos y composición bioquímica (Webb y Chu, 1983). Ninguna de estas características ofrece una respuesta enteramente satisfactoria por sí sola. De las tres dietas monoalgales ensayadas, *D. tertiolecta* presenta el valor nutritivo más bajo. El bajo valor nutritivo de *D. tertiolecta* para bivalvos juveniles ha sido un resultado consistente entre diferentes trabajos (Walne, 1970; Wikfors *et al.*, 1984; Enright *et al.*, 1986a). *T. suecica* y *D. tertiolecta* tienen un tamaño y forma

Tabla XXXVI. Composición bioquímica (% del peso seco) de *T. suecica*, *D. tertiolecta* y *P. tricorutum* en fase exponencial de crecimiento.

	proteína	carboh.	cenizas	N	C	ác. grasos	AGPACL	S+MI	EPA	DHA	$\omega 6/\omega 3$
<i>T. suecica</i>	17.62	5.51	20.50	6.46	36.89	11.02	1.00	3.17	0.63	0	0.09
<i>D. tertiolecta</i>	24.74	8.34	15.64	8.95	44.04	12.53	tr	2.54	0	0	0.16
<i>P. tricorutum</i>	18.30	5.68	40.70	5.75	31.11	8.15	0.96	5.07	0.86	0.05	0.40

AGPACL: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (C20 y C22).

S+MI: ácidos grasos saturados + monoinsaturados.

similares, siendo la principal diferencia entre ellas la presencia de una pared celular medio rígida en *T. suecica* y la ausencia de pared celular en *D. tertiolecta*. La célula de *Dunaliella* es por ello más flexible que otras células microalgales, flexibilidad probablemente responsable de una mayor resistencia a la ruptura por el estilo cristalino. Por otra parte, ha sido detectada la presencia de ectocrinas en filtrados de cultivos de *D. tertiolecta*, ectocrinas inhibitorias de la actividad filtradora de *M. edulis* (inhibición dependiente de la concentración), pero no así en *T. suecica* (Ward y Targett, 1989).

La composición bioquímica bruta (% del peso seco) de las tres microalgas utilizadas no difiere notablemente bajo las presentes condiciones de cultivo (Tabla XXXVI), si bien *D. tertiolecta* presenta el mayor contenido de proteína y carbohidratos y *P. tricorutum* de cenizas.

Se ha relacionado frecuentemente la composición y balance de ácidos grasos de la dieta con el valor alimenticio de las microalgas (Langdon y Waldock, 1981; Webb y Chu, 1983; Enrigh *et al.*, 1986b), principalmente respecto a los contenidos de ácidos grasos poliinsaturados de 20 y 22 átomos de C. El bajo valor alimenticio de *D. tertiolecta* se ha relacionado con la ausencia éstos ácidos grasos (Tabla X), mientras *T. suecica* contiene EPA (Tabla, XXV) y *P. tricorutum* contiene EPA y DHA (Tabla XX).

Los moluscos requieren un aporte en la dieta de arginina, histidina, metionina, cisteína, leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina y prolina (Boudreau, 1985). Todos estos aminoácidos son aportados por las microalgas utilizadas en estos experimentos (Fábregas *et al.*, 1985; Herrero *et al.*, 1985). Las cantidades de aminoácidos son muy similares en todas ellas, aunque *T. suecica* y *P. tricorutum* aportan cantidades más elevadas de metionina (2.28 y 1.45 g por cada 16 g de N, respectivamente) y treonina (5.19 y 5.27 g por cada 16 g de N,

respectivamente) que *D. tertiolecta* (0.80 g de metionina y 2.58 g de treonina por cada 16 g de N). El contenido vitamínico (Fábregas y Herrero, 1990) y composición mineral (Fábregas y Herrero, 1986) son muy similares en *T. suecica* y *D. tertiolecta*, si bien *T. suecica* presenta un mayor contenido de tocoferol, zinc y cobre, y *D. tertiolecta* de β -caroteno.

Las diferencias en ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas y minerales tienden a compensarse en las dietas mixtas. La dieta mixta de *T. suecica* y *P. tricorutum* es probablemente la dieta mejor equilibrada respecto a su composición bioquímica, promoviendo el crecimiento más rápido de todas las dietas ensayadas.

T. suecica tiene el mayor tamaño celular de las microalgas utilizadas en este trabajo, proporcionando la mayor biomasa por célula. Así, cuatro células de *P. tricorutum* proporcionan la misma materia orgánica que una célula de *T. suecica*. Esta diferente relación materia orgánica:volumen actúa sobre el coste energético de la alimentación. Este hecho debe ser particularmente importante cuando el valor alimenticio de la materia orgánica ingerida es bajo. Laing y Millican (1986) encontraron que la tasa de filtración ("clearance rate") y la tasa metabólica de semilla de *Ostrea edulis* fueron más altas en las dietas de menor valor alimenticio, asociado con un crecimiento orgánico más bajo. Estos autores sugieren que ello debe representar un intento por parte de la semilla de obtener las cantidades requeridas de nutrientes esenciales a partir de estas dietas incrementando la tasa de filtración, lo cual llevaría a una mayor demanda metabólica de la ración asimilada, con una menor energía disponible para el crecimiento orgánico.

La dieta modificó también la composición bioquímica de los mejillones (Tabla XXXIV). *D. tertiolecta* tiene el mayor contenido de carbohidratos de las tres microalgas utilizadas (Tabla XXXVI), y la inclusión de *D. tertiolecta* en la dieta conllevó niveles de carbohidratos más altos.

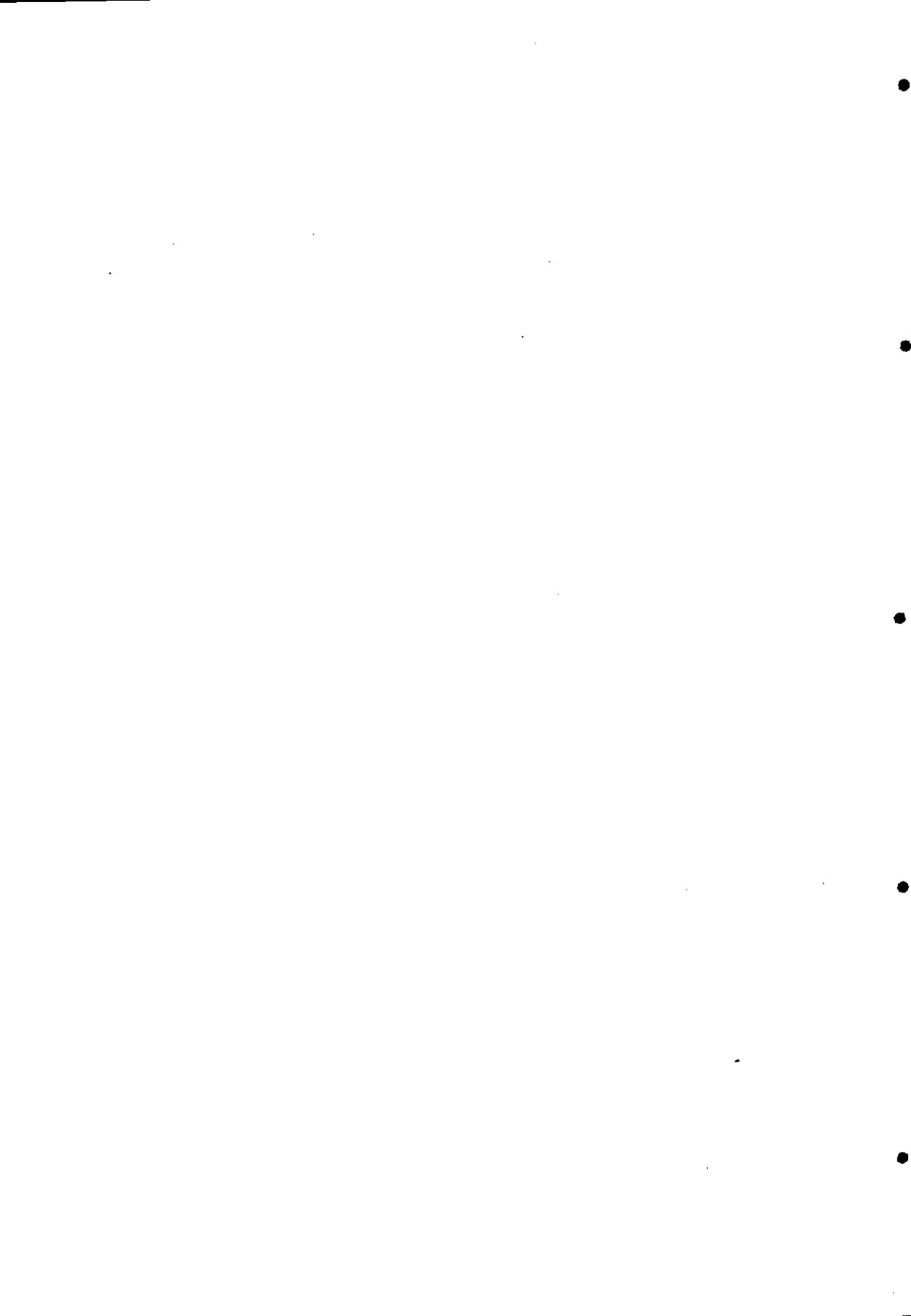
A partir de los datos bioquímicos, surge una hipótesis alternativa para la dinámica de crecimiento observada en las Figs. 26 y 28. Los mejillones "salvajes" presentan, al principio del experimento, niveles de lípidos (9% PS) considerablemente más altos que los mejillones alimentados experimentalmente (3 - 5% PS) al final del experimento. Este descenso de los lípidos como % del PS fue inferior en las dietas que soportaron un mayor crecimiento. Además, en las dietas de *Dunaliella* y *Dunaliella* + *Phaeodactylum* los lípidos también decrecieron en mg

por mejillón. El período de rápido crecimiento inicial debe haber sido soportado por algún componente lipídico almacenado, y que las dietas que incluyen *T. suecica* deben contener en cantidades más altas que las restantes. *Tetraselmis* contiene mayores contenidos (% del total de ácidos grasos) de 18:1 ω 9, 18:4 ω 3 y ácidos grasos poliinsaturados C20 y C22 que *Dunaliella*. Los ácidos grasos presentes en cantidades más altas en *Tetraselmis* que en *Phaeodactylum* son 18:1 ω 9, 16:4 ω 3, 18:3 ω 3 y 18:4 ω 3. *Tetraselmis* y *Phaeodactylum* muestran además grandes diferencias en las relaciones S+MI/PI (0.40 y 1.65, respectivamente) y ω 6/ ω 3 (0.09 y 0.40, respectivamente).

Las tasas de crecimiento y eficiencias de crecimiento están significativa y positivamente correlacionadas con los lípidos corporales, expresados como % del peso seco de la vianda (Tabla XXXIII). La proporción lípidos:proteínas también fue mayor en las dietas que promovieron un mayor crecimiento. Por lo tanto, los mejillones alimentados con dietas que soportaron un crecimiento más alto alcanzaron también contenidos lipídicos más altos. Esto también ha sido observado por Laing y Millican (1986) para semilla de *O. edulis* cultivada; la semilla con mayores contenidos lipídicos presentó posteriormente crecimientos y supervivencias más altas cuando se transplantó a cultivos en el medio natural.

La optimización de las condiciones de cultivo, particularmente la dieta, ha producido un importante incremento en la supervivencia de los mejillones en el laboratorio y en el número de metafases obtenidas para estudios citogenéticos. En este sentido, el índice mitótico fue reflejo del estado fisiológico del mejillón: mejillones recién recolectados de rocas del litoral mostraron índices mitóticos variables pero bastante bajos; según el tiempo de alimentación en el laboratorio aumentó, los índices mitóticos aumentaron y su variabilidad decreció (Martínez-Espósito *et al.*, 1994). Las especies microalgales utilizadas deben tener también una importante influencia sobre los resultados obtenidos a partir de experimentos fisiológicos.

Conclusiones



① *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae), *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae), *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) y *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae), crecen bien con nitrato, nitrito o urea como única fuente de N, pero *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae) fue incapaz de crecer con urea. La utilización de nitrato o urea no afecta a la biomasa final obtenida, mientras el nitrito decrece la productividad en *Isochrysis* y *Phaeodactylum*. El crecimiento de *Dunaliella*, *Phaeodactylum* y *Tetraselmis* en medios con amonio conlleva un rápido descenso del pH a valores extremadamente ácidos.

② La fuente de N metabolizada y la fase de crecimiento afectan significativamente el peso seco celular, aunque esta respuesta es dependiente de la especie. Las células de *Chaetoceros*, *Dunaliella* y *Phaeodactylum* cultivadas con amonio presentan pesos secos más altos con respecto a las demás fuentes durante el crecimiento logarítmico. Excepto para *P. tricornutum*, el peso celular aumenta con el tiempo de cultivo, principalmente a lo largo de la fase estacionaria.

③ La composición bioquímica varía en función de la fuente de nitrógeno suministrada al medio de cultivo, así como, y más significativamente, de la fase de crecimiento en que se recoge la biomasa. La fuente de N ejerce poco efecto sobre el porcentaje de proteína. El contenido de proteína, expresada como %PSLC, tiende a decrecer con el envejecimiento del cultivo. La disminución en el porcentaje de proteína se correlacionó generalmente con un aumento relativo de los productos de reserva. Para todas las especies el contenido celular de carbohidratos aumenta con el envejecimiento del cultivo; el efecto de la fuente de N depende de la especie. El contenido celular de lípidos sigue tendencias diferentes en función de la especie y fuente de N.

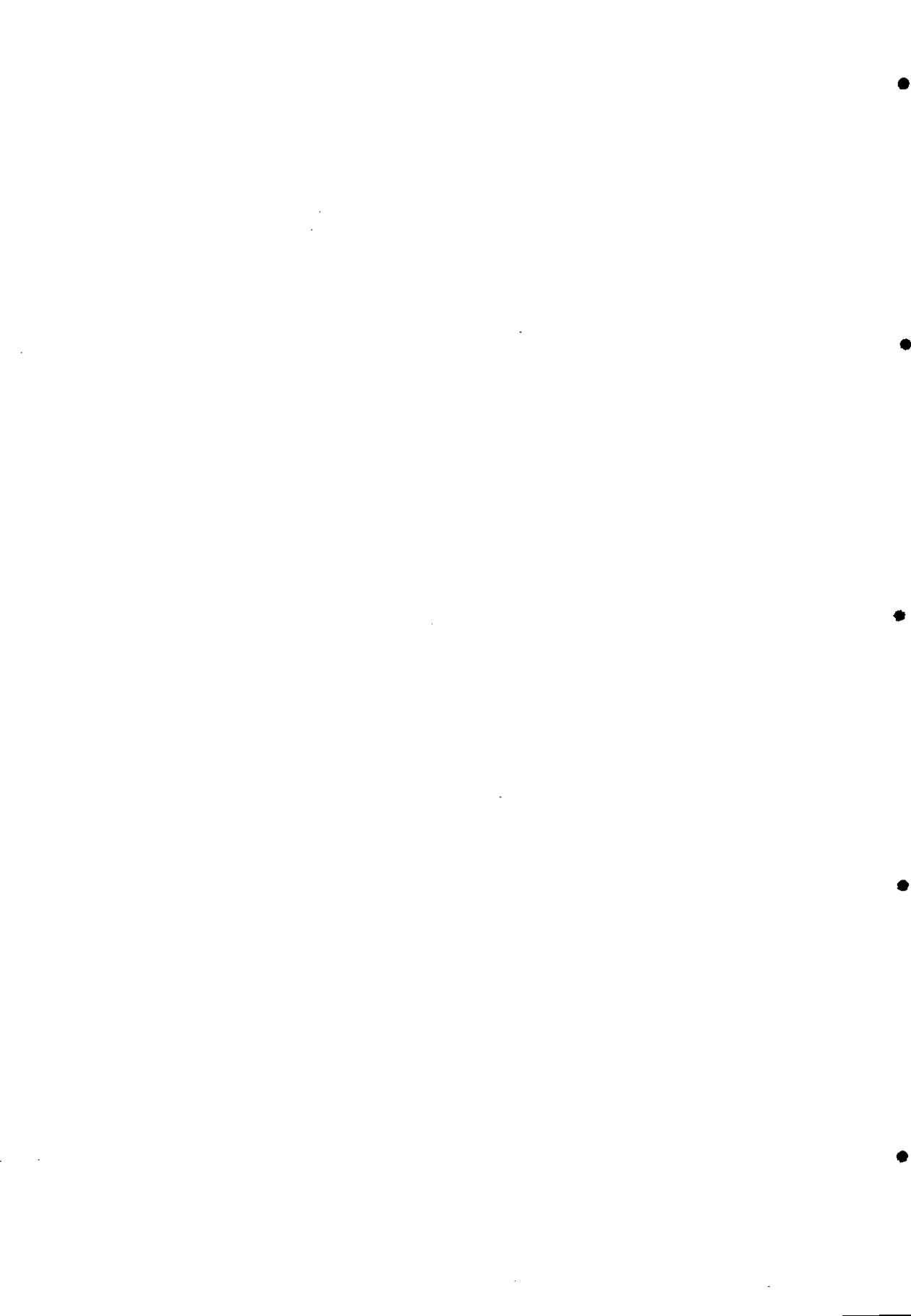
④ Para *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Phaeodactylum* y *Tetraselmis*, el contenido en ácidos grasos poliinsaturados alcanza los mayores valores cuando se cultivan con fuentes de N reducido (amonio y/o urea), y generalmente al inicio de la fase estacionaria. En *Chaetoceros* e *Isochrysis*, así como *Phaeodactylum* cultivado con urea o amonio, la relación entre los ácidos grasos poliinsaturados de las series $\omega 6$ y $\omega 3$ ($\omega 6/\omega 3$) alcanza su valor mínimo al comienzo de la fase estacionaria, mientras

en *Tetraselmis* aumenta con la edad del cultivo. La composición de ácidos grasos de *Dunaliella* se muestra altamente invariable en función de la fuente de N y fase de crecimiento.

⑤ El amonio a elevadas concentraciones no resulta tóxico para *Tetraselmis* o *Phaeodactylum* cuando el medio se tampona con HEPES. La disminución del pH del medio en los medios con amonio es acompañado por un aumento del pH intracelular en ambas especies. Tras el inicio de la fase de luz, las células creciendo en amonio asimilan el C más rápidamente que aquellas creciendo en nitrato.

⑥ Dietas que incorporan *Tetraselmis* en su formulación sostienen buen crecimiento en longitud, volumen y carne de semilla de *Mytilus galloprovinciales*, e incrementan el índice de condición con respecto a mejillones salvajes de volumen equivalente. Las dietas mixtas mejoran generalmente los resultados de dietas monoalgales. La dieta también modifica la composición bioquímica de los mejillones en cultivo.

Bibliografía



- Abalde, J. 1986. *Cultivo de la microalga marina Dunaliella tertiolecta con diferentes fuentes de nitrógeno. Potencial obtención de compuestos útiles*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 329 pp.
- Abalde, J., Fábregas, J. y Herrero, C. 1991. β -carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. **Biores. Technol.** 38: 121-125.
- Aguirre, M. P. 1979. *Biología del mejillón (Mytillus edulis) de cultivo de la Ría de Vigo*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
- Ahlgren, G. 1980. Effects on algal growth by multiple nutrient limitation. **Arch. Hidrobiol.** 89: 43-53.
- Akatsuka, I. (Ed.). 1990. *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing bv, The Hague. 683 pp.
- Antia, N.J., Berland, B.R., Bonin, D.J. y Maestrini, S.Y. 1975. Comparative evolution of certain organic and inorganic nitrogen source for phototrophic growth of marine microalgae. **J. Mar. Biol. Ass. U.K.** 55: 519-539.
- Antia, N.J., Harrison, P.J. y Oliveira, L. 1991. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. **Phycologia** 30: 1-89.
- Avron, M. 1992. Osmoregulation. In: *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. Avron, M. y Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Press. Boca Ratón, Florida. pp: 135-164.
- Azuara, M.P. y Aparicio, P.J. 1983. *In vivo* blue-light activation of *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase. **Plant Physiol.** 71: 286-290.
- Barlow, R. G. 1984. Dynamics of the decline of a phytoplakton bloom after an upwelling event. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 16: 121-126.
- Bayne, B. L., R. J. Thompson y J. Widdows. 1976. Physiology: I. In: *Marine mussels. Their ecology and physiology*. Bayne, B.L. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp: 121-206.
- Becker, E.W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. A. Richmond Ed. CRC Press. Boca Ratón, Florida. pp: 339-419.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: Microbiology and Biotechnology*. Baddiley, J., Carey, N.H., Higgings, I.J. y Potter, W.G. (eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge. 293 pp
- Becker, E.W. y Venkataraman, L.V. 1982. *Biotechnology and explotation of algae. The Indian Approach*. Deustch Gesellschaft für Technische GmbH, Eschborn. 216 pp.
- Ben-Amotz, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz y Avron (Volvocales, Chlorophyta). **J. Plant Physiol.** 131: 479-487.

- Berges, J.A., Fisher, A.E. y Harrison, P.J. 1993. A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Mar. Biol.** 115: 187-193.
- Berner, T. 1993. Ultrastructural characterization of eukariotic algal groups. In: *Ultrastructure of Microalgae*, Berner, T. (ed.). CRC Press, Boca Raton. pp. 2-6.
- Bertl, A., Felle, H. y Bentrup, F.W. 1984. Amine transport in *Riccia fluitans*. **Plant. Physiol.** 76:75-79.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.F. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** 37: 911-917.
- Bold, H.C. y Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the Algae*. 2nd Ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey. 720 pp.
- Boney, A.D. 1989. *Phytoplankton*. 2nd ed. Edward Arnold, London. 118 pp.
- Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.) 1988. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Borowitzka, M.A., Chiappino, M.L. y Volcani, B.E. 1977. Ultrastructure of a chain-forming diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **J. Phycol.** 13: 12-19.
- Boudreau, K. N. 1985. Aquaculture nutrition: protein. In: *Biological aspects of aquaculture nutrition*. Castell, J. D. et al. (eds.), World Conference on Aquaculture and International Aquacultural Trade Show.
- Boussiba, S. y Richmond, A.E. 1980. c-Phycocyanin as a storage protein in the blue-green algae *Spirulina platensis*. **Arch. Microbiol.** 125: 143-147.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. **CSIRO Marine Laboratories**, Report n° 205.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Barrett, S.M. y LeRoi, J.-M. 1993a. The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (clon T-ISO). **J. Phycol.** 29: 601-612.
- Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D. y LeRoi, J.-M. 1993b. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clon T-ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. **J. Appl. Phycol.** 5: 285-296.
- Busa, W.B. y Nuccitelli, R. 1984. Metabolic regulation via intracellular pH. **Am. J. Physiol.** 246: 409-438.

- Canvin, D.T. 1990. Photorespiration and CO₂-concentrating mechanisms. In *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dennis, D.T. y Turpin, D.H. (eds.). Longman Scientific & Technical, Essex. pp. 253-273.
- Chrétiennot-Dinet M.-J. 1990. *Atlas du phytoplankton marin*. Vol. 3. Editions du CNRS. Paris. 261 pp.
- Chrétiennot-Dinet M.-J., Sournia, A., Ricard, M. y Billard, C. 1993. A classification of the marine phytoplankton of the world from class to genus. *Phycologia* 32: 159-179.
- Chrimadha, T. y Borowitzka, M.A. 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricorutum* grown in tubular photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 6: 67-74.
- Cid, A., Abalde, J. y Herrero, C. 1992a. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (Prasinophyceae). *J. Appl. Phycol.* 4: 31-37.
- Cid, A., Abalde, J. y Herrero, C. 1992b. Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Tetraselmis suecica* en cultivos mixotróficos con distintos azúcares y aminoácidos. *Cah. Biol. Mar.* 33: 169-178.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E. y Abalde, J. 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* (en prensa).
- Cohen, Z. 1986. Products of microalgae. In: *Handbook of Microalgae Mass Culture*. Richmond, A. (ed.). C.R.C. Press. Florida. pp: 421-453.
- Cohen, Z., Didi, S. y Heimer, Y.M. 1992. Overproduction of γ -linolenic and eicosapentaenoic acids by algae. *Plant Physiol.* 98: 569-572.
- Cohen, Z., Rzonejitchachawali, M., Siang-Dung, W. y Tanchard, M. 1993. Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* 5: 109-115.
- Collins, C.D. y Boylen, C.W. 1982. Physiological responses of *Anabaena variabilis* (Cyanophyceae) to instantaneous exposure to various combinations of high light intensity and temperature. *J. Phycol.* 18: 206.
- Collos, Y. 1989. A linear model of external interactions during uptake of different forms of inorganic nitrogen by microalgae. *J. Plank. Res.* 11: 521-533.
- Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. y Shah, N. (eds.). 1989. *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Longman Scientific and Technical, Essex. 341 pp.
- Dardignac-Corbeil, M.J. 1990. Traditional mussel culture. In: *Aquaculture*. Barnabé, G. (Ed.). Ellis Horwood, Chichester, pp: 285-341.

- Darley, W.M. 1982. *Algal Biology: A Physiological Approach*. Wilkinson, J.W. (ed.). Blackwell Scientifican Publication. 168 pp.
- Davies, I. y Sigee, D.C. 1984. Cell ageing and cell death: perspectives. In: *Cell Ageing and Cell Death*. Davies, I. y Sigee, D.C. (eds.). Cambridge Univ. Press. London, UK. pp: 347-350.
- De la Noüe, J. y De Pauw, N. 1988. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. **Biotech. Adv.** 6: 725-770.
- De Pauw, N. y Persoone, G. 1988. Micro-algae for aquaculture. In: *Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M.A. y Borowitzca, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 197-221.
- Dionisio, M.L., Tsuzuki, M. y Miyachi, S. 1989. Blue light induction of carbonic anhydrase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Cell Physiol.** 30: 215-219.
- Dixon, G. K. y Merrett, M.J. 1988. Bicarbonate utilization by marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. **New Phytol.** 109: 47-51.
- Droop, M.R. 1969. Algae. In: *Methods in Microbiology*. Vol 38. Academic Press. New York. pp: 269-313.
- Droop, M. R. 1975. The nutrient status of algal cells in batch cultures. **J. Mar. Biol. Ass. U.K.** 55: 541-555.
- Dubinsky, Z., Falkowski, P.G. y Wyman, K. 1986. Light harvesting and utilization by phytoplankton. **Plant Cell Physiol.** 27: 1335-1349.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Annal. Chem.** 28: 350-356.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Jeffrey, S.W. y Barret, S.M. 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 161: 115-134.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barret, S.M. y Garland, C.D. 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **J. Appl. Phycol.** 5: 71-83.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. y Castell, J.D. 1986a. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 96: 1-13.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. y Castell, J.D. 1986b. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 96: 15-26.

- Epifanio, C.E. 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effect of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* L. **Aquaculture** 18: 1-12.
- Epifanio, C.E. 1983. Phytoplankton and yeast as food for juvenile bivalves: a review of research at the University of Delaware. Proceedings of 2nd International Conference of Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. G.D. Pruder, C. Langdon y D. Conklin (eds.). Louisiana State University, Baton Rouge, LA. pp: 292-304.
- Ettl, H. 1983. *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 9: Chlorophyta I (Phytomonadina)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 807 pp.
- Fábregas, J. 1982. *Las microalgas como eslabón de infraestructura en la Microbiología Marina: aislamiento, caracterización, ciclo celular y aprovechamiento tecnológico*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 467 pp.
- Fábregas, J., Abalde, J., Cabezas, B. y Herrero, C. 1989a. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea. **Aquacult. Eng.** 8: 223-239.
- Fábregas, J., Abalde, J. y Herrero, C. 1989b. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. **Aquaculture** 83: 289-304.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Veiga, M. 1984. Growth of marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. **Aquaculture** 42: 207-215.
- Fábregas, J. y Herrero, C. 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. **Aquaculture** 51: 237-243.
- Fábregas, J. y Herrero, C. 1990. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. **J. Ind. Microbiol.** 5: 259-264.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J. y Cabezas, B. 1985a. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. **Aquaculture** 50: 1-11.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liaño, R. y Cabezas, B. 1986a. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. **Aquaculture** 53: 187-199.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Abalde, J. 1985b. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch with high nutrient concentrations. **Aquaculture** 49: 231-241.

- Fábregas, J., C. Herrero, B. Cabezas y J. Abalde. 1986b. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. **Aquaculture** 53: 101-113.
- Fábregas, J., C. Herrero, B. Cabezas, R. Liaño y J. Abalde. 1986c. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch cultures. **J. Plant. Physiol.** 125: 475-484.
- Fábregas, J., Vázquez, V., Cabezas, B. y Otero, A. 1993. Tris not only controls the pH in microalgal cultures, but also feeds bacteria. **J. Appl. Phycol.** 5: 543-545.
- Falkowski, P.G., Sukenik, A. y Herzig, R. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II. Relative abundance of chloroplast proteins. **J. Phycol.** 25: 471-478.
- Ferreiro, M.J., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., Beiras, R., Planas, M. y Fernández-Reiriz, M.J. 1990. Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimes. **Mar. Biol.** 106: 395-401.
- Flaak, A. R. y Epifanio, C.E. 1978. Dietary protein levels and growth of the oyster *Crassostrea virginica*. **Mar. Biol.** 45: 157-163.
- Flassch, J.P. 1977. L'élevage de l'ormeau *Haliotis tuberculata* L. 1. Action d'un regime alimentaire d'algues phytoplanktoniques sur le croissance post-larvaire. 3rd Meeting of the ICES working group on mariculture, actes de colloques du CNEXO 4: 287-305.
- Flynn, K.J., Garrido, J.L., Zapata, M., Öpik, H. y Hipkin, R. 1992. Changes in fatty acids, amino acids and carbon/nitrogen biomass during nitrogen starvation of ammonium and nitrate-grown *Isochrysis galbana*. **J. Appl. Phycol.** 4: 95-104.
- Flynn, K.J., Zapata, M., Garrido, J.L., Öpik, H. y Hipkin, C.R. 1993. Changes in carbon and nitrogen physiology during ammonium and nitrate nutrition and nitrogen starvation in *Isochrysis galbana*. **Eur. J. Phycol.** 28: 47-52.
- Fogg, G. E. 1956. Photosynthesis and formation of fats in a diatom. **Ann. Bot. (N. S.)** 20: 265-285.
- Fuggi, A., Martino Rigano, V. di, Vona, V. y Rigano, C. 1981. Nitrate and ammonium assimilation in algal cell-suspensions and related pH variations in the external medium, monitored by electrodes. **Plant Sci. Lett.** 23: 129-138.
- Gabbot, P.A. 1976. Energy metabolism. In: *Marine mussels. Their ecology and physiology*. Bayne, B. L. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 293-355.
- Gahan, P.B., 1984. Reversible and irreversible damage in plant cells of different ages. In: *Cell Ageing and Cell Death*. Davies, I. y Sigeo, D.C. (eds.). Cambridge Univ. Press. London, UK. pp: 155-169.

- Ganf, G.G., Stone, S.J.L. y Oliver, R.L. 1986. Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. **Aust. J. Mar. Freshw. Res.** 37: 183-197.
- Ginzburg, M. 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. **Adv. Bot. Res.** 14: 93-183.
- Gnaiger, E. y Bitterlich, G. 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. **Oecologia** 62: 289-298.
- Goldman, J.C. 1976. Phytoplankton response to wastewater nutrient enrichment in continuous culture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 23: 31-43.
- Goldman, J. C. y Ryther, J.H. 1976. Temperature-influenced species competition in mass cultures of marine phytoplankton. **Biotech. Bioeng.** XVIII: 1125-1144.
- Goldman, J.C., Yosset, A., Riley, C.B. y Dennet, M.R. 1982. The effect of pH on intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 57: 1-13.
- Goodwin, T. y Britton, G. 1988. Distribution and analysis of carotenoids. In: *Plant Pigments*. Goodwin, T.W. (Ed.). Academic Press, London. pp. 61-132.
- Greenway, H. y Setter, T.L. 1979. Accumulation of proline and sucrose during the first hours after transfer of *Chlorella emersonii* to high NaCl. **Aust. J. Plant Physiol.** 6: 69-72.
- Harris, G.P. 1978. Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton. **Ergebnisse der Limnologie** 10(i-vi): 1-171.
- Harrison, P.J., Thompson, P.A. y Calderwood, G.S. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. **J. Appl. Phycol.** 2: 45-56.
- Haug, A., Myklestad, S. y Sakshaug, E. 1973. Studies on the phytoplankton ecology of the Trondheimsfjord. I. The chemical composition of phytoplankton populations. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 11: 15-26.
- Haugland, R.P. 1992. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. 5th Edition. Laison, K.D. (ed.). Molecular Probes, Inc. Oregon, USA. pp: 421.
- Hawkins, A.J.S. y Bayne, B.L. 1991. Nutrition of marine mussels: factors influencing the relative utilizations of protein and energy. **Aquaculture** 94: 177-196.
- Herbert, D., Phipps, P.J. y Strange, R.E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. In: *Methods of Enzymology*. Vol. 58. J.R. Norris y D.W. Ribbons eds. Academic Press. pp: 209-344.
- Herrero, C. 1985. *Las microalgas marinas como una nueva fuente de proteínas, vitaminas y minerales*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 332 pp.

- Herrero, C., Abalde, J., Cabezas, B., Fábregas, J. y Regueiro, B. 1985. Isolation of diatom *Phaeodactylum tricornutum* var. *bicornutum* from Galician waters. Amino acid pattern and biological value. **Bol. Acad. Gal. Cienc.** IV: 35-39.
- Herrero, C., Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P. y Fábregas, J. 1994. Variations in the biochemical profile of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) cultured with different nutrient concentrations and urea as a nitrogen source. **Cah. Biol. Mar.** 35: 213-223.
- Herrero, C., Cid, A., Fábregas, J. y Abalde, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. **Aquacult. Eng.** 10: 99-110.
- Herrero, C., Vecino, E. y Abalde, J. 1992. The marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher): Nutritional properties and hypocholesterolemic effects. In: *Profiles on Biotechnology*. Villa, T. G. y Abalde, J. (eds.). Univ. de Santiago de Compostela, Santiago. pp. 271-288.
- Holland, D.L. y Gabbott, P.A. 1971. A micro-analytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipids and RNA levels in marine invertebrate larvae. **J. Mar. Biol. Ass. U. K.** 51: 659-668
- Hollibaugh, J.T., Steibert, D.L.R. y Thomas, W.H. 1981. Observations on the survival and germination of resting spores of three *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species. **F. Phycol.** 17: 1-9.
- Huber, M.E. y Lewin, R.A. 1986. An electrophoretic survey of the genus *Tetraselmis* (Chlorophyta, Prasinophyceae). **Phycologia** 25: 205-209.
- Huppe, H.C. y Turpin, D.H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 45: 577-607.
- Inouye, I. 1993. Flagella and flagellar apparatuses of algae. In: *Ultrastructure of Microalgae*. Berner, T. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 99-134.
- Jeffrey, S.W. y Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochem. Physiol. Pflanz.** 167: 191-194.
- Jensen, R.G. 1990. Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase: mechanisms, activation and regulation. In: *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dennis, D.T. y Turpin, D.H. (eds.). Longman Scientific & Technical, Essex. pp. 224-238.
- Jorgensen, C. B. 1990. *Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology*. Olsen and Olsen eds., Fredensborg, Denmark. 140 pp.
- Kanazawa, A., Teshima, S. y Imai, K. 1980. Biosynthesis of fatty acids in *Tilapia zillii* and the puffer fish. **Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.** 29: 313-318.

- Kanazawa, A., Teshima, S. y Kazuo, O. 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. **Comp. Biochem. Physiol.** 63B: 295-298.
- Kaplan, D., Cohen, Z. y Abeliovich, A. 1986a. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. **Biomass** 9: 37-48.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. y Aaronson, S. 1986b. Algal nutrition. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.). CRC Press. Florida. pp: 147-197.
- Kochert, G. 1978a. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. En: *Handbook of Phycological Methods. Vol. 2. Physiological and Biochemical Methods*. Hellebust, J.A. y Craigie, J.S. (eds.). Cambridge Univ. Press. pp: 95-97.
- Kochert, G. 1978b. Quantitation of macromolecular components of microalgae. In: *Handbook of Phycological Methods. Vol. 2. Physiological and Biochemical Methods*. Hellebust, J.A. y Craigie, J.S. (eds.). Cambridge Univ. Press. pp: 189-195.
- Köhler, K., Steigner, W., Kolbowski, J., Hansen, U.P., Simonis, W. y Urbach, W. 1986. Potassium channels in *Eremosphaera viridis*. II. Current- and voltage-clamp experiments. *Planta* 167: 66-75.
- Konopka, A. y Schnur, M. 1980. Effect of light intensity on macromolecular synthesis in cyanobacteria. **Microbial. Ecol.** 6: 291-301.
- Kowallik, W. 1987. Blue light effects on carbohydrate and protein metabolism. In: *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*. Vol. I. Senger, H. (ed.). CRC Press, Florida. pp. 7-16.
- Kuhl, A. 1974. Phosphorus. In: *Algal Physiology and Biochemistry*. Stewart, W.D.P. (ed.). Blackwell Scientific, Oxford. pp: 636.
- Kurkdjian, A. y Guern, J. 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 40: 271- 303.
- Laing, I. y Ayala, F. 1990. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. In: *Introduction to Applied Phycology*, Akatsuka, I. (ed.). SPB Academic Publishing by, The Hague. pp. 447-478.
- Laing, I. y Helm, M.M. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch in 200 l vessels. **Aquaculture** 22: 137-148.
- Laing, I. y Jones, E. 1983. Large-scale turbidostat culture of marine microalgae. **Aquacult. Eng.** 2: 203-212.
- Laing, I. y Millican, P.F. 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. **Aquaculture** 54: 245-262.

- Laing, I. y Utting, S.D. 1980. The influence of salinity in the production of two commercially important unicellular algae. **Aquaculture** 21: 79-86.
- Landymore, A. F. y Antia, N.J. 1977. Growth of a marine diatom and an Haptophycean alga on phenilalanine or tyrosine serving as the sole nitrogen source. **J. Phycol.** 13. 231-238.
- Langdon, C.J. y Waldo, M.J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition fo *Crassostrea gigas* spat. **J. mar. Biol. Ass. U.K.** 61: 431-448.
- Lara, C. 1992. Photosynthetic nitrogen assimilation: interactions with CO₂ fixation. In: *Trends in Photosynthesis Research*. Barber, J., Guerrero, M.G. y Medrano, H. (eds.). Intercept, Andover. pp. 195-208.
- Lara, C., Romero, J.M., Coronil, T. y Guerrero, M.G. 1987. Interactions between photosynthetic nitrate assimilation and CO₂ fixation in cyanobacteria. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ullrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. y Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 45-52.
- Leadbeater, B.S.C. y Green, J. 1993. Cell coverings of microalgae. In: *Ultrastructure of Microalgae*. Berner, T. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 71-98.
- Leftley, J. W. y P. J. Syrett. 1973. Urease and ATP: urea amidolyase activity in unicellular algae. **J. gen. Microbiol.** 77: 109-115.
- Lepage, G. y Roy, C.C. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. **J. Lipid Res.** 25: 1391-1396.
- Levasseur, M., Thompson, P.A. y Harrison, P.J. 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. **J. Phycol.** 29: 587-595.
- Liaño, R., Abalde, J., Cabezas, B. y Vecino, E. 1987. Cultivos estáticos de la microalga marina *Tetraselmis suecica* con distintas fuentes y concentraciones de nitrógeno. **Cuad. Marisq. Publ. Técn.** 12: 477-482.
- Lin, R.I. y Schjeide, O.A. 1969. Micro-estimation of RNA by the cupric catalyzed orcinol reaction. **Anal. Biochem.** 27: 473-83.
- Lips, S.H. y Avissar, Y.J. 1986. Photosynthesis and ultrastructure in microalgae. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.). CRC Press. Florida. pp: 43-67.
- Livne, A. y Sukenik, A. 1992. Lipid synthesis and abundance of acetyl CoA carboxylase in *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) following nitrogen starvation. **Plant Cell Physiol.** 33: 1175-1181.

- López-Alonso, D., Molina-Grima, E., Sánchez-Pérez, J.A., García-Sánchez, J.L. y García-Camacho, F. 1992. Isolation of clones of *Isocrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid. **Aquaculture** 102: 363-371.
- Losada, M., Hervás, M. y Ortega, J.M. 1987. Photosynthetic assimilation of the primordial bioelements. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ullrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. y Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 3-15.
- Macdonald, F.D. y Buchanan, B.B. 1990. The reductive pentose phosphate pathway and its regulation. In *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dennis, D.T. y Turpin, D.H. (eds.). Longman Scientific & Technical, Essex. pp. 239-252.
- Madariaga, I. de, y Joint, I. 1992. A comparative study of phytoplankton physiological indicators. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 158: 149-165.
- Maldonado, J.M. y Aparicio, P.J. 1987. Photoregulation of nitrate assimilation in eukariotic organisms. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ullrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. y Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 76-81.
- Mariño, J., Pérez, A. y Roman, G. 1983. El cultivo del mejillón (*Mytilus edulis* L.) en la Ría de Arousa. **Bol. Inst. Esp. Oceanogr.** No. 350. 10 pp.
- Marsh, J.B. y Weinstein, D.B. 1966. Simple charring method for determination of lipids. **J. Lipid Res.** 7: 574-576.
- Martínez-Expósito, M.J., Pasantes, J.J. y Méndez, J. 1994. Proliferation kinetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) gill cells. **Mar. Biol.** 120: 41-45.
- McCarthy, J.J. 1980. Nitrogen. In: *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. Morris, I. (Ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 191-234.
- McCarthy, J.J. y Goldman, J.C. 1979. Nitrogenous nutrition of marine phytoplankton in nutrient-depleted waters. **Science**, 203: 670-672.
- McLachlan, 1973. Growth media-marine. In: *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Stein, J.R. (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 25-52.
- Milton, J.S. y Tsokos, J.O. 1983. *Statistical Methods in the Biological and Health Sciences*. McGraw-Hill.
- Miyachi, S., Kuchitsu, K. y Yagawa, Y. 1987. Responses of microalgae to changes in CO₂ concentration. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ullrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. y Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 16-21.
- Moal, J., Martin-Jezequel, V., Harris, R.P., Samain, J.-F. y Poulet, S.A. 1977. Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. **Oceanol. Acta** 10: 339-346.

- Molloy, C.J. y Syrett, P.J. 1988. Interrelationships between uptake of urea and uptake of ammonium by microalgae. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 118: 85-95.
- Molina, E., Martínez, M.E., Sánchez, S., García, F. y Contreras, A. 1991. Growth and biochemical composition with emphasis on the fatty acids of *Tetraselmis* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 21-25.
- Molina-Grima, E., Sánchez-Pérez, J.A., García-Sánchez, J.L., García-Camacho, F. y López-Alonso, D. 1992. EPA from *Isochrysis galbana*. growth conditions and productivity. **Proc. Biochem.** 27: 299-305.
- Morris, I. 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. In: *Algal Physiology and Biochemistry*. Steward, W.D.P. (ed.). Blackwell Scientific Publications. pp: 583-609.
- Morrison, K. A., Thérien, N. y Marcos, B. 1987. Comparison of six models for nutrient limitations on phytoplankton growth. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 44: 1278-1288.
- Mostert, E.S. y Grobbelaar, J.U. 1987. The influence of nitrogen and phosphorus on algal growth and quality in outdoor mass algal cultures. **Biomass** 13: 219-233.
- Mourente, G. Lubián, L.M. y Odriozola, J.M. 1990. Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. **Hydrobiologia** 203: 147-154.
- Myers, J. 1980. On the algae: thoughts about physiology and measurements of efficiency. In: *Primary Productivity in the Sea*. Falkowski, P.G. (Ed.). Plenum Press, New York. pp. 1-16.
- Myklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I: Comparison of nine different species in culture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 9: 125-136.
- Myklestad, S. 1988. Production, chemical structure, metabolism, and biological function of the (1 → 3)-linked, β-D-glucans in diatoms. **Biol. Oceanogr.** 6: 313-326.
- Myklestad, S. y Haug, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of concentration of nutrients in the culture medium. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 9: 125-136.
- Nalewajko, C. y Lean, D.R.S. 1980. Phosphorus. In: *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. Morris, I. (Ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 235-258.
- Nelson, J.R., Guarda, S., Cowell, L.E. y Hefferman, P.B. 1992. Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30 °C. **Aquaculture** 106: 357-377.
- Nielsen, M.V. 1988. The effect of temperature on the shell-length growth of juvenile *Mytilus edulis* L. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 123: 227-234.

- Ninnemann, H. 1987. Photoregulation of eukaryotic nitrate reductase. In: *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*. Vol. I. Senger, H. (ed.). CRC Press, Florida. pp. 17-30.
- Ojeda, A. y Afonso, A. 1986. Estudio comparativo del crecimiento y composición química de tres especies fitoplanctónicas utilizando cuatro fuentes de nitrógeno. *Inf. Tec. Ins. Esp. Oceanogr.* n° 45. 11 pp.
- Oliveira, L. y Antia, N.J. 1984. Evidence of nickel ion requirement for autotrophic growth of a marine diatom with urea serving as nitrogen source. *Br. Phycol. J.* 19: 125-134.
- Oliveira, L. y Antia, N.J. 1986. Nickel ion requirements for autotrophic growth of several microalgae with urea serving as nitrogen source. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 2427-2433.
- Oliveira, L., Bisalputra, T. y Antia, N.J. 1980. Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. *New Phytologist* 85: 385-392.
- Parsons, T.R. y Strickland, J.D.H. 1965. Particulate organic matter. III. I. Pigment analysis. III. II. Determination of phytoplankton pigments. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 18: 117-127.
- Penning de Vries, F.W.T. 1975. The cost of maintenance processes in plant cells. *Ann. Bot.* 39: 77-92.
- Pérez, A. y Roman, G. 1979. Estudio del mejillón y su epifauna en los cultivos flotantes de la Ría de Arousa. II. Crecimiento, mortalidad y producción del mejillón. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 5(267): 23-41.
- Persoone, G. y Claus, C. 1980. Mass culture of algae: a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. In: *Algae Biomass. Production and Use*. Shelef, G. y Soeder, C.J. (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp. 265-285.
- Preisig, H.R. 1992. Morphology and Taxonomy. In: *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. Avron, M. y Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Press, Boca Raton. pp. 1-16.
- Prezelin, B.B. 1982. Effects of light intensity on aging of the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Mar. Biol.* 69: 129-135.
- Price, N.M. y Harrison, P.J. 1988. Uptake of urea C and urea N by the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. Oceanogr.* 33: 528-537.
- Pruder, G.D. 1983. Biological control of gas exchange in intensive aquatic production systems. *Journal of the Institute Electrical and Electronics Engineers.* pp. 1002-1004.
- Raven, J. A. 1988. Limits to growth. In: *Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 331-356.

- Rees, T.A.V. y Bekheet, I.A. 1982. The role of the nickel in urea assimilation. **Planta** 156: 385.
- Regan, D.L. 1988. Other micro-algae. In: *Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M.A. y Borowitzca, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 122-150.
- Rhee, G.-Y. 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. **Limnol. Oceanogr.** 23: 10-25.
- Ricard, M. 1987. *Atlas du phytoplancton marin*. Vol. 2: *Diatomophycées*. Editions du CNRS, Paris. 297 pp.
- Rice, M.A. y Pechenik, J.A. 1992. A review of the factors influencing the growth of the norther quahog, *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). **J. Shellfish Res.** 11: 279-287.
- Richmond, A. 1986a. Cell response to enviromental factors. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.). CRC Press. Florida. pp: 69-99.
- Richmond, A. 1986b. Microalgaculture. **CRC Crit. Rev. Biotech.** 4(4): 369-438.
- Ricker, W.E. 1973. Linear Regression in fisheries research. **J. Fish. Res. Board. Can.** 30: 409-434.
- Riisgard, H.V. 1991. Filtration rate and growth in the blue mussel, *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758: Dependence on algal concentration. **J. Shell. Res.** 10: 29-35.
- Riisgard, H.V. y Randlöv, A. 1981. Energy budgets, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. **Mar. Biol.** 61: 227-234.
- Rines, J.E.B. y Hargraves, P.E. 1989. *The Chaetoceros Ehrenberg (Bacillariophyceae) Flora of Narragansett Bay, Rhode Island, U.S.A.* J. Cramer Ed., Berlín. pp. 97-102.
- Romero, J.M. y Lara, C. 1987. Photosynthetic assimilation of NO_3^- by intact cells of cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Influence of NO_3^- and NH_4^+ assimilation on CO_2 fixation. **Plant Physiol.** 83: 208-212.
- Roy, S. 1987. High performance liquid chromatographic analysis of chloropigments. **J. Chromatogr.** 391: 19-34.
- Roy, S. 1988. Effects of the changes in physiological condition on HPLC-defined chloropigment composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin) in batch and turbidostat cultures. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 118: 137-149.
- Ryther, J. H. y Dunstan, W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. **Science** 171: 1008-1013.
- Sakshaug, E., Andersen, K. y Kiefer, D.A. 1989. A steady state description of growth and light absorption in the marine planktonic diatom *Skeletonema costatum*. **Limnol. Oceanogr.** 34: 198-205.

- Sakshaug, E., Andersen, K., Mykkestad, S. y Olsen, Y. 1983. Nutrient status of phytoplankton communities in Norwegian waters (marine, brackish, and fresh) as revealed by their chemical composition. **J. Plankton Res.** 5: 175-196.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y Voltolina, D. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. **Comp. Biochem. Physiol.** 107B: 39-44.
- Schanz, F. y Zahler, U. 1981. Prediction of algal growth in batch cultures. **Schweiz. Z. Hydrol.** 43: 103-113.
- Shamsudin, L. 1992. Lipid and fatty acid composition of microalgae used in Malaysian aquaculture as live food for the early stage of penaid larvae. **J. Appl. Phycol.** 4: 371-378.
- Shelef, G. y Soeder, C. J. (eds.) 1980. *Algae Biomass. Production and Use*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. Preface, pp: VII-XI.
- Shifrin, N.S. y Crisholm, S.W. 1980. Phytoplankton lipids: enviromental influences on production and possible commercial aplications. In: *Algae Biomass. Production and Use*. Shelef, G. and Soeder, C.J. (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp: 627-646.
- Shifrin, N.S. y Chisholm, S.W. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. **J. Phycol.** 17: 374-384.
- Siron, R., Giusti, G. y Berland, B. 1989. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorntutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus defficiency. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 55: 95-100.
- Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. 1989. *Statistical Methods*. 8th edition. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 503 pp.
- Sriharan, S., Bagga, D. y Sriharan, T.P. 1989. Enviromental control of lipids and fatty acid production in the diatom *Navicula saprophila*. **Appl. Biochem. Biotech.** 20/21: 281-291.
- Stauber, J.L. y Jeffrey, S.W. 1988. Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. **J. Phycol.** 24: 158-172.
- Strickland, J.D.H. y Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. **2nd edn. Bull. Fish. Res. Bd. Can.** n°. 167. 310 pp.
- Strömngren, T. y Cary, C. 1984. Growth in length of *Mytilus edulis* L. fed on different algal diets. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 76: 23-34.
- Sukenik, A., Bennett, J. y Falkowski, P. 1988. Changes in the abundance of individual apoproteins of light-harvesting chlorophyll *a* / *b*-protein complexes of photosystem I and II with growth irradiance in the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. **Biochem. Biophys. Acta** 932: 206-215.

- Sukenik, A. y Livne, A. 1991. Variations in lipid and fatty acid content in relation to acetyl CoA carboxylase in the marine prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. **Plant Cell. Physiol.** 32: 371-378.
- Sukenik, A. y Wahnon, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. **Aquaculture** 97: 61-72.
- Syrett, P.J. 1987. Nitrogen assimilation by eukariotic algae. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ullrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. y Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 25-31.
- Syrett, P.J. 1988. Uptake and utilization of nitrogen compounds. In: *Biochemistry of the Algae and Cyanacteria*, Rogers, L.J. y Gallon, J.R. (eds.). Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford. pp. 23-46.
- Syrett, P.J. y Peplinska, A.M. 1988. The effect of nickel and nitrogen deprivation on the metabolism of urea by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Br. Phycol. J.** 23: 387-390.
- Tadros, M.G. y Johansen, J.R. 1988. Physiological characterization of six lipid-producing diatoms from the southeastern United States. **J. Phycol.** 24: 445-452.
- Thompson, P.A., Harrison, P.J. y Whyte, J.N. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. **J. Phycol.** 26: 278-288.
- Thompson, P.A., Guo, M., Harrison, P.J. 1992a. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **J. Phycol.** 28: 481-488.
- Thompson, P.A., Guo, M., Harrison, P.J. 1992b. Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. **J. Phycol.** 28: 488-497.
- Thompson, P.A. y Harrison, P.J. 1992. Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. **Mar. Biol.** 113: 645-654.
- Thompson, P.A., Harrison, P.J. y Parslow, J.S. 1991. Influence of irradiance on cell volume and carbon quota for ten species of marine phytoplankton. **J. Phycol.** 27: 351-360.
- Tischner, R. 1987. Regulation of ammonium incorporation. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ullrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. y Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 126-131.
- Tromballa, H.W. 1987. Base uptake, K⁺ transport and intracellular pH regulation by the green alga *Chlorella fusca*. **Biochim. Biophys. Acta** 904: 216-226.
- Tsuzuki, M. 1983. Mode of HCO₃⁻ utilization by the cells of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under ordinary air. **Z. Pflanzenphysiol.** 110(1): 29.

- Turley, C.M. 1985. Biological studies in the vicinity of a shallow-sea tidal mixing front. IV. Seasonal and spatial distribution of urea and its uptake by phytoplankton. **Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.** 310: 471-500.
- Turpin, D.H. y Weger, H.G. 1990. Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation. In: *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dennis, D.T. y Turpin, D.H. (eds.). Longman Scientific y Technical, Singapore. pp. 422-433.
- Ukeles, R. 1980. American experience in the mass culture of microalgae for feeding larvae of the American oyster *Crassostrea virginica*. In: *Algae Biomass. Production and Use*. G. Shelef and C.J. Soeder eds. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp: 287-306.
- Ullrich, W.R. 1987. Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: mechanism and relationship with nitrate metabolism. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ullrich, W.R., Aparicio, P J., Syrett, P.J. y Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 32-38.
- Uriarte, I., Farias, A., Hawkins, A.J.S. y Bayne, B.L. 1993. Cell characteristics and biochemical composition of *Dunaliella primolecta* Butcher conditioned at different concentrations of dissolved nitrogen. **J. Appl. Phycol.** 5: 447-453.
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular algae of commercial importance. **Aquacult. Eng.** 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.
- Veloso, V., Reis, A., Gouveia, L., Fernandes, H.L., Empis, J.A. y Novais, J. 1991. Lipid production by *Phaeodactylum tricornutum*. **Biores. Technol.** 38: 115-119.
- Venkataraman, L.V. 1983. *Blue-green Alga Spirulina*. Department of Science and Technology, India. CFTRI Press. Mysore. 100 pp.
- Venkataraman, L.V. y Nigan, B.P. 1979. Mass culturing of freshwater algae for utilization as a protein source. **Phykos** 18: 83-95.
- Vissier, J.W.M., Jongeling, A.A.M. y Tanke, H.J. 1979. Intracellular pH determination by fluorescence measurements. **J. Histochem. Cytochem.** 27: 32-35.
- 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: 219-240.
- Vonshak, A. 1986. Laboratory Techniques for the cultivation of microalgae. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.). CRC Press. Florida. pp: 117-145.

- Walne, P.R. 1970. Studies on the food value of 19 genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. **Fish. Invest. Min. Agric. Fish. Food (G.B.)**. Ser. II 25. 62 pp.
- Ward, J.E. y Targett, N.M. 1989. Influence of marine microalgal metabolites on the feeding behavior of the blue mussel *Mytilus edulis*. **Mar. Biol.** 101: 313-321.
- Webb, K. L. y Chu, R.-L.E. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Pruder, G.D., Langdon, C. and Conklin, D. (eds.). Louisiana State University, Baton Rouge, L.A. pp: 272-291.
- Werner, D. 1970. Productivity studies on diatom cultures. **Helgol. Wiss. Meeresunters.** 20: 97-103.
- Wikfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. **Aquaculture** 59: 1-14.
- Wikfors, G.H., Ferris, G.E. y Smith, B.C. 1992. The relationship between gross biochemical composition of cultured algal foods and growth of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* (L.). **Aquaculture** 108: 135-154.
- Wikfors, G.H. y Patterson, G.W. 1994. Differences in strains of *Isochrysis* of importance to mariculture. **Aquaculture** 123: 127-135.
- Wikfors, G.H., Twarog, J.W., Jr. y Ukeles, R. 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. **Biol. Bull.** 167: 251-263.
- Wilhelm, C. y Manns, L. 1991. Changes in pigmentation of phytoplankton species during growth and stationary phase - consequences for reliability of pigment-based methods of biomass determination. **J. Appl. Phycol.** 3: 305-310.
- Wilson, J.H. 1978. The food value of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to the larvae of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunberg. **Aquaculture** 13: 313-323.
- Witt, U., Koske, P.H., Kuhlmann, D., Lenz, J. y Nellen, W. 1981. Production of *Nannochloris* sp. (Chlorophyceae) in large-scale outdoors tanks and its use as a food organism in marine aquaculture. **Aquaculture** 23: 171-181.
- Wynne, D. y Rhee, G.Y. 1986. Effects of light intensity and quality on the relative N and P requirement (the optimum N:P ratio) of marine planktonic algae. **J. Plankton Res.** 8: 91-103.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjorland, T., Repeta, D. y Welschmeyer, N. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 77: 183-196.

- Xu, C., Auger, J. y Godvindjee. 1990. Chlorophyll *a* fluorescence measurements of isolated spinach thylakoids obtained by using single-laser-based flow cytometry. **Cytometry** 11: 349-358.
- Yongmanitchai, W. y Ward, O.P. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. **Appl. Envir. Microbiol.** 57(2): 419-425.
- Yúfera, M. y Lubián, L.M. 1990. Effects of microalgal diet on growth development of invertebrates in marine aquaculture. In: *Introduction to Applied Phycology*. Akatsuka, I. (ed.). SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands. pp: 209-227.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700744481