



**UNIVERSIDADE
DA CORUÑA**

**MICROALGAS:
Cultivo y
Aplicaciones**

**J. ABALDE
A. CID
P. FIDALGO
E. TORRES
C. HERRERO**



Microalgas:
Cultivo y Aplicaciones

**Julio Abalde, Angeles Cid, J.Pablo Fidalgo,
Enrique Torres y Concepción Herrero**

Laboratorio de Microbiología
Departamento de Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad de La Coruña

DOI: <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>



Esta obra se publica bajo una licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional
(CC BY-NC-SA 4.0)

PORTADA:

Diatomeas

(foto de Jaime Fabregas)

MONOGRAFÍAS N° 26

EDICIÓN:

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

SERVICIO DE PUBLICACIÓNS

© DE ESTA EDICIÓN

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Imprime: TÓRCULO

Plza. Maestro Mateo, 9 Bajo

A Coruña

I.S.B.N.: 978-84-97497-69-5 (electrónico)

I.S.B.N.: 84-88301-84-7 (impreso)

Dep. Leg.: 878-95

INDICE

MICROALGAS: CULTIVO Y APLICACIONES

1.- INTRODUCCIÓN	9
2.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS	13
3.- PARÁMETROS DE CULTIVO	19
Luz	21
Intensidad	21
Fotoinhibición	23
Fotoperiodo	25
Longitud de onda	27
Fuentes de luz	28
Artificial	29
Natural	30
Temperatura	32
pH	37
Salinidad	40
Agitación	42
Evaporación y precipitación	46
Tamaño de inóculo y densidad de población óptima	47
Nutrientes	48
Fuente de carbono	51
Carbono orgánico	52
Nitrógeno	53
Otros nutrientes	57
Medios de cultivo	58
Contaminación	60
1.- Algas indeseables	60
2.- Mohos, levaduras y hongos	61
3.- Bacterias	62
4.- Zooplancton	62
5.- Insectos	63
6.- Otros contaminantes	63

4.- ESPECIES UTILIZADAS Y CRITERIOS DE SELECCIÓN	65
Microalgas de interés económico	66
Otras microalgas de potencial interés económico.	70
Selección de cepas	70
Manipulación genética de cepas	72
5.- SISTEMAS DE CULTIVO Y RECOGIDA	75
Especies cultivadas	75
Disponibilidad de especies	75
Técnicas de aislamiento	76
Aislamiento con micropipetas	76
Métodos basados en tactismos	76
Diluciones seriadas	77
Aislamiento en placa	77
Mantenimiento de las especies	78
Tipos de cultivo	79
Tipo de población	79
Tipo de inóculo	79
Fase fisiológica de la población	80
Sistemas de cultivo	80
Cultivos discontinuos ("batch")	81
Cultivo semi-continuo	81
Cultivo continuo	81
Escalación y manejo de los cultivos de microalgas	85
Obtención de la biomasa microalgal. Métodos de recogida y secado	90
6.- COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA	93
Composición bruta	94
Proteína	94
Aminoácidos	96
Carbohidratos	98
Lípidos	99
Acidos grasos	101
Glicerol	105
Pigmentos fotosintéticos	106
Clorofilas	107
Carotenoides	107
Ficobilinas	108
Acidos nucleicos	109
Minerales	109

Vitaminas	110
Variabilidad bioquímica	111
Luz	111
Longitud de onda	114
Variaciones diarias	115
Temperatura	116
Salinidad	116
Nutrientes	116
Nitrógeno	117
Fuente de nitrógeno	121
Carbono	124
7.- MICROALGAS EN NUTRICIÓN ANIMAL	125
Estudios nutricionales	125
Grado de eficiencia proteica (PER)	127
FER (Índice de transformación)	127
Valor biológico (BV)	128
Coeficiente de digestibilidad (DC)	128
Utilización neta de proteína (NPU)	128
Nutrición en aminoácidos	129
Calidad proteínica (CS)	129
Índice de aminoácidos esenciales (EAA)	129
Evaluaciones nutricionales	130
Estudios metabólicos	130
Estudios de regeneración de proteínas	133
Estudios de digestibilidad	135
Estudios de suplementación	136
Estudios toxicológicos	138
Toxinas biogénicas:	138
Toxinas no biogénicas:	140
Estudios toxicológicos con animales	141
Microalgas en alimentación de aves de corral, cerdos y rumiantes	144
Aves de corral	144
Cerdos	146
Rumiantes	147
Microalgas marinas	148

8.- MICROALGAS EN ACUICULTURA	151
Capacidad nutritiva	152
Selección de cepas para acuicultura	152
Especies más utilizadas en acuicultura	159
Aplicaciones	161
Cultivo de moluscos	161
Artemia	164
Cultivo	167
Rotíferos	169
Copépodos	170
9.- OTRAS APLICACIONES	173
Posibles usos terapeuticos de las microalgas	174
Efecto de hipocolesterolemia	174
Comidas naturales o dietéticas a base de microalgas	175
Fuente de b-caroteno	176
Tratamiento de heridas	176
Tratamiento del cáncer con ficocianina	176
Experiencias con el virus del SIDA	177
Protección anticancerígena por β -caroteno	177
Acido g-linolénico (GLA) y estimulación de prostaglandinas	177
Productos de interés	177
Pigmentos	177
Acidos grasos	178
Hidrocarburos, ceras y esteroles	178
Polisacáridos	178
Enzimas	179
Amonio y aminoácidos	179
Biofloculantes	179
Antibióticos y vitaminas	180
Microalgas como fuente de energía	180
Biofertilizantes	181
Tratamiento de aguas residuales	181
10.- BIBLIOGRAFÍA	183

I.- Introducción

Los microorganismos fotosintéticos se agruparon en principio en dos categorías: bacterias fotosintéticas y microalgas. Las bacterias fotosintéticas realizan fotosíntesis anoxygenica y poseen bacterioclorofila, químicamente diferente de la clorofila *a* presente en los otros organismos fotosintéticos (algas y plantas superiores). Las algas “verde-azules” ocupan una posición intermedia entre las bacterias fotosintéticas y las algas eucariotas; no poseen bacterioclorofila, sino clorofila *a*, y realizan fotosíntesis oxigenica. Sin embargo, su estructura celular procariota (pared celular, ribosomas y ácido nucleico), las sitúa taxonómicamente dentro del grupo de las bacterias (Reino Procaryotae), con la denominación de cianobacterias (Staley *et al.*, 1989).

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 oxigenica. En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules, procariotas, se han considerado tradicionalmente dentro del grupo de las microalgas. De hecho, algunas de estas cianobacterias, como es el caso de *Spirulina*, suponen una de las principales contribuciones de la biotecnología microalgal (Rodríguez y Guerrero, 1992). Por tanto, el término microalgas no tiene sentido taxonómico alguno y dentro del mismo se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos: cianobacterias que tienen estructura celular procariota, y las restantes microalgas con estructura celular eucariota.

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 (Dodge, 1973; Berner, 1993). La célula contiene: un núcleo con el material genético en

cromosomas, además de tener DNA en mitocondrias y cloroplastos; mitocondrias, donde se localizan los enzimas respiratorios del ciclo de Krebs; cloroplastos donde están los pigmentos fotosintéticos y la maquinaria que acompaña a los fotosistemas (PS I y II) (Whatley, 1993); ribosomas 80S y 70S; aparato de Golgi, implicado fundamentalmente en el transporte intracelular y en la excreción de productos exocelulares; retículo endoplasmático que atraviesa el citoplasma con funciones de síntesis y transporte; lisosomas y otros cuerpos con enzimas digestivos o maquinaria de peroxidación; vacuolas; gránulos de reserva (gotas de aceite, gránulos de almidón, etc.); microtúbulos y microfibrillas para soporte estructural y guía de movimientos intracelulares; y cuerpos basales o centriolos para la producción de flagelos o husos mitóticos (Inouye, 1993). Orgánulos característicos de las microalgas son el pirenoide y la mancha ocular, aunque no están presentes en todas las especies. El pirenoide está asociado siempre al cloroplasto, es de naturaleza proteica y se cree que interviene en la conversión y translocación de grupos fotosintéticos en el cloroplasto, siendo el sitio de concentración de enzimas y sustratos para estas funciones. La mancha ocular es un fotorreceptor primitivo; su posición es característica en cada especie y puede estar asociada al flagelo y/o al cloroplasto. Muchos flagelados dulceacuículas contienen vacuolas contráctiles para el control de la presión osmótica (Aaronson, 1993), aunque este no es el único mecanismo de osmorregulación en microalgas, ya que pueden acumular diferentes sustancias, como glicerol, galactosil glicéridos, manitol o prolina, en función de la salinidad. Algunas microalgas están rodeadas solamente por la membrana plasmática, que puede estar envuelta en mucílago, pero la mayoría de las microalgas están rodeadas de pared celular. La forma y composición de la pared celular es muy variable (Leadbeather y Green, 1993). Puede consistir de una o más piezas, e incluso algunas células llevan cuerpos calcificados conocidos como cocolitos. En cuanto a la composición, los componentes más comunes son celulosa, sílice, carbonato cálcico o proteína.

Las cianobacterias son mucho más simples que las anteriores. Pueden aparecer como células individuales, aunque son frecuentes las formas filamentosas. Aunque su organización celular es procariota, estructuralmente son mucho más complejas que la mayoría de las bacterias. Poseen una región central, donde se localiza el ácido nucleico (sólo 1 molécula de DNA), una región periférica, que contiene las membranas tilacoidales y varias inclusiones o estructuras citoplasmáticas, y una envoltura externa, compuesta de membrana citoplasmática y pared celular característica, rodeada frecuentemente de una capa de mucílago. La pared celular contiene peptidoglucano y la estructura y composición características de las bacterias Gram-negativas. En el citoplasma se encuentran las inclusiones (gránulos de polifosfato, glucógeno y cianoficina), los carboxisomas o

cuerpos poliédricos, donde está la RBP-carboxilasa, y ribosomas 70S; algunas tienen vacuolas de gas. La intensidad de luz parece regular la formación de vacuolas de gas, colapsándose éstas cuando la iluminación es alta. En muchas especies de cianobacterias las células vegetativas pueden diferenciarse en células estructural y funcionalmente distintas, formándose así los heterocistos, especializados en la fijación del nitrógeno molecular, y los acinetos, formas de resistencia (esporas) capaces de sobrevivir en condiciones subóptimas (Jensen, 1993).

Pese a las grandes diferencias estructurales, fisiológicamente ambos tipos de microalgas son similares, con un metabolismo fotosintético similar al de las plantas superiores.

La reproducción es generalmente por división binaria, con tiempos de duplicación de 1 h o menos para los procariotas (cianobacterias), pero de 8 a 24 h o más para los eucariotas (Taylor, 1980). Muchas tienden a dividirse en un momento particular del ciclo día-noche (Sournia, 1974). Algunos grupos presentan un ritmo de división natural más marcado que otros grupos. Las diatomeas pueden dividirse durante el periodo de luz o de oscuridad, lo que puede estar influenciado por la temperatura (Smayda, 1975). Las especies que se dividen durante el periodo de oscuridad sintetizan el material celular durante el periodo de luz, mientras que en la fase de oscuridad llevan a cabo diferentes reacciones relacionadas con la división celular.

La reproducción sexual tiene lugar con una frecuencia variable en las microalgas, aunque siempre es menos frecuente que la reproducción asexual (Taylor, 1980). Se desconoce en algunos grupos, pero está bien estudiada en algas verdes y diatomeas. Posiblemente sea más común de lo que parece, pero es muy difícil reconocerla en numerosas especies, particularmente en el caso de los flagelados, donde los gametos no son notablemente diferentes a las células normales. No existe en cianobacterias.

Numerosas especies microalgales son capaces de producir formas latentes, además de los acinetos de cianobacterias, que les permiten sobrevivir durante periodos desfavorables (Taylor, 1980). Los cistes pueden formarse por procesos sexuales o asexuales y pueden formarse más de un tipo de ellos durante el ciclo vital, como por ejemplo en el caso de la diatomea *Chaetoceros* (Hollibaugh *et al.*, 1981).

2.- Antecedentes históricos

El estudio científico de las microalgas comienza en 1890, cuando el microbiólogo holandés Beijerinck establece cultivos puros de una microalga de agua dulce: *Chlorella vulgaris*. Algo más tarde Otto Warburg (1919) consiguió en laboratorio cultivos densos de *Chlorella*, e introdujo la idea de utilizar estos cultivos como una herramienta de trabajo en el estudio de la fotosíntesis. Estos cultivos y otros de otras especies o tipos de microalgas fueron estudiados por numerosos investigadores, observándose que bajo condiciones de cultivo adecuadas y, especialmente, a intensidad de luz de saturación eran mucho más productivos que las plantas superiores o las células fotoautotróficas aisladas de las mismas (Soeder, 1980).

El concepto de producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la II Guerra Mundial, dirigido a la producción de lípidos, para lo que se utilizaron las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Nitzschia palea* (Harder & Von Witsch, 1942).

Después de la II Guerra Mundial comenzó a considerarse la biomasa microalgal como un suplemento importante e, incluso, capaz de reemplazar a las proteínas animales o vegetales convencionales para consumo directo del ganado o del hombre, acortando la ineficiente cadena alimenticia proteica. Así, a partir de 1948, un grupo de científicos en la Carnegie Institution de Washington establecen los fundamentos científicos del cultivo masivo de microalgas, publicados en el ya clásico trabajo de Burlew (1953). El objetivo de este proyecto era utilizar el alga verde *Chlorella* para la producción a gran escala de alimento. El trabajo de Spoehr y Milner (1949), también en el Carnegie Institute, mostró que la composición de *Chlorella*, sobre todo su contenido en grasa y proteína, podía ser manipulada variando las condiciones del medio.

Spoehr y Milner sugieren asimismo que la utilización de la proteína microalgal podría ayudar a evitar, al menos en parte, la deficiencia proteica global. La base para este optimismo es que las microalgas tienen un contenido en proteína bruta de aproximadamente el 50% y una productividad del orden de 25 Tm/Ha/año. Desde este momento distintas microalgas de agua dulce, como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Coelastrum* y *Spirulina*, entre otras, han sido propuestas como fuente de proteína.

Entre tanto, en una leprosería de Venezuela, Jorgensen y Convit (1953) comenzaron en 1940 a concentrar *Chlorella* de una charca eutrófica que tenía un bloom constante de esta microalga. Después de cocerla se la daban a los pacientes como una sopa, en raciones de 21 ± 3 gr de materia seca por día, comprobando que esta nueva dieta ayudaba a mejorar las condiciones físicas de los pacientes.

Durante los años 50, un interés mundial en la búsqueda de nuevas fuentes de proteína para la alimentación llevó a los científicos a continuar investigando las posibilidades del cultivo microalgal en gran escala. En este tiempo se incrementó el conocimiento sobre rendimiento, composición química, fijación de nitrógeno, etc., de cultivos masivos de microalgas.

Aunque la investigación sobre la utilización de microalgas en alimentación parece un tema relativamente reciente, debe tenerse en cuenta que el consumo local de microalgas en determinadas zonas como fuente de vitaminas y proteínas para el hombre data de tiempo inmemorial.

Durante siglos, en algunas partes del mundo se han utilizado como alimento humano microalgas producidas con una tecnología primitiva, y se han establecido apropiadas tecnologías para la producción a gran escala tanto de microalgas verdes como cianobacterias. *Spirulina maxima* era empleada por los aztecas en alimentación, en forma de unos bizcochos que denominaban "tecuilatt". Los nativos del Chad utilizan esta misma microalga en un preparado similar que denominan "dihé". El contenido proteico de estos preparados es asombrosamente alto (70% del peso seco). *Spirulina* vive en el lago Texcoco, en Méjico, y en los lagos del Chad, donde la altísima alcalinidad (pH = 11) hace la vida casi imposible para otros organismos, sean animales o plantas. A este pH *Spirulina* progresa y crece como monocultivo; en ciertos lagos constituye el 95-99% de la población algal. La proteína de *Spirulina* es de alta calidad y posee un buen balance de aminoácidos comparándola con los estándares de la FAO (Ciferri, 1981). Asimismo, *Spirulina* contiene cantidades favorables de ácidos grasos insaturados, muy poco colesterol y una moderada cantidad de carbohidratos (Durand-Chastel, 1980).

Además de *Spirulina* hay otras cianobacterias que son o han sido consumidas por el hombre. En primer lugar está el "lakeplum" (*Nostoc pruriforme* =

Nostoc edule) consumida y comercializada en Mongolia, Tartaria, China y en los Andes peruanos (Aldave-Pajares, 1969). *Nostoc commune*, que forma largas capas correosas sobre suelos calcáreos, es o fue utilizada como alimento en Mongolia, China, Ecuador, Fiji y Okinawa. *Nostoc verrucosum* se consume en Tailandia; *Phyllocladon sacrum* en varias regiones de Japón, donde es considerada un manjar. *Oedogonium* y *Spirogyra*, dos especies de microalgas verdes filamentosas, se consumen y venden en Burma, Vietnam e India. *Prasiola yunnanica* y *Prasiola japonica*, con un contenido proteico apreciablemente alto, se consumen en China y Japón, respectivamente (Johnston, 1970).

La lista de estas exóticas microalgas de agua dulce comestibles probablemente no está completa, por lo que al hablar de nuevas fuentes proteicas no convencionales cabría preguntarse hasta que punto las fuentes proteicas microalgales lo son. Quizá lo no convencional o innovativo sea sólo su producción a escala técnica.

Los fundamentos del cultivo microalgal se establecieron a partir de los años 50 en distintos países, como Japón, Alemania, Estados Unidos, Israel, Checoslovaquia, ... Los trabajos pioneros de Tamiya (1957) y Oswald (1963, 1965, 1969), en Japón y Estados Unidos respectivamente, dieron gran ímpetu para el desarrollo de la tecnología de producción microalgal de especies de agua dulce.

En la década de los 50 comenzaron en Alemania Occidental los trabajos sobre el cultivo de *Scenedesmus acutus* (Gummert *et al.*, 1953), en los que se planteaba la utilización del CO₂ producido en la región industrial del Rhur; estos trabajos fueron continuados por Soeder y su grupo, que realizaron importantes aportaciones para el cultivo masivo de microalgas (Soeder, 1986).

También a comienzos de los años 50, Oswald y colaboradores de la Universidad de California, Berkeley, sugirieron la utilización de cultivos masivos de microalgas para tratamiento de aguas residuales y producción de proteína, simultáneamente (1975). Oswald y Golueke (1960) desarrollaron asimismo sistemas de producción masiva de algas para la bioconversión de la energía solar en metano.

En los años 60 son de destacar los trabajos realizados sobre producción masiva de microalgas en Trebon (República Checa) (Setlik *et al.*, 1970). En esta década se desarrollaron también sistemas cerrados de cultivo de microalgas para utilizar en misiones espaciales (Nichiporovich *et al.*, 1962; Semenenko *et al.*, 1966) en los que se obtuvieron unos altísimos rendimientos en cultivos de *Chlorella*, que marcaron el objetivo de obtener tales rendimientos en sistemas abiertos. También en Estados Unidos se realizaron investigaciones sobre el uso de cultivos intensivos de microalgas en misiones espaciales (Golueke *et al.*, 1959;

Shelef *et al.*, 1970). En estos años comenzó también el interés en la producción de *Spirulina*, con los trabajos de Clement, del Institut Francais du Petrole (Clement *et al.*, 1967a, b), basados en la observación de que las tribus de las orillas del Lago Chad recogían *Spirulina* desde tiempo inmemorial utilizándola como parte de su dieta, como ya se ha mencionado. Poco después comenzó la producción comercial de *Spirulina* en el lago Texcoco, en Méjico. En los años 60 se hicieron asimismo las primeras pruebas utilizando *Chlorella* en la dieta humana (Dam *et al.*, 1965; Lee *et al.*, 1967). Otros estudios mostraron que *Scenedesmus* era una excelente fuente de proteína para el hombre (Kofranyi y Jekat, 1967; Muller-Wecker y Kofranyi, 1973), y lo mismo podría decirse de otras especies de microalgas de agua dulce.

En los años 70, debido a la crisis del petróleo, se hizo necesario buscar fuentes alternativas de energía, atrayendo el interés mundial la aplicación biológica de la energía solar. Como las algas constituyen un eficiente sistema de utilización de la energía solar, existe un interés continuo en la tecnología de la producción microalgal (Benemann *et al.*, 1977). Unido a este desarrollo está el creciente interés en los problemas de contaminación ambiental y reciclaje de residuos, donde las microalgas pueden jugar de nuevo un papel importante en las transformación de los residuos y aguas residuales en biomasa y agua tratada que puede utilizarse para riego (Shelef *et al.*, 1978).

Durante los años 70, Ryther y colaboradores (1975) desarrollaron en el Instituto Oceanográfico de Woods Hole, Massachussets, sistemas de tratammiento de aguas residuales pero en agua de mar, planteando la utilización de estos cultivos de microalgas como alimento de moluscos (Goldman, 1979a). Los trabajos de Woods Hole estimularon el desarrollo de sistemas para el cultivo masivo de microalgas marinas, junto con importantes investigaciones básicas (Goldman, 1979b).

En los años 80 se establecen ya numerosas industrias para la producción de microalgas, sobre todo *Spirulina* y *Dunaliella*, en Taiwan, Thailandia, California, Australia, Hawai e Israel. La producción de *Dunaliella* aparece como una de las más prometedoras, por sus contenidos en β -caroteno (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Ben-Amotz y Avron, 1988) y sus propiedades terapéuticas (Nagasawa *et al.*, 1989). En años recientes los desarrollos tecnológicos para la producción masiva de microalgas han sido significativos en todo el mundo. El resultado práctico de este cultivo masivo de microalgas, en el contexto de producción de microalgas para la alimentación, es el desarrollo de una floreciente industria de *Chlorella* en Japón y Taiwan. Esta microalga dulceacuícola se utiliza para la manufactura de tabletas, extractos y otros alimentos dietéticos para los que existe en Japón un mercado bien establecido. En Taiwan se han utilizado

Chlorella ellipsoidea y *Chlorella pyrenoidosa* con un rendimiento de 25-30 gr/m²/día. En Asia existen actualmente numerosas factorías para la producción masiva de microalgas de agua dulce para la alimentación, principalmente *Chlorella sp.* La capacidad de producción de estas factorías excede los 1000 Kg de alga seca por mes (Kawaguchi, 1980). En Sausal (Perú) existe también una planta de producción de *Scenedesmus* para su utilización en alimentación (Castillo *et al.*, 1980). En la producción de microalgas para la alimentación animal o humana se han hecho importantes progresos en Méjico. La Compañía Sosa Texcoco ha conseguido grandes avances en la producción de *Spirulina* (Ciferri, 1983).

La producción de biomasa microalgal se orientó en principio a las especies de agua dulce que podrían servir como suplemento en las dietas o, posteriormente, para el tratamiento de aguas residuales. Posteriormente, el interés se dirigió también al cultivo masivo de microalgas marinas y de estuarios para alimento de especies animales apreciadas (Ukeles, 1980). Las microalgas son fundamentales en la acuicultura marina, en la alimentación de larvas de crustáceos, moluscos y ciertos peces (Soeder, 1976; Persoone y Claus, 1980; Ukeles, 1980; De Pauw y Persoone, 1988). En los sistemas de acuicultura las microalgas se utilizan como alimento de moluscos, peces, larvas de crustáceos y zooplancton. Incluso crustáceos y peces cuyos adultos son carnívoros requieren microalgas durante las fases larvarias (Yufera y Lubián, 1990). El desarrollo de estos cultivos implica la producción diaria de sustanciales volúmenes de determinadas especies de microalgas marinas, y de hecho, el cultivo masivo de estas especies representa un auténtico cuello de botella para el desarrollo de los sistemas de acuicultura (Persoone y Claus, 1980).

Durante un primer periodo de cultivo algal masivo, la principal atención se dirigió a los avances tecnológicos y a las evaluaciones nutricionales, considerándose la utilización de microalgas como alimento o suplemento alimenticio. Sin embargo, la idea inicial de que las microalgas podrían utilizarse para evitar la escasez de proteínas no ha tenido el éxito esperado, y se ha extendido un amplio escepticismo sobre la explotación de fuentes no convencionales de proteína en general, y de proteínas microbianas en particular (Litchfield, 1983). Este cambio de actitud es debido principalmente a los elevados costes de producción microalgal, que hacen que no puedan competir con alimentos tradicionales (Behr y Soeder, 1981), aunque proporcionan mayores rendimientos en proteína por unidad de superficie y tiempo que las cosechas tradicionales, incluida la soja.

Si bien su utilización como fuente de proteínas es actualmente muy controvertida, numerosas investigaciones sobre diferentes aspectos de las microalgas, tanto básicos como aplicados, demuestran que la biomasa microalgal

puede ser utilizada para otras aplicaciones, como biofertilizantes, en la purificación de aguas residuales, como acondicionadores de suelo, como alimento en acuicultura (Abeliovich, 1986; Venkataraman, 1986; Boussiba, 1988). Asimismo, se ha puesto de manifiesto la potenciabilidad de las microalgas para la producción de gran variedad de sustancias, algunas de ellas de elevado precio, como ácidos grasos, pigmentos, vitaminas, antibióticos, productos farmacéuticos y otros productos químicos de interés (o sus precursores), así como hidrógeno, hidrocarburos y otros combustibles biológicos (Cohen, 1986; Arad, 1988; Borowizka, 1988a, b). En los últimos años se ha establecido asimismo la idoneidad de la utilización de cultivos de microalgas para ensayos biológicos y fisiológicos y se ha demostrado que son un medio adecuado para ensayar los efectos de distintos agentes químicos sobre organismos vivos (Becker, 1994).

En función de estas aplicaciones, actualmente se reconoce la importancia comercial de distintas especies de microalgas; sin embargo, el desarrollo industrial en biotecnología microalgal es escaso, debido fundamentalmente a los elevados costes de producción, como se ha citado anteriormente; para que la tecnología algal alcance su potencial final estos deberán ser reducidos significativamente, incrementando los rendimientos para aumentar la rentabilidad (Richmond, 1990).

3.- Parámetros de cultivo

El crecimiento microalgal se rige por la ley del mínimo, es decir, el factor limitante del crecimiento es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario para la microalga. Tal y como lo definió Leibig, el concepto de factor limitante sólo se aplica a deficiencias en nutrientes químicos. Sin embargo, el concepto se ha ido ampliando hasta incluir parámetros físicos, como luz, temperatura, etc. El concepto se amplió nuevamente cuando se reconoció que los parámetros ambientales podían limitar el crecimiento por exceso. Los niveles máximos y mínimos de tolerancia definen, por lo tanto, los límites de tolerancia de un organismo a cualquier factor ambiental. En sistemas naturales, otros organismos pueden ser considerados limitantes si por depredación o por excreción de productos tóxicos al medio impiden el aumento de la biomasa microalgal.

Es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de una microalga para todos o el mayor número de parámetros. Ahora bien, estas condiciones o límites para un parámetro generalmente cambian cuando un segundo parámetro fluctúa. En sistemas naturales, cuando una microalga tiene éxito en un ecosistema normalmente significa que es lo suficientemente flexible en sus requerimientos e interacciones (Darley, 1987). En sistemas de cultivo microalgales, esta flexibilidad es también conveniente (Vonshak, 1986).

En el cultivo masivo, el rendimiento alcanzado depende tanto de la concentración de células en el cultivo como del grado en que las células pueden desarrollar su potencial de crecimiento. Por tanto, para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo es necesario: un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos, adecuadas condiciones físico químicas (temperatura, pH, etc.) y energía.

A continuación se tratan los principales factores que deben ser considerados para el cultivo de microalgas (Fig. 1).

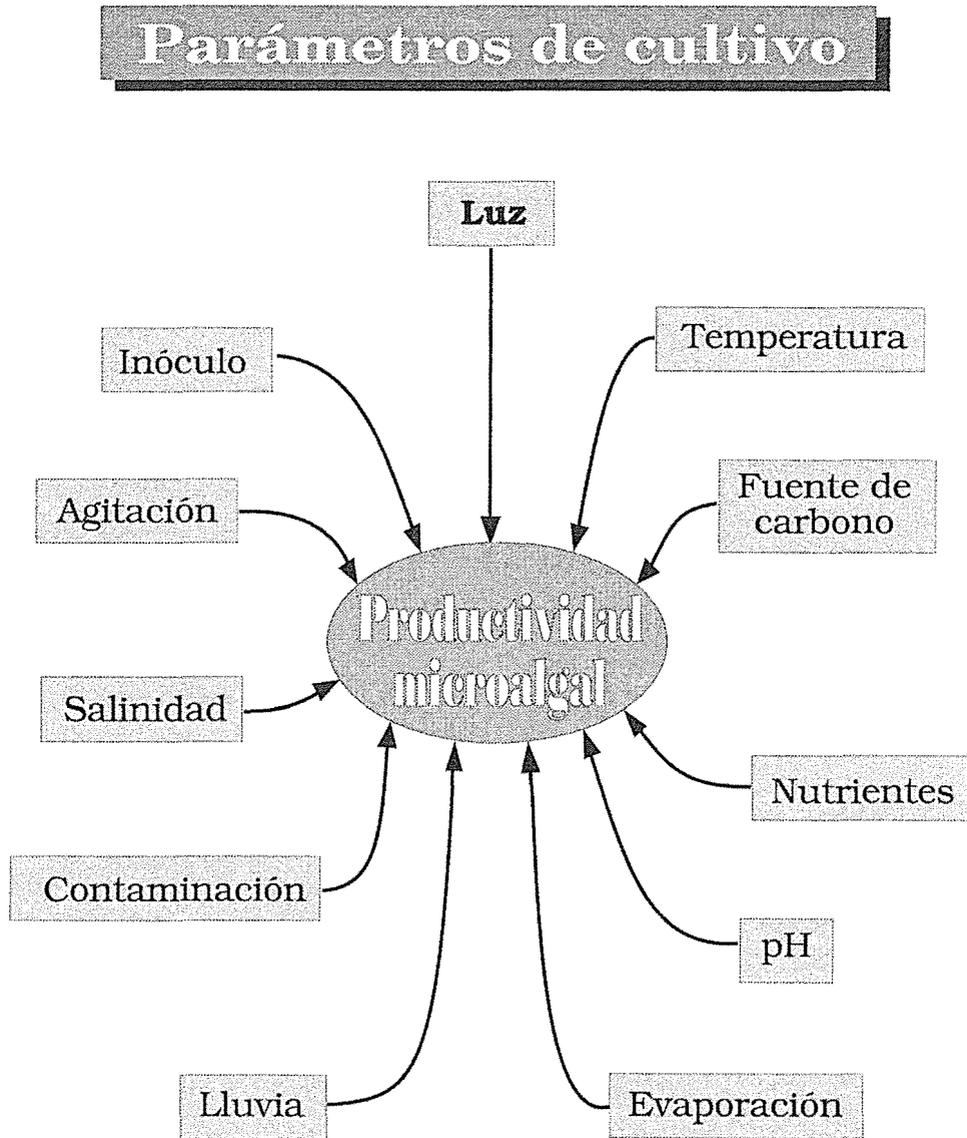


Figura 1.- Parámetros de cultivo de microalgas

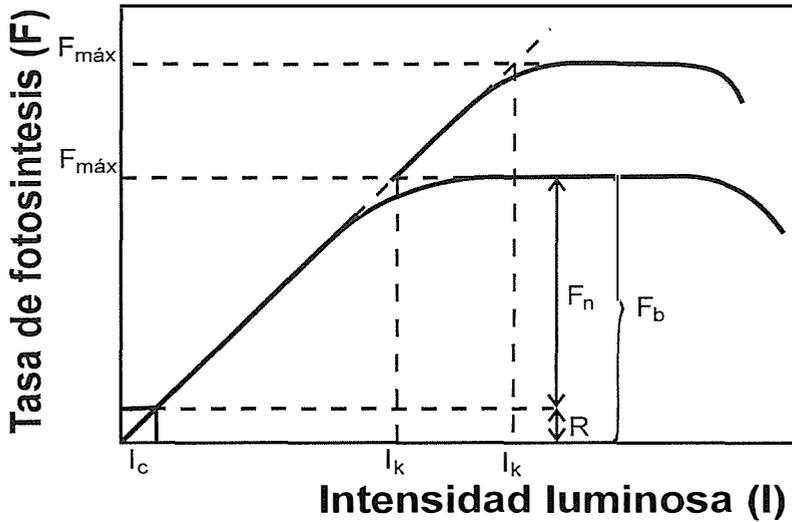


Figura 2.- Tasa de fotosíntesis (F) frente a intensidad luminosa (I). I_c : Intensidad luminosa de compensación; F_n : fotosíntesis neta; F_b : fotosíntesis bruta; $F_{máx}$: tasa de fotosíntesis máxima; R: respiración. Las curvas corresponden a dos temperaturas distintas.

LUZ

La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalgas, tanto por sí misma como por sus interrelaciones con otros parámetros. La radiación utilizable fotosintéticamente (PAR) cae dentro del rango del espectro visible (400 - 700 nm). Representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperíodo (que marca el mecanismo para muchos ritmos circadianos) afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (Lips y Avissar, 1986).

INTENSIDAD

Se necesita una cierta intensidad de luz para que pueda realizarse la fotosíntesis. 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 se hace limitante, provoca la disminución de la tasa fotosintética y, por tanto, del crecimiento (Fig. 2).

A bajas intensidades de luz, la tasa de fotosíntesis está limitada por las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, esto es, por las reacciones fotoquímicas que

implican el número de quanta disponibles y la capacidad de las células de absorber estos quanta. A estas intensidades bajas, la relación entre la intensidad de luz y la tasa de fotosíntesis es independiente de la temperatura y del metabolismo de las células. A intensidades de luz de saturación, la tasa fotosintética máxima, también denominada capacidad fotosintética, es función de las reacciones oscuras de la fotosíntesis. Debido a que estas reacciones son de naturaleza enzimática, la temperatura así como otros factores que influyen en el metabolismo celular, como, por ejemplo, el nivel de nutrientes, afectan a esta tasa máxima de fotosíntesis (Lips y Avissar, 1986; Richmond, 1986).

Una célula que se encuentre en condiciones limitadas de luz (sombra) crecerá lentamente, pero hará que la mayor parte de esa energía luminosa sea asequible al producir un sistema más eficiente de captura de luz. La adaptación a bajas intensidades implica un incremento de dos a diez veces el contenido de clorofila por célula, una intensidad de saturación (I_k) menor y una pendiente inicial más pronunciada. Aunque las células adaptadas a bajas intensidades son más eficientes para absorber la energía luminosa, el rendimiento del quantum (moles de O_2 einsteins⁻¹) permanece constante, lo cual sugiere que no pueden utilizar la luz absorbida con mayor eficiencia. Si la intensidad de la luz es alta, existe suficiente luz, el crecimiento celular es limitado más bien por la tasa de fijación del carbono, que a su vez depende del metabolismo de la célula. Así, las células expuestas a intensidades altas de luz utilizan menos recursos propios para la síntesis de clorofila y más para la síntesis de la RuBP carboxilasa y quizá otras enzimas de las reacciones oscuras. Como resultado, dichas células se caracterizan por mostrar menos clorofila por célula (a veces correlacionada con una disminución del tamaño del cloroplasto), una menor pendiente inicial, mayor I_k y con frecuencia mayor fotosíntesis máxima ($F_{máx}$). 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 son las variaciones que existen en el tiempo requerido para adaptarse a una nueva intensidad de luz (de unas horas a varios días). Algunas especies tienen poca capacidad para responder a cambios de intensidad de luz y mueren rápidamente al exponerlas a aumentos relativamente pequeños de ésta. Estas especies no son adecuadas para cultivos masivos (al menos exteriores) donde la exposición a la luz puede aumentar enormemente después del cosechado del estanque (Richmond, 1986).

Por otra parte, la intensidad luminosa influye sobre el esquema de síntesis macromolecular a partir del CO_2 fijado fotosintéticamente (Konopka y Schnur, 1980) (capítulo 6).

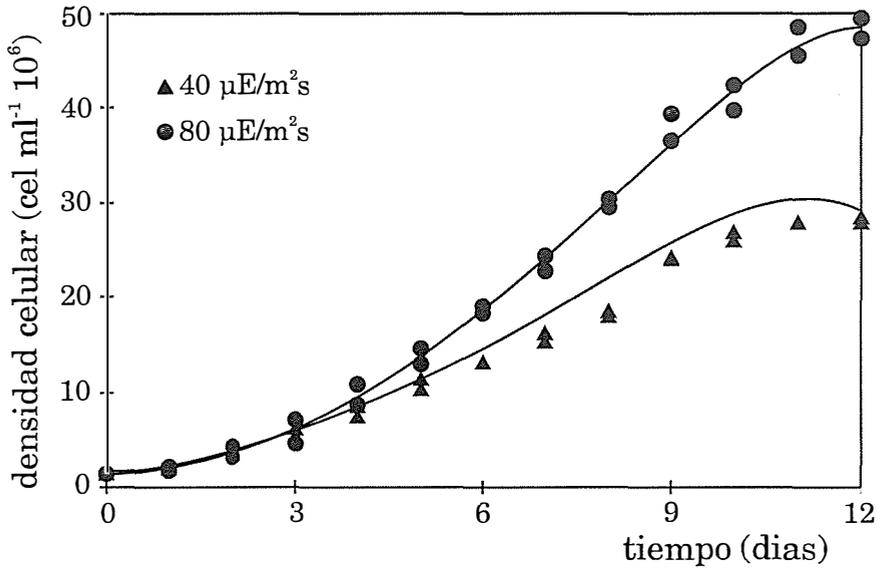


Figura 3.- Crecimiento de *Phaeodactylum tricornerutum* con diferentes intensidades de luz.

La respuesta de la tasa de crecimiento a la intensidad luminosa es similar a la curva de tasa de fotosíntesis respecto a la intensidad luminosa. Kaplan *et al.* (1986) estudiaron el efecto de la intensidad de luz a temperatura constante sobre el crecimiento de la microalga marina *I. galbana*, observando que se produce un incremento de la densidad celular en función de intensidad de luz que aumenta con el tiempo de cultivo; así al cabo de siete días la densidad celular se duplica al pasar de 50 a 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

Similares resultados se obtuvieron estudiando el efecto de la intensidad de luz sobre la microalga marina *Phaeodactylum tricornerutum* a temperatura constante. La intensidad de luz afectó significativamente al crecimiento de *P. tricornerutum* (Fig. 3), obteniéndose mejor crecimiento a la intensidad de luz mayor de las ensayadas (López-Muñoz *et al.*, 1990). Estos resultados se repitieron con cultivos de *Tetraselmis suecica*.

FOTOINHIBICIÓN

Las intensidades de luz muy elevadas con frecuencia son inhibitorias para el crecimiento microalgal, produciendo fotoinhibición. La fotoinhibición o fotoinactivación puede definirse como el descenso de la capacidad fotosintética a

elevadas intensidades de luz, muy por encima de los valores de saturación, es decir, muy superiores a las requeridas para obtener la tasa máxima de fotosíntesis (Powles, 1984). La fotoinhibición implica la fotodestrucción de pigmentos fotosintéticos. Esto se manifiesta como un "bleaching" de pigmentos dependiente del oxígeno y de la luz, definido por Powles (1984) como fotooxidación. La fotooxidación a intensidades elevadas de luz tiene efectos letales sobre las células y puede producir la pérdida total de un cultivo.

El sistema más sensible a los daños por la iluminación es el PSII (el PSI puede ser también afectado). Las proteínas D1 y D2 del centro de reacción deben estar intactas para que se produzca transporte de electrones en el PSII, ya que a ellas están unidos los componentes redox de estas reacciones (Anderson y Styring, 1991). Sin embargo, la proteína D1, que lleva el sitio de unión del transportador Q_b , se degrada continuamente durante la iluminación (Mattoo *et al.*, 1984). *In vivo*, a intensidades normales de luz el organismo equilibra esto por resíntesis continua de D1. Sin embargo, a altas intensidades de luz fotoinhibitorias la degradación de la proteína D1 es más rápida que la resintetización, lo que finalmente conduce a la muerte del organismo (Mattoo *et al.*, 1989; Anderson and Styring, 1991).

La fotoinhibición es debida, portanto, a que la sobresaturación del PSII con la luz causa la rotura de la proteína D1. Esto hace que se inhiba el flujo de electrones desde el agua a través del centro de reacción del PSII. Actualmente no hay consenso respecto a qué mecanismo molecular o en que punto particular se produce el deterioro del transporte electrónico del PSII y podrían existir diferentes tipos de inhibición del PSII (Anderson y Styring, 1991). Existen al menos dos mecanismos para la degradación de la proteína D1 (Jegerschöld y Styring, 1992): acumulación de radicales oxidantes endógenos de larga vida en el lado del donador del PSII, y degradación de la proteína D1 por especies reactivas de oxígeno (oxígeno en estado de singlete - 1O_2 - u otros radicales reactivos) generadas por una fotoquímica anormal en el PSII que se produce cuando el lado del aceptor esta sobre-reducido (Nedbal *et al.*, 1990; Vass *et al.*, 1992).

La fotoinhibición depende de la intensidad y calidad (longitud de onda) de la luz, así como del tiempo de exposición, siendo más pronunciada con exposiciones prolongadas a intensidades altas de luz. Los efectos dañinos de la iluminación pueden ser intensificados por otros factores de estrés, como deficiencia de nutrientes o temperaturas extremas.

Aunque el daño primario es en el PSII, se han encontrado efectos en la fijación de CO_2 en el cloroplasto (Andersson, 1992). Los mecanismos enzimáticos implicados en la fotoinactivación se relacionan con la sensibilidad de la Rubisco

(ribulosa bifosfato carboxilasa), enzima clave de la fotoautotrofia, a la inactivación por luz azul (Ruyters, 1984). De particular interés respecto al efecto de las elevadas intensidades de luz en el metabolismo y crecimiento microalgal es el hecho de que la Rubisco es sensible a distintas especies de oxígeno, como el oxígeno en estado de singlete, peróxidos y superóxidos (Whitelam y Codd, 1983).

Las intensidades de luz elevadas también pueden inhibir la respiración en células fotosintéticamente activas; el mecanismo implicado parece ser la destrucción de citocromos por la luz azul (Soeder y Stengel, 1974)

La fotoinhibición puede ser un problema en cultivos exteriores, en las capas superiores de los estanques, que dependerá asimismo de la agitación como veremos más adelante. Experimentos de Vonshak y Guy (1988) en cultivos exteriores de cepas de *Spirulina* sensibles a la fotoinhibición mostraron que ensombreciendo el cultivo con redes se aumentaba la tasa fotosintética diaria hasta un 35%.

FOTOPERIODO

En condiciones normales las microalgas están sometidas a periodos de luz/oscuridad y esta alternancia generalmente se utiliza también en su cultivo.

Muchos aspectos de la fisiología microalgal fluctúan en un ciclo de 24 horas (diario). Esta periodicidad se observó en (Sournia, 1974):

- división celular: en muchas especies la mayoría de las células se dividen en un momento determinado del día o de la noche, lo que favorece su sincronización; al parecer la división nocturna ocurre en muchas especies, especialmente las que se estudian en cultivo;
- capacidad fotosintética: con frecuencia se observa que las tasas máximas de fotosíntesis se producen en la mañana y las mínimas al anochecer;
- absorción de nutrientes: las tasas de absorción de N y P son mayores durante el día que durante la noche, lo que refleja la influencia de la luz sobre la absorción;
- bioluminiscencia: generalmente se detecta un pico nocturno de bioluminiscencia en las especies que la poseen (dinoflagelados).

Estos ritmos circadianos diarios persisten bajo condiciones ambientales constantes.

La adaptación de las microalgas a variaciones extremas en la intensidad de luz, es decir, a luz y sombra, es un fenómeno muy conocido y caracterizado por

cambios en el contenido intracelular de pigmentos, generalmente acompañados en cambios en la respuesta fotosintética y en la composición bioquímica. Soeder y Stengel (1974) distinguen dos tipos de reacciones adaptativas. La más frecuente es el tipo *Chlorella* caracterizada por una relación inversa entre la intensidad de luz a la que está expuesta el alga y su contenido en clorofila a. Por tanto, este tipo de adaptación implica fundamentalmente cambios en la concentración de pigmentos. El otro tipo, modelo *Cyclotella*, muestra una relación inversa entre la intensidad de luz a la que está expuesta el alga y las actividades o concentraciones de los enzimas fotosintéticos. No obstante, las adaptaciones a la luz y a la sombra son más complejas, e implican también cambios en las unidades fotosintéticas, así como en el espectro de absorción de la clorofila *a*, y en la curva de fotosíntesis frente a intensidad de luz (Richardson, 1983).

Así, Fallkowski y Owens (1980) distinguen dos estrategias de adaptación luz-sombra en microalgas marinas. Estimaron el número y tamaño de unidades fotosintéticas en *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) y en *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) en función de la adaptación luz-sombra. En la diatomea la adaptación se caracterizó por cambios en el tamaño y no en el número de unidades fotosintéticas, mientras que en la clorofita se produjeron cambios en el número y no el tamaño de las unidades fotosintéticas. Ambas estrategias eran efectivas para la captación y transferencia de la energía lumínica a los centros de reacción, pero la estrategia de *Skeletonema* era más efectiva en condiciones subsaturantes.

Se han realizado experimentos en laboratorio utilizando luz continua, pero los resultados demuestran que son necesarios periodos de oscuridad para conseguir resultados óptimos, aunque hay discrepancia de datos a este respecto. Esto puede explicarse porque las células cultivadas con ciclos de luz-oscuridad tienden a mostrar características propias para la adaptación a bajas intensidades de luz -más eficiencia en la absorción de energía luminosa- (véase más arriba) cuando se comparan con células cultivadas bajo luz continua de la misma intensidad.

Los periodos de luz/oscuridad se ajustan para el cultivo de cada especie en particular. La introducción de un ciclo celular es un importante adelanto ya que el ciclo día-noche es quizá el factor cíclico ambiental más importante en la mayoría de los sistemas.

Experiencias con *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* en luz continua y en periodos luz-oscuridad, proporcionando la misma cantidad de luz por día (cantidad de luz = intensidad x tiempo), muestran que si bien para una temperatura dada el crecimiento es proporcional a la cantidad de luz recibida, se obtienen mayores tasas de crecimiento en el régimen luz-oscuridad (Toro, 1989).

En cultivos de *Skeletonema costatum* con 3 regímenes de luz (constante, 12:12 y 2:2) se muestra que con luz continua el sistema enzimático implicado en la fijación del CO₂ es menos eficiente que en periodos luz:oscuridad, afectando la frecuencia de las fluctuaciones al rendimiento fotosintético; la tasa de división fue mayor (2.02 div/día) con luz constante que con ambos fotoperiodos (1.23 div/día en 12:12 y 2:2). El mayor efecto del fotoperiodo es en la tasa de incorporación de carbono (Mortain-Bertrand *et al.*, 1987).

Se han realizado estudios con distintas microalgas sometidas a pulsos de luz de menos de un segundo e incluso de menos de 100 milisegundos. El rango de duración de los pulsos de iluminación y los periodos de oscuridad ha sido estudiado por diversos autores (Terry, 1986; Stitt, 1986; Laws *et al.*, 1983, 1986, 1988). Terry (1986) sugiere que se puede incrementar la tasa de fotosíntesis combinando pulsos de luz cortos con periodos de oscuridad largos. Stitt (1986) obtuvo un incremento de un 50% en la tasa de fotosíntesis transfiriendo continuamente las células de luz saturante a baja iluminación en un intervalo de tiempo de 30 segundos. Por el contrario, Grobbelaar (1989) encuentra que la frecuencia de fluctuaciones en el régimen luz-oscuridad (desde segundos a minutos) no afecta a la productividad microalgal.

LONGITUD DE ONDA

En cuanto a la calidad de luz (longitud de onda) se sabe que tiene efectos marcados sobre el crecimiento y varios procesos metabólicos, y puede afectar también a la composición bioquímica. Así, la luz azul es un disparador para ciertas vías metabólicas (Senver, 1987). 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. La luz azul ejerce un efecto regulatorio a nivel postranscripcional de la biosíntesis de la anhidrasa carbónica (CA) en *Chlamydomonas reinhardtii* (Dionisio *et al.*, 1989), asimismo activa la nitrato-reductasa en la misma especie (Azuara y Aparicio, 1983), y se ha sugerido que la luz azul es un factor regulador del consumo fotorrespiratorio de nitrato y, posiblemente, de todo el metabolismo del N en las algas verdes.

En microalgas se ha establecido que varias enzimas relacionadas con la fotosíntesis están bajo el control de la luz azul (Ruyters, 1984). La actividad de la fosfatasa alcalina en *Dunaliella tertiolecta*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Prymnesium parvum* varía con la intensidad y calidad de luz de forma característica para cada especie (Wynne y Rhee, 1988). La composición espectral de la luz también afecta a la incorporación de P e induce asimismo cambios en la ratio N:P óptima también de forma característica en cada especie (Wynne y Rhee, 1986, 1988).

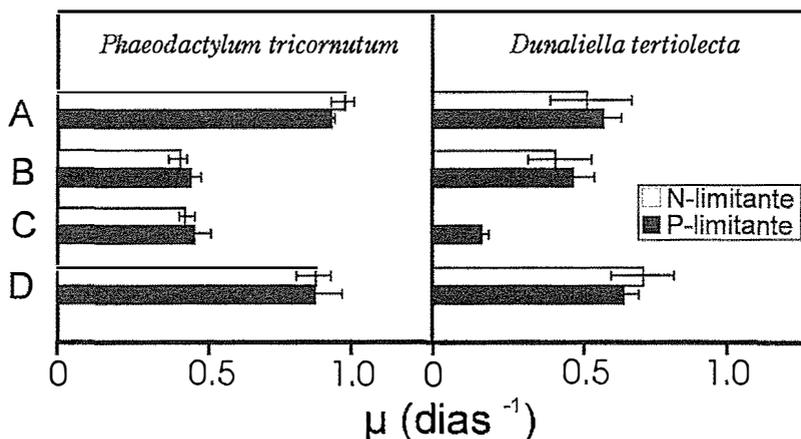


Figura 4.- Tasa de crecimiento en función de la longitud en dos microalgas marinas. A: luz blanca; B: luz roja; C: luz verde; D: luz azul. La intensidad de la luz es de $58 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Modificada de Wynne y Rhee, 1986).

La luz roja también afecta a ciertos aspectos del metabolismo microalgal. Así, la actividad fosfofructoquinasa aumenta con luz roja y disminuye con luz azul en *Chlorella vulgaris* (Grotjohann y Kowallik, 1989).

A pesar de estos efectos sobre el metabolismo microalgal, en general se ha observado poco efecto de la calidad de luz sobre el crecimiento. En la Fig. 4 se representan los resultados de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* y *Dunaliella tertiolecta* obtenidos con distintos tipos luz: blanca, roja, verde y azul (Wynne y Rhee, 1986). Se observa que el crecimiento con luz azul es similar al que se obtiene con luz blanca, mientras que la roja y la verde, producen crecimientos significativamente menores.

FUENTES DE LUZ

Cuando los demás factores están dentro de límites razonables, la disponibilidad de luz es el principal factor que influye en la productividad de los cultivos microalgales masivos, de ahí la importancia de la fuente de luz para el cultivo.

La luz utilizada para el cultivo de microalgas puede ser luz artificial o luz natural. La luz natural tiene la ventaja de no suponer un gasto energético, pero tiene los inconvenientes de que no se puede controlar ni el fotoperiodo ni la intensidad; asimismo, se producen importantes variaciones diarias, estacionales, en función del tiempo atmosférico, etc. Por el contrario, la luz artificial puede

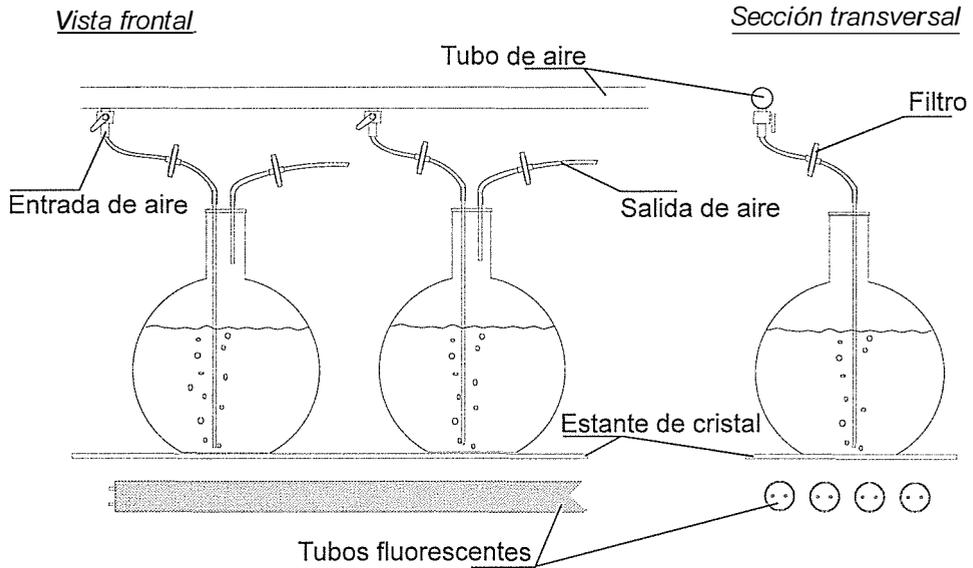


Figura 5.- Sistema de cultivo de microalgas con iluminación exterior.

controlarse pero supone un gran gasto energético y, por tanto, un elevado coste. En latitudes donde la intensidad de luz es adecuada durante todo el año no es necesaria luz artificial. En cualquier caso, la utilización de luz artificial es generalizada en los cultivos iniciales, independientemente de la latitud. La utilización de luz artificial implica la producción de calor, por lo que se hacen necesarios sistemas de refrigeración.

Artificial

Las fuentes de luz artificial tienen espectros de emisión que no son necesariamente idénticos a la luz del sol y la calidad de la luz puede afectar al crecimiento, metabolismo, reproducción y morfología de una clase de microalgas, por lo que habrá que estudiar el espectro más favorable para cada tipo a cultivar.

Las lámparas fluorescentes tubulares son la fuente de luz preferida para la iluminación de cultivos interiores. Estas 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.

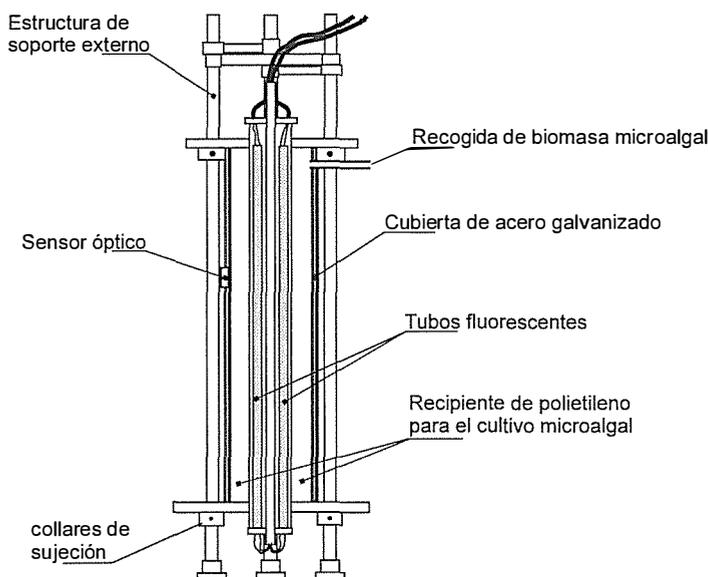


Figura 6. - Unidad de cultivo de microalgas con iluminación interior (modificado de Laing y Jones, 1983).

El arreglo más simple consiste en baterías (hileras) de tubos fluorescentes alrededor del cultivo (Fig. 5). Sin embargo, esto es ineficiente en términos de energía lumínica disponible para las células. Un método mejor es incluir la fuente de luz dentro del sistema de cultivo. Así Laing y Jones (1983) describen una unidad de seis tubos fluorescentes de 80W utilizados dentro de un cilindro acrílico central para una unidad de cultivo de 80 l (Fig. 6).

La iluminación de los cultivos interiores puede ser continua o con fotoperiodo.

En cualquier caso, la luz natural es la única alternativa económica cuando se trata de cultivos a gran escala.

Natural

Muchos sistemas de cultivo masivo de microalgas se diseñan para utilizar luz natural. Esto puede reducir significativamente el coste de producción de las algas en el sistema, pero dependiendo de la situación geográfica puede ser menos seguro y las tasas de producción pueden variar considerablemente a lo largo del año (Fig. 7).

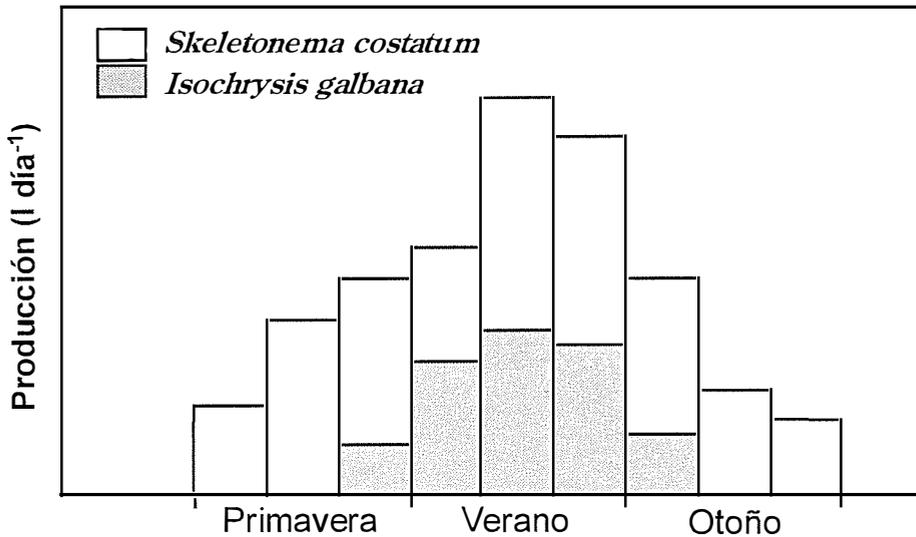


Figura 7.- Variaciones estacionales en la producción de dos microalgas marinas en cultivos exteriores (modificado de Laing y Hepper, 1983).

En cultivos exteriores en estanques otro factor a considerar es la profundidad del mismo.

También es posible cultivar las microalgas heterotróficamente, sin luz, utilizando una forma orgánica de carbono, generalmente un carbohidrato, como sustituto de la energía lumínica. El principal problema con este método es que los cultivos deben mantenerse axénicamente o se contaminarán con crecimiento bacteriano. Por esta razón este método no ha producido interés comercial, pero no debería desecharse ya que los diseños son más sencillos que en cultivos iluminados.

Otro aspecto a considerar es que la intensidad de luz cambia considerablemente durante el crecimiento. La intensidad media de luz disponible para una célula depende del ensombrecimiento por otras células, esto es, de la densidad celular. Esto hace que la luz pueda ser un factor limitante en cultivos muy densos. Esta variación de la intensidad luminosa durante el crecimiento hace conveniente, en cultivos interiores, ajustar el número de luces a medida que se desarrolla el cultivo. La agitación del cultivo también contribuye a mejorar este aspecto.

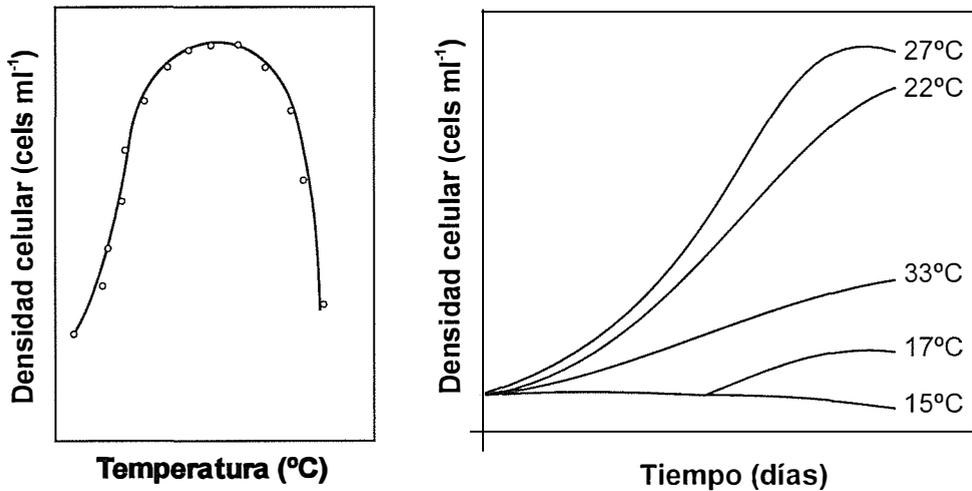


Figura 8.- Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de microalgas (Kaplan *et al.*, 1986).

TEMPERATURA

La temperatura es otro parámetro fundamental para el crecimiento de las microalgas. La biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura ambiental. La temperatura celular se iguala a la temperatura del medio de cultivo, en contraste con otros parámetros del medio como el pH. Además de afectar a las reacciones celulares, la temperatura también afecta a la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, si bien dentro de los rangos óptimos tiene poca influencia sobre la concentración final de biomasa, así como sobre la producción y la composición bioquímica de las microalgas.

En las microalgas existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica, aumentando la tasa de crecimiento cuando aumenta la 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 la temperatura. La mayoría de las algas tienen una curva de respuesta del crecimiento a la temperatura con una amplia meseta, y un rápido descenso después del óptimo con pronunciados efectos inhibitorios para temperaturas que superan el óptimo en sólo 2 o 3°C (Richmond, 1986). Esta respuesta se acentúa cuando la intensidad de luz es elevada (Fig. 8). El descenso de crecimiento a temperaturas altas puede ser debido a la interrupción de la regulación metabólica o la muerte celular. El rango

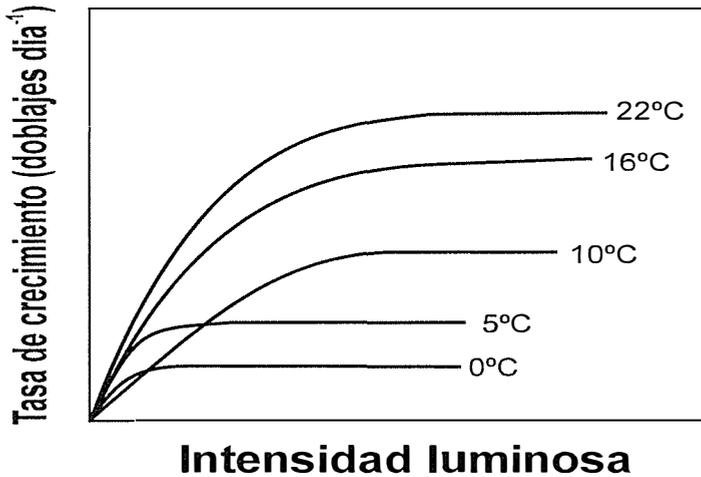


Figura 9.- Interacción entre la temperatura, intensidad luminosa y tasa de crecimiento en microalgas.

óptimo para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 y 25°C. La tolerancia varía según la especie; así, las formas delicadas, como *IsochrYSIS*, 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 efecto más marcado de la temperatura en el metabolismo celular se refleja en la influencia de ésta en el proceso de respiración en la fase oscura, que aumenta exponencialmente con la temperatura. 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, es considerable la pérdida de biomasa debida a la respiración intensiva (Hall, 1986). Dentro de las óptimas, el incremento de temperatura aumenta los problemas de desarrollo bacteriano.

En cultivos mixtos o en condiciones de afloramiento semicontrolado la temperatura actúa como factor de selección de especies (Goldman, 1977).

La interacción entre la temperatura y la intensidad de luz es muy marcada (Collins y Boyen, 1982). Para cada temperatura, existe una intensidad de luz específica a la cual se alcanza la tasa máxima de fotosíntesis. Cuando la temperatura desciende, la saturación lumínica se produce a intensidades de luz más bajas. El efecto se debe más a una disminución de la tasa de crecimiento dependiente de la temperatura que a un cambio inherente en la fotoquímica. La pendiente inicial disminuye cuando la temperatura baja (hasta 10°C) y aumenta

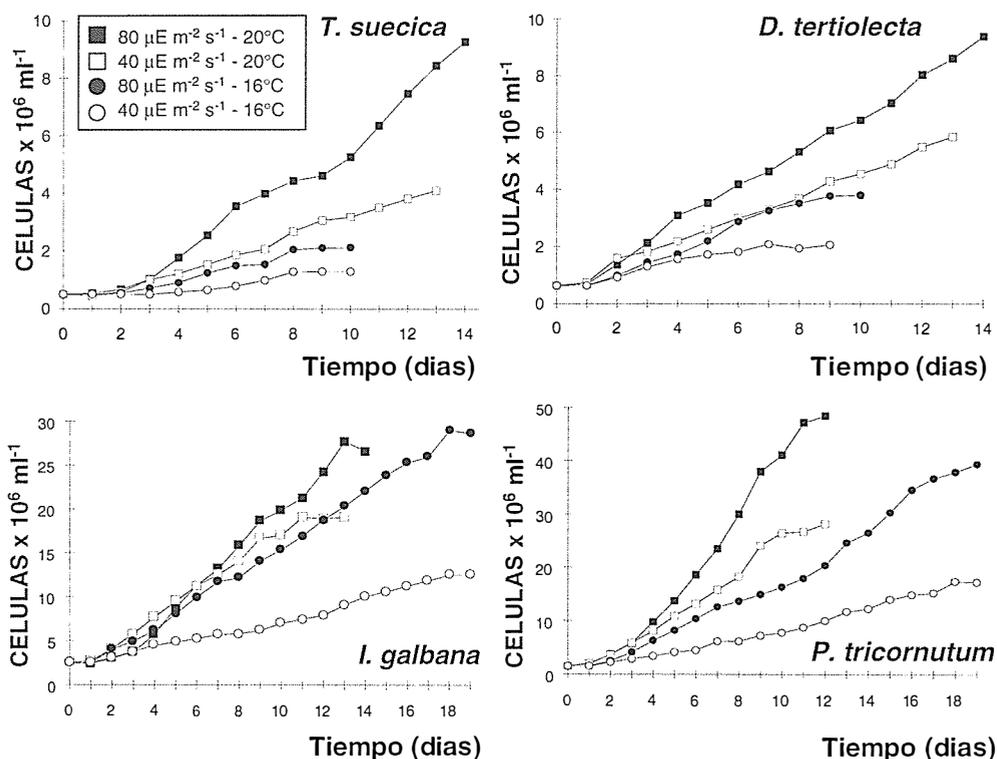


Figura 10.- Curvas de crecimiento de *T. suecica*, *D. tertiolecta*, *I. galbana* y *P. tricorutum* con diferentes intensidades de luz y temperaturas (Lopez-Muñoz *et al.*, 1992a).

entonces de nuevo a menores temperaturas (Fig. 9). Un aspecto importante de la interacción de la luz y la temperatura es que la temperatura óptima para la fotosíntesis aumenta cuando aumenta la intensidad de luz. A bajas intensidades de luz la tasa de fotosíntesis aumenta con el aumento de la temperatura, mientras que a temperaturas altas la tasa de fotosíntesis aumenta con el aumento de la intensidad de luz (Lee *et al.*, 1985).

La temperatura interactúa asimismo con la disponibilidad de nutrientes. La interacción que existe entre la temperatura y la limitación de nutrientes se estudia convenientemente en cultivos quimioestáticos limitados por nutrientes, debido a que el efecto de la temperatura se observa independientemente de los cambios en la tasa de crecimiento al mantener simplemente una tasa constante de dilución. En las microalgas que crecen a una tasa de crecimiento constante limitada por nutrientes, la cuota celular (Q) del nutriente limitante es una

función de la temperatura; Q tiene un valor mínimo a la temperatura óptima de crecimiento y aumenta a temperaturas superiores o inferiores a la óptima. En otras palabras, se requiere más nutriente para producir una célula (a la misma tasa de crecimiento) a esas temperaturas no óptimas, un hecho que se reflejaría en una disminución de la densidad celular en equilibrio a temperaturas no óptimas en un cultivo quimioestático. Otro caso sería el de especies mejor adaptadas a los cambios de temperatura que mantendrían una cuota celular constante al variar la temperatura durante el crecimiento limitado por nutrientes; sin embargo, esta respuesta aún no se ha documentado en un alga (Darley, 1982).

Teniendo en cuenta los dos parámetros, luz y temperatura, se han estudiado las diferencias en el crecimiento y composición de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Phaedodactylum tricornutum*) cultivadas con distintas combinaciones de luz y temperatura: 16 y 20°C y 40 y 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz (López-Muñoz *et al.*, 1992a). Ambos factores afectaron de forma significativa al crecimiento y composición de pigmentos de las microalgas. En lo que se refiere al crecimiento, en los cultivos con *T. suecica* y *D. tertiolecta* la temperatura constituyó un factor de crecimiento más determinante que la luz, obteniéndose los mejores crecimientos a 20° y dentro de estos a la mayor intensidad de luz. Por el contrario, en *I. galbana* y *P. tricornutum* la luz constituye un factor de crecimiento más determinante que la temperatura obteniéndose los mejores resultados a la mayor intensidad ensayada. Estos cultivos más influenciados por la luz que por la temperatura corresponden a las especies que poseen como pigmento fotosintético clorofila c.

Además del crecimiento, se estudió la tasa de fotosíntesis partiendo de cultivos aclimatados a bajas (40 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y altas (80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) intensidades de luz, ensayándose dos temperaturas (16 y 20°C) (López-Muñoz *et al.*, 1992b). Se detecta fotoinhibición a 200 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz en todas las condiciones estudiadas. En *P. tricornutum* los cultivos preadaptados a la intensidad de luz de 40 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ presentan tasas de fotosíntesis superiores a los preadaptados a 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, debido a su mayor contenido en clorofilas. Si se expresan las tasas de fotosíntesis en $\text{pg O}_2/\text{pg clorofila } a/\text{hora}$ (Fig. 11), las diferencias entre los cultivos preadaptados a las dos diferentes intensidades de luz desaparecen, siendo en este caso la temperatura el factor que condiciona la producción de O_2 , que aumenta con la temperatura.

El nivel de temperatura afecta también a la solubilidad de los gases en el agua, la cual decrece con el aumento de la temperatura.

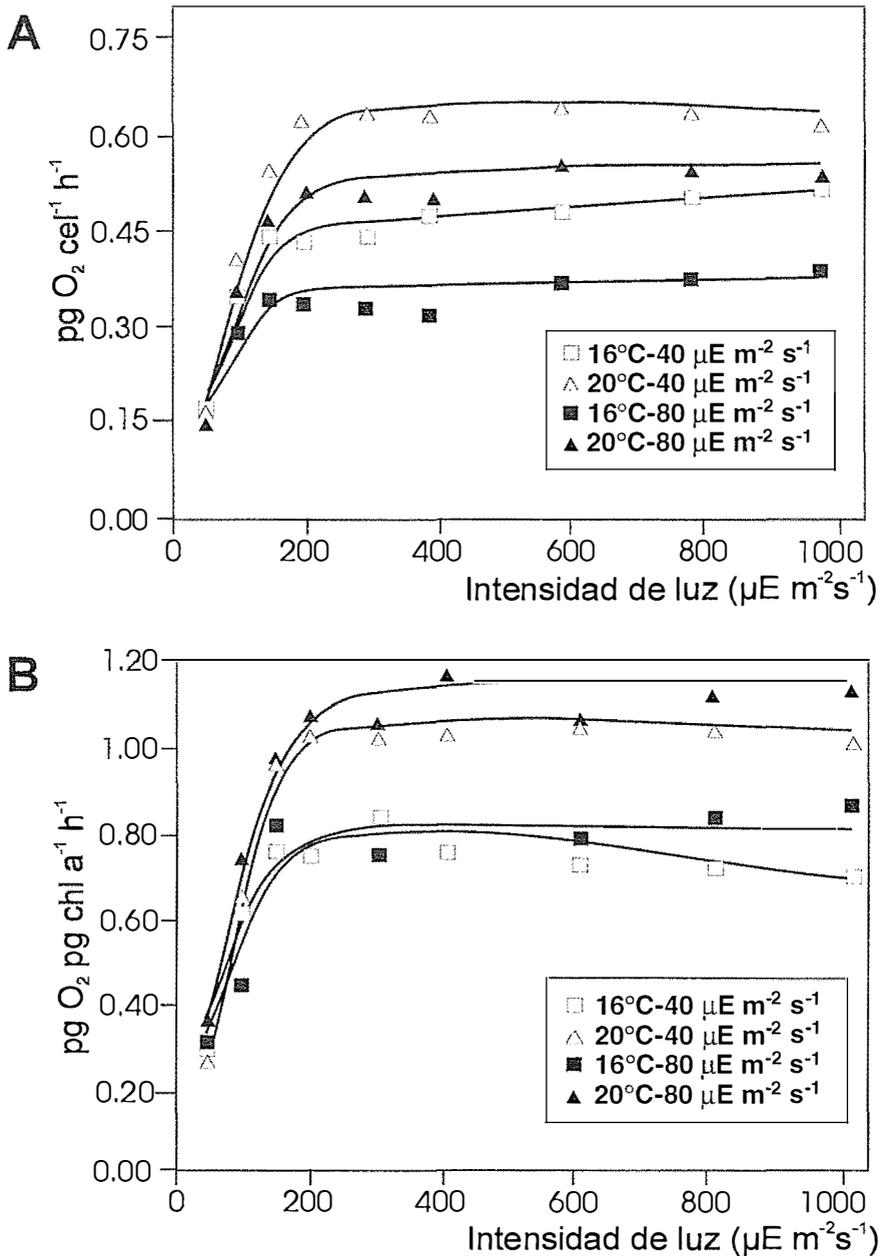


Figura 11.-Efecto de la temperatura sobre la tasa de fotosíntesis de *Phaeodactylum tricornutum* preadaptadas a altas y bajas intensidades de luz. A: tasas de fotosíntesis por célula; B: tasas de fotosíntesis por unidad de clorofila *a* (López-Muñoz *et al.*, 1992b)

Para mantener constante la temperatura de cultivo es necesario la utilización de cámaras de cultivo, con sistemas de refrigeración y/o calefacción, con el consiguiente coste. En los cultivos exteriores los problemas respecto a la temperatura se deben a las diferencias día-noche, estacionales, condiciones meteorológicas, humedad relativa, etc.

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 normalmente se resuelve mediante el control de la temperatura ambiental, utilizando aire acondicionado, pantallas aislantes transparentes entre los cultivos y las lámparas, o enfriamiento directo de los cultivos con agua (Laing y Ayala, 1990)

En cultivos exteriores con iluminación natural, hay menos oportunidad para el control de la temperatura de cultivo, con variaciones diurnas y anuales. Sin embargo, se han diseñado sistemas tanto para enfriar los cultivos exteriores en verano, usando un flujo de agua de mar en un baño alrededor de los tanques de cultivo, como para mantener la temperatura de los cultivos en invierno, instalando los tanques en un invernadero, que puede calentarse cuando sea necesario. Un método novedoso de control de temperatura en cultivos en bolsas exteriores de *Spirulina* ha sido usar agua geotermal (Bedell, 1985).

En tanques exteriores con agua de mar fertilizada para favorecer blooms de microalgas, la composición de especies de los cultivos puede ser afectada por la temperatura del cultivo. Temperaturas superiores a 27°C generalmente favorecen las cianobacterias (Regan e Ivancic, 1984)

La temperatura óptima en cultivo por lo general es mayor que la temperatura máxima a la cual el organismo se encuentra creciendo en la naturaleza. Esta observación no necesariamente significa que las algas estén limitadas por la temperatura en su ambiente natural, ya que con frecuencia son limitadas por la baja intensidad de luz o la deficiencia de nutrientes.

pH

El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo microalgal.

Las membranas plasmáticas de las células microalgales no son libremente permeables a los iones hidrógeno e hidroxilo, por lo tanto las concentraciones de hidrogeniones intracelular y extracelular no están necesariamente equilibradas y existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana.

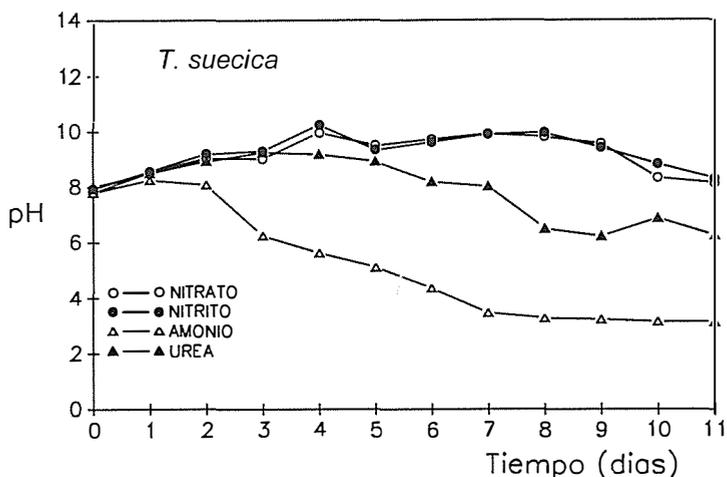


Figura 12.- Valores de pH en cultivos masivos de *Tetraselmis suecica* con distintas fuentes de nitrógeno (Fidalgo, 1990)

Las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Cada microalga presenta un pH óptimo para su cultivo (entre 7 y 8). Un descenso de pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH, hasta un cierto límite (Richmond, 1986).

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 (Bentrup, 1971). 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. Por otra parte, algunos autores aportan datos de la influencia del pH en la composición bioquímica de ciertas diatomeas (Patrick, 1968)

A su vez, el pH se ve afectado por la capacidad tampón y composición del medio de cultivo, cantidad de dióxido de carbono disuelto, temperatura -que a su vez controla la solubilidad del CO_2 - y actividad metabólica de las células microalgales; la fuente de N suministrada para el crecimiento juega un papel interactivo muy importante (Raven, 1988)

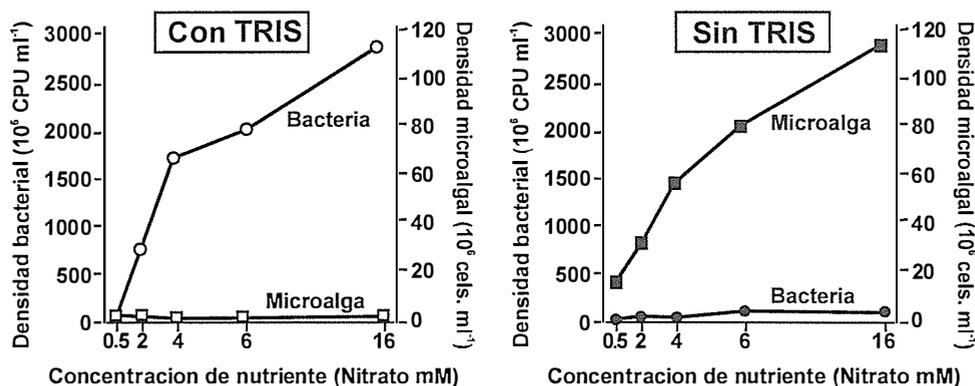


Figura 13.- Efecto del TRIS en el medio de cultivo sobre las densidades celulares de bacterias y microalgas en la fase estacionaria del cultivo (Fábregas *et al.*, 1993).

La asimilación de nitrato y amonio está estrechamente relacionada con el pH del medio, dado que la absorción de nitrógeno cambia el pH (Fig. 12). La asimilación de nitrato tiende a aumentar el pH (Brewer y Goldman, 1976). Cuando se utiliza amonio como única fuente de nitrógeno, el pH del medio puede disminuir rápidamente hasta niveles de pH 3.0, causando efectos deletéreos colaterales. Se ha publicado repetidamente que altas concentraciones de amonio durante un periodo de tiempo corto son útiles para eliminar la contaminación por especies herbívoras zooplanctónicas. Sin embargo, algunas microalgas son sensibles a elevadas concentraciones de amonio y su crecimiento puede inhibirse por concentraciones de amonio 1mM. Este descenso del pH podría ser la razón por la cual se produce la inhibición del crecimiento observada en algunas microalgas cuando la concentración de amonio en el medio es muy elevada, por ejemplo, un aumento del pH intracelular a causa de la entrada de moléculas de hidróxido amónico no disociadas (Kaplan *et al.*, 1986)

Es por esto que el pH de un cultivo varía con el desarrollo del mismo, aún en el caso de cultivos fuertemente tamponados. El crecimiento fotosintético de las microalgas provoca cambios en el pH del medio, y si éste aumenta hasta pH 9 el carbonato puede precipitar, lo que conlleva una retirada de nutrientes del medio.

El pH del cultivo depende de la capacidad tampón del medio; los tampones utilizados suelen ser orgánicos y provocan un aumento del crecimiento bacteriano (Fábregas *et al.*, 1993) (Fig. 13). La utilización de estos tampones se evita con el burbujeo del cultivo con aire o con CO₂.

SALINIDAD

La concentración de sales inorgánicas disueltas, tanto en las aguas dulces como marinas, puede potencialmente afectar al crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica. La tolerancia a la sal varía según las especies, algunas sólo pueden tolerar concentraciones milimolares de sal mientras que otras sobreviven en soluciones saturadas. Lo que supone un estrés salino letal para un grupo es fácilmente tolerado por otro grupo. Respecto a la adaptación a la salinidad, las algas pueden dividirse en halotolerantes y halofílicas.

Sin embargo, el efecto de la salinidad adquiere mas influencia cuando se relaciona con otras variables, como temperatura, luz, fuente de nitrógeno y concentración de nutrientes (Terlizzi y Karlander, 1980; Fábregas *et al.*, 1984, 1985, 1986).

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. Los solutos orgánicos, compatibles con los procesos metabólicos, son las principales moléculas osmóticas que se utilizan. Sintetizan varios solutos, entre ellos polioles como el glicerol, manitol y sorbitol, así como también prolina, manosa, sacarosa o isofloridósido, sin patrón filogenético evidente (Greenway y Setter, 1979). El potasio y quizá otros iones inorgánicos que se pueden encerrar en la vacuola, participan también en el proceso de osmorregulación, especialmente en las células con pared celular y grandes vacuolas (Ahmed y Hellebust, 1986; Ehrenfeld y Cousin, 1982). Esta respuesta osmorregulatoria es un factor fundamental para la supervivencia. La osmorregulación puede ser explotada comercialmente en ciertas especies de microalgas para inducir la síntesis de elevadas cantidades de solutos orgánicos de valor comercial (glicerol, β -caroteno) (Borowitzka, 1988a; Ben-Amotz y Avron, 1989).

La osmorregulación se ha estudiado con mayor detalle en varios flagelados verdes desnudos, (por ejemplo, ciertas especies de *Dunaliella*) que son extremadamente eurihalinos (Avron, 1992). En respuesta a un aumento repentino de la concentración iónica de su ambiente, estas algas pierden agua rápidamente y se contraen, concentrando sus solutos internos durante dicho proceso. Al cabo de unas cuantas horas sintetizan varios polioles y lentamente vuelven a obtener su tamaño original. Cuando las células se exponen a una disminución repentina de la salinidad de su medio, no estallan debido a que los solutos salen rápidamente de ellas antes de que el influjo de agua rompa su membrana. La recuperación de la célula, incluyendo el retorno de la permeabilidad normal de la membrana,

ocurre al cabo de varias horas, siempre que el choque no haya sido muy fuerte. En respuesta a una dilución menos severa, los solutos orgánicos son metabolizados hasta que se alcance el adecuado equilibrio osmótico.

La osmorregulación no es el único efecto provocado por la salinidad. La respuesta a salinidades elevadas implica algunos cambios fisiológicos en las células microalgales, tales como la pérdida de la actividad fotosintética (Gimmler *et al.*, 1981). Un hecho importante de la respuesta adaptativa de las células algales al estrés salino es que éste proporciona resistencia a otras condiciones de estrés, como calor, temperatura bajo cero o baja actividad del agua.

Las microalgas en general y particularmente las marinas pueden tolerar un amplio rango de salinidades. Su valor habitual en el agua de mar es de 35‰, aunque pueden producirse fuertes variaciones que normalmente son soportadas por las especies (Fábregas *et al.*, 1985; Laing y Ayala, 1990). Por tanto, la salinidad por sí sola no es un factor fuertemente condicionante, pero asociado a otros factores puede ser importante. Como consecuencia de esto, se ha dirigido poco esfuerzo investigador al efecto de las variaciones de la salinidad sobre el crecimiento de cultivos de microalgas marinas que otros factores que afectan a la productividad.

Estudios sobre el efecto de la salinidad sobre distintas especies de microalgas marinas muestran que el rango óptimo de salinidades a las que crecen estas microalgas es variable ya que algunas especies sólo crecen entre 10 y 35‰ de salinidad (*D. tertiolecta*) y otras presentan un rango mayor no existiendo diferencias de crecimiento entre 0 y 35‰ de salinidad (*Ch. stigmatophora*), estando generalmente los valores óptimos entre 25-35‰ (Fábregas *et al.*, 1986, 1987). Sin embargo, en el Fisheries Laboratory, Conwy, los flagelados marinos unicelulares crecen mejor a 20-25‰ y las diatomeas a 15-20‰. Incluso se han realizado cultivos masivos de *Tetraselmis* a salinidades entre 15 y 35‰ (Laing y Ayala, 1990).

La salinidad es un factor a tener en cuenta, sobre todo en sitios cerrados como bahías, rías, estuarios, caños, etc. a la hora de tomar agua, y que puede verse alterada en mayor o menor grado por la evaporación en el verano y el efecto de dilución durante la época de lluvias. No obstante, las microalgas marinas suelen ser en general tolerantes a los cambios de salinidad y entre 18 y 50 por mil se obtienen buenos crecimientos.

AGITACIÓN

Una suficiente agitación del medio de cultivo es necesaria e incide directamente en el cultivo de microalgas. Cuando los requerimientos están satisfechos y las condiciones ambientales son satisfactorias, la agitación constituye el requisito más importante para la obtención de altos rendimientos de biomasa microalgal (Richmond y Becker, 1986).

La agitación produce el movimiento del agua, lo que implica una serie de efectos positivos tales como (Richmond, 1986b, 1990; Raven, 1988; Laing y Ayala, 1990; Becker, 1994):

- 1.- Asegurar una distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, con los nutrientes rápidamente disponibles para las células. La necesidad de una distribución uniforme de los minerales en el medio implica la prevención de gradientes nutricionales alrededor de las células microalgales que se forman durante los periodos de metabolismo activo. Tales gradientes imponen restricciones en el crecimiento y se evitan con una turbulencia suficiente. Una célula que se mantiene estática en el agua agota rápidamente los nutrientes presentes en la microcapa en torno a ella, lo cual hace que disminuyan las tasas de absorción de éstos a medida que la microcapa se reabastece lentamente por difusión de los nutrientes provenientes del agua de los alrededores. Conforme la célula se sumerge o emerge de la columna de agua, produciendo turbulencia y renovando el agua próxima a ella, los microgradientes se interrumpen, la superficie celular se expone a una mayor concentración de nutrientes y las tasas de absorción son mayores.
- 2.- Mejorar la distribución de la luz a las células asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas.

La agitación evita el efecto de ensombrecimiento, debido a que causa un continuo cambio de posición relativa de las células con respecto a la zona fótica. 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 (hasta dos órdenes de magnitud para un cultivo con 0.99 de fotones incidentes).

Una agitación adecuada del cultivo permite un movimiento rápido de las células desde la zona iluminada (zona fótica) a la zona profunda (oscura) del tanque de cultivo, y la vuelta a la zona iluminada, lo que produce un patrón dinámico de luz-oscuridad para las células individuales. El fenó-

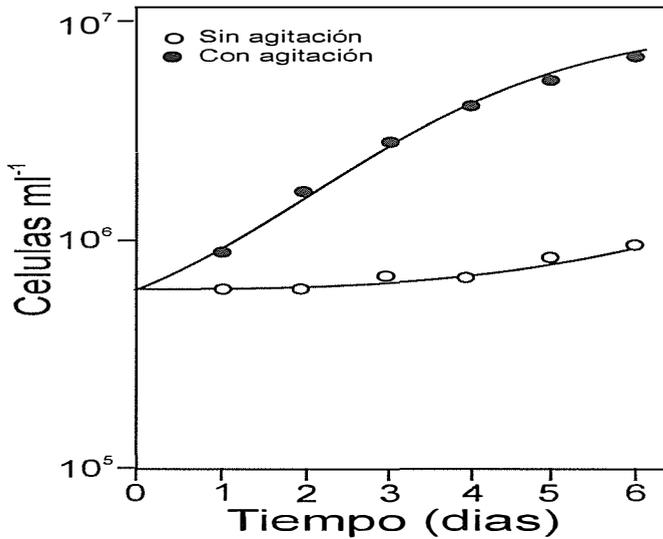


Figura 14.- Efecto de la agitación mecánica sobre el crecimiento microalgal (modificado de Kaplan *et al.*, 1986)

meno del ensombrecimiento mutuo, el continuo cambio entre las fases de oscuridad y luz, representa uno de los requerimientos más básicos para una elevada productividad de biomasa.

Por otra parte, la agitación rápida evita los efectos fotoinhibitorios que se producirían en un cultivo no agitado sobre aquella parte de la población que estuviera continuamente expuesta a la intensidad incidente completa.

- 3.- Evitar que las células sedimenten en el fondo del recipiente de cultivo, produciendo una estimulación general del metabolismo celular .
- 4.- Otra razón para mantener la agitación se relaciona con los gradientes gaseosos que se forman alrededor de las células microalgales en el curso de su actividad metabólica. Estos gradientes imponen restricciones a la tasa de crecimiento de un cultivo. Una alta densidad de células fotosintéticamente activas provoca concentraciones extremadamente altas de O₂ disuelto; durante las horas de fotosíntesis máxima y en condiciones de estancamiento, es muy común que se produzca una supersaturación de oxígeno por encima del 400%. Muchas microalgas presentan una clara sensibilidad a concentraciones de O₂ elevadas. Es bien conocida la inhibición de la fotosíntesis en microalgas por concentra-

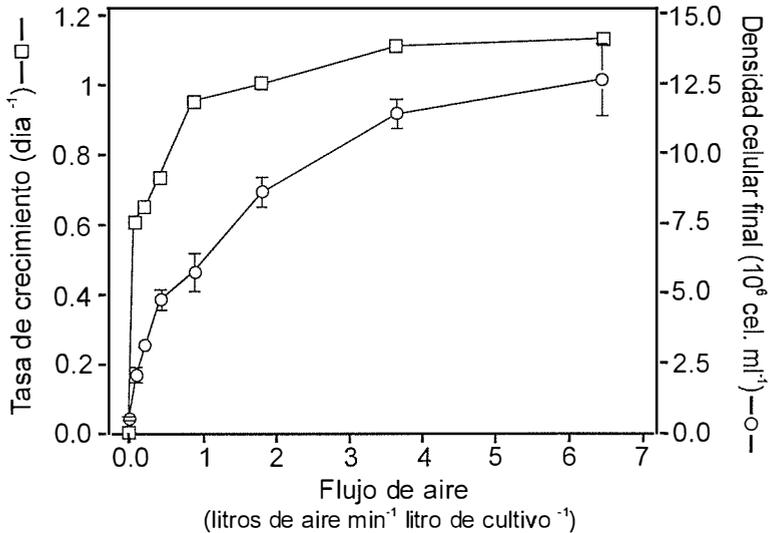


Figura 15.- Efecto de la tasa de aireación sobre el crecimiento de la microalga marina *P. tricornutum* (Fábregas *et al.*, 1994b)

ciones de oxígeno superiores a las del aire, especialmente cuando la concentración de CO₂ es baja. La agitación disminuye la tensión de O₂ en el cultivo.

5.- Prevenir una estratificación termal. En los tanques de cultivo sin agitación puede llegar a haber diferencias de hasta 8°C entre la superficie y el fondo del cultivo. Por su densidad específica, el agua caliente permanece en la superficie y en esta capa las algas reducen la cantidad de iones bicarbonato lo que implica un aumento del pH, alrededor de 10. En estas condiciones los nutrientes esenciales precipitan, llevando parte de las algas al fondo. Con este aclaramiento de la capa superficial del medio la siguiente capa en profundidad se ve expuesta a la luz y comienza la misma secuencia; como resultado, la mayoría de las algas precipitan y forman grandes aglomeraciones en el fondo, a partir de las cuales se desprenden "escamas" que suben a la superficie, dónde se convierten en anóxicas y con olor desagradable.

Si la velocidad de mezclado es demasiado lenta, las algas muertas y otras formas de basura orgánica se depositan en el fondo, fundamentalmente en las áreas donde la turbulencia es pequeña. La formación de estas zonas de

estancamiento conducirán a la formación de condiciones anaerobias, que tienen como efecto el deterioro celular y la reducción del rendimiento y calidad de la biomasa microalgal. En determinadas circunstancias se pueden formar compuestos tóxicos a partir de la descomposición del material orgánico, causando la pérdida de todo el cultivo.

La agitación puede conseguirse por varios métodos, que suelen conllevar un gasto energético, como agitación mecánica (palas, hélices, etc.), bombas de aire ("air-lift pumps"), o aireación (De la Noüe y De Pauw, 1988).

Todos estos métodos son igualmente efectivos para la agitación del cultivo pero la aireación es el método más utilizado dado que el aire puede ser utilizado como gas portador si se necesita suministrar CO_2 . La tasa de mezcla puede proporcionar algún control sobre la composición de especies de blooms microalgales en cultivos en tanques exteriores y puede ser útil para suprimir especies indeseables. A veces, se utilizan simultáneamente la agitación mecánica y la aireación (Märkal y Mather, 1985; Becker, 1994).

En experiencias con *P. tricornutum* se estudiaron diferentes tasas de aireación (sin suministro de CO_2), encontrando que tanto la tasa de crecimiento como la densidad celular final aumentan con el flujo de aire y el suministro de CO_2 , siendo ambos mecanismos saturables (Fig. 15). La tasa de aireación y suministro de CO_2 se relaciona asimismo con el pH del medio (Fábregas *et al.*, 1994b).

Generalmente, el suministro de aire se enriquece con un 1-2% de dióxido de carbono. La figura 16 muestra los efectos de la aireación con diferentes suplementos de CO_2 sobre el crecimiento de *Scenedesmus*. Un suplemento de CO_2 , ya sea suministrado directamente o mezclado con el aire utilizado para la aireación, aumenta enormemente la productividad de los cultivos masivos de microalgas. Actúa como fuente de carbono para la fotosíntesis y ayuda a mantener el pH de los cultivos en el rango 7.5-7.8 (Laing y Ayala, 1990). La cantidad precisa para mantener el pH a 7.5-7.8 puede ser monitorizada con medidores de flujo en el aire y líneas de suministro de CO_2 . El pH de los cultivos sin suplemento de CO_2 aumenta rápidamente debido a la retirada del CO_2 de los iones bicarbonato. Esto reducirá el crecimiento celular y la tasa de división de la mayoría de las especies microalgales aunque unos pocos tipos como *Phaeodactylum* pueden tolerar altos niveles de pH (Goldman *et al.*, 1988). Cuando el pH es superior a 10, el CO_2 libre en solución formará precipitados insolubles como carbonato cálcico y esto puede ser un problema en los sistemas de cultivo masivo (Dickson, 1987).

El aire puede ser suministrado por un compresor. El CO_2 puede ser

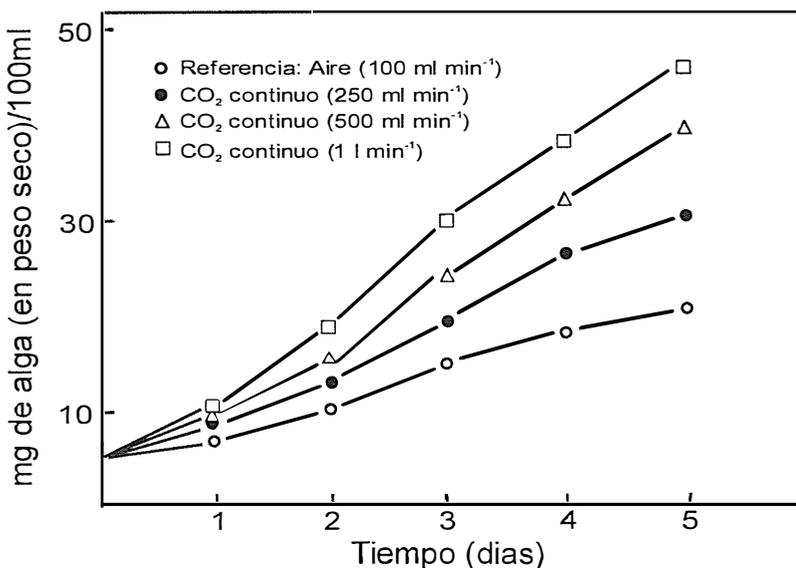


Figura 16.- Efecto de distintas concentraciones de CO₂ sobre el crecimiento de *Scenedesmus* (modificado de Becker y Venkataraman, 1982)

suministrado a partir de balas con el gas comprimido con reguladores o como producto intermedio de procesos fermentativos (Soeder, 1980). El método de introducir aire/CO₂ a los cultivos masivos de microalgas debe ser cuidadosamente diseñado para que el CO₂ se utilice eficientemente y se minimicen las pérdidas, idealmente a menos del 3% (Maerkl y Mathed, 1985).

EVAPORACIÓN Y PRECIPITACIÓN

El cultivo de microalgas en áreas tropicales tiene un importante problema que es el de la evaporación, superior a 10 L m⁻² d⁻¹, lo que aumenta la concentración de sales en el medio y hace necesaria la adición de suficiente agua para contrarrestar la pérdida, con los consiguientes problemas que esto supone. En las zonas tropicales donde son frecuentes las lluvias, éstas provocan fuertes diluciones de los cultivos, pérdida de nutrientes e incluso de biomasa microalgal. Además de las pérdidas por evaporación, las condiciones climáticas también afectan a la temperatura del medio de cultivo. A baja humedad relativa del aire, las tasas de evaporación son mayores, lo cual provoca un enfriamiento del medio. Cuando la humedad relativa del aire es alta y no hay viento, el medio puede llegar a alcanzar los 40°C, temperatura letal para la mayoría de las especies microalgales.

Es aconsejable que las áreas de cultivo de algas tengan una humedad media relativa inferior al 60% (Becker, 1994).

TAMAÑO DE INÓCULO Y DENSIDAD DE POBLACIÓN ÓPTIMA

En el momento de abordar un cultivo de microalgas uno de los factores a considerar es la concentración inicial óptima o tamaño del inóculo, que juega un importante papel en el desarrollo ulterior del cultivo. Concentraciones demasiado bajas pueden perderse por fotooxidación u otras causas, mientras que si son demasiado altas se producen pérdidas debido a la respiración o a una ineficiente utilización de la energía lumínica, debido al propio ensombrecimiento. Si el inóculo es demasiado grande no compensa económicamente.

El inóculo inicial debe estar constituido por células de una sola especie (no contaminado) en buen estado. La calidad del inóculo debe comprobarse en cada paso de las distintas escalas de cultivo.

Referido a cultivos masivos, es importante el concepto de densidad de población óptima. Puede definirse como la densidad celular que produce la máxima tasa de cosecha ("output") de biomasa o del producto deseado bajo unas determinadas condiciones ambientales (Richmond, 1990). A elevadas densidades celulares se observa una fuerte caída en la cosecha, lo que se explica por un severo descenso de la tasa de crecimiento debido a que el mutuo ensombrecimiento es máximo, no recibiendo cada célula la intensidad de luz suficiente. Del mismo modo, si la densidad de población es menor a la óptima hay un descenso en la cosecha debido aparentemente a un aumento de la fotoinhibición, que es más severo a medida que el ensombrecimiento mutuo desciende; además, al descender la población la utilización de intensidades de luz por encima de nivel de saturación hace que el proceso sea menos eficiente. Es por esto, que la densidad de población óptima normalmente representa la eficiencia fotosintética máxima, aunque la tasa de crecimiento específica es aproximadamente la mitad de la máxima, debido a que el crecimiento está limitado por la luz (Richmond, 1990). La densidad de población óptima varía entre especies, con las condiciones climáticas, tipo de cultivo, tipo de reactor, por lo que debe ser determinada en cada caso para mantener un cultivo en su máxima tasa de cosecha.

NUTRIENTES

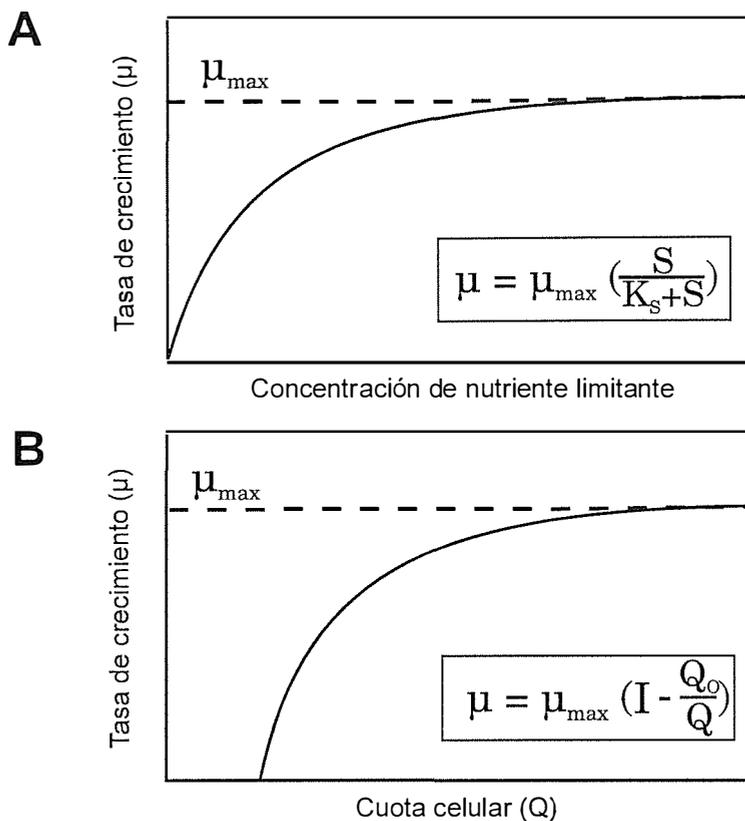


Figura 17.- Relación entre tasa de crecimiento y limitación de crecimiento. A: modelo de Monod; B: modelo de Droop.

Para un crecimiento óptimo, debe suministrarse al cultivo nutrientes en cantidades adecuadas. Hay muchas variaciones en los requerimientos nutritivos (en cantidad) entre las distintas especies y dentro de cada especie varían en función de distintas condiciones ambientales, como luz, temperatura, pH. Si las condiciones permiten una tasa de crecimiento alta los requerimientos nutritivos son mayores. 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. A causa de la importante variabilidad de estos factores, las concentraciones de nutrientes aportadas para el crecimiento y desarrollo microalgal han variado considerablemente. Para

alcanzar una productividad máxima, en cultivos microalgales masivos se han sugerido, por ejemplo, concentraciones óptimas entre 2 y 619 mg de N por litro (Eyster, 1967; Shelef *et al.*, 1980).

La absorción de los nutrientes ocurre 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. La tasa de absorción está relacionada con la concentración extracelular del nutriente a través de una función hiperbólica que se describe empíricamente por la expresión de Michaelis-Menten para la cinética enzimática:

$$V = V_m [S / (K_s + S)],$$

dónde V es la tasa de absorción del nutriente, V_m la tasa máxima de absorción del nutriente, S la concentración del nutriente y K_s la constante de saturación media o concentración del sustrato a la cual $V = V_m / 2$.

Por analogía con la cinética enzimática, se piensa que la constante K_s refleja la afinidad del sistema enzimático por el sustrato; una K_s menor sugiere una mayor afinidad por el sustrato y por lo tanto una incapacidad para absorber los nutrientes a bajas concentraciones de sustrato (Darley, 1982).

En general, la relación entre las tasas de crecimiento del fitoplancton y la limitación de los nutrientes se puede describir por medio de una de dos funciones hiperbólicas (Fig. 17) (Kaplan *et al.*, 1986):

- 1.- En algunos estudios, se ha encontrado que la misma relación que se utiliza para describir la cinética de absorción relaciona también la tasa de crecimiento a la concentración del nutriente en el medio. Esta es la ecuación de Monod o modelo de control del nutriente externo:

$$\mu = \mu_{\max} [S / (K_s + S)],$$

dónde μ es la tasa específica de crecimiento, μ_{\max} la tasa máxima específica de crecimiento, S la concentración del sustrato y K_s la constante de saturación media.

- 2.- En otros estudios, se observa que la tasa de crecimiento se relaciona con la concentración celular del nutriente limitante más que con su concentración externa. Esta es la ecuación de Droop o modelo de control del nutriente interno:

$$\mu = \mu_{\max} [I - (Q_0 + Q)],$$

dónde Q es la cuota celular del nutriente limitante (es decir, la cantidad

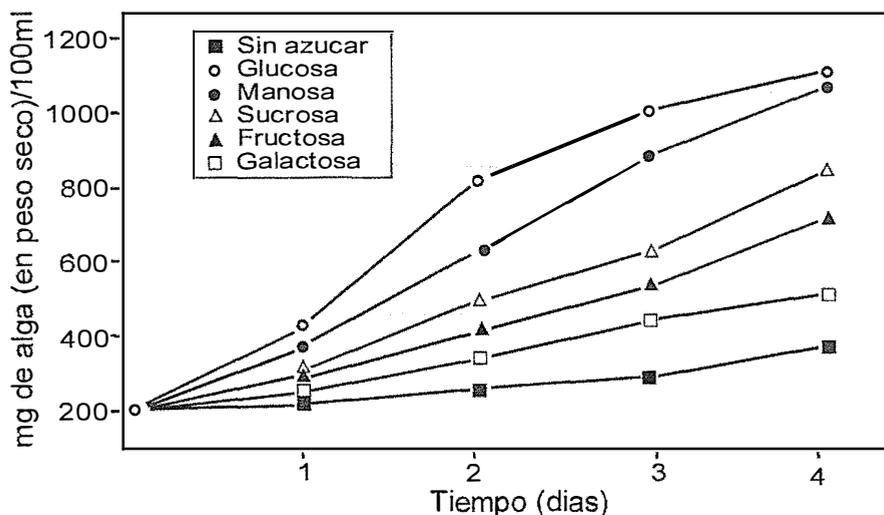


Figura 18.- Crecimiento de *Scenedesmus* con la adición de varios azúcares (modificado de Becker, 1994)

total del nutriente limitante, en todas sus formas, en la célula), Q_0 la cuota mínima celular (es decir, la cuota de subsistencia o menor nivel de Q al cual la célula puede crecer) y μ_{max} la tasa específica de crecimiento cuando Q es infinita.

Bajo condiciones de estado estable, ambas ecuaciones describen igualmente bien el crecimiento limitado por nutrientes debido a que 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 inciden en la velocidad de crecimiento y en la composición bioquímica de las células en cultivo. En función de las cantidades requeridas se dividen en macronutrientes y micronutrientes. Macronutrientes son aquellos que forman parte de las moléculas estructurales de las microalgas y, por tanto, se requieren C, N, O, H y P, además de Ca, Mg, S y K. Los micronutrientes son aquellos que se requieren en cantidades mínimas y forman parte de moléculas esenciales, como factores de crecimiento o enzimas, o son necesarios para la activación de ciertas enzimas. Generalmente se requieren como micronutrientes Fe, Mn, Cu, Mo y Co. A veces se requieren bajas concentraciones de vitaminas, sobre todo tiamina, biotina y B_{12} . Además de los requerimientos de tipo general, ciertos

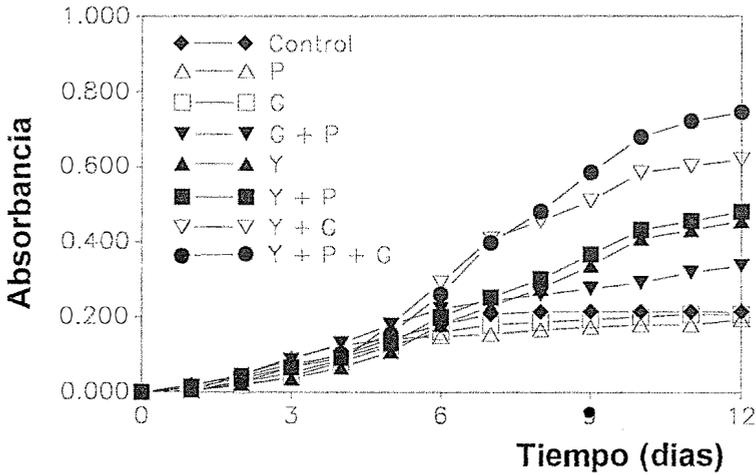


Figura 19.- Cultivos mixotróficos de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. P: peptona; G: glucosa; Y: extracto de levadura (Cid *et al.*, 1992a)

grupos pueden tener requerimientos específicos, como es el caso de las diatomeas y el silicio.

FUENTE DE CARBONO

El macronutriente más importante es el carbono que constituye el 50% de la biomasa microalgal. El crecimiento microalgal está limitado por la fuente de carbono y se ha utilizado como tal carbono orgánico e inorgánico.

La fuente principal de carbono es el CO₂ aunque algunas microalgas pueden utilizar compuestos orgánicos (cultivos heterótrofos y mixotróficos). El CO₂ es la fuente de carbono celular durante el crecimiento fotoautotrófico característico de las microalgas. En algunas microalgas (fotoautótrofas obligadas) es el único compuesto de carbono que pueden utilizar para el crecimiento (Kaplan *et al.*, 1986).

El CO₂ se suministra generalmente mezclado con aire, produciendo un burbujeo que sirve también de agitación. Las técnicas para el suministro de CO₂ representan un elemento importante en el cultivo a gran escala de microalgas. Se producen pérdidas a la atmósfera difíciles de controlar, sobre todo en piscinas donde, debido a la poca profundidad de los recipientes las burbujas no permanecen en fase líquida durante el tiempo suficiente para que el CO₂ se disuelva (Becker, 1994).

La mayoría de las microalgas tienen en el medio, aparte del CO₂, CO₃H₂ y

sus iones CO_3H^- y CO_3^{2-} y sus proporciones dependen del pH, de modo que según aumenta éste las proporciones de HCO_3^- y CO_3^{2-} aumentan en relación al CO_2 disuelto. El CO_2 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. No todas las microalgas son capaces de utilizar el HCO_3^- como una fuente de C, pues la incorporación de CO_3H^- en cantidad suficiente para soportar la fotosíntesis requiere transporte activo del bicarbonato y/o ser disociado por una anhidrasa carbónica (Boney, 1989). En poblaciones microalgales densas, la propia actividad fotosintética tenderá a reducir el nivel de CO_2 y aumentar la alcalinidad, pudiendo alcanzarse niveles 0 de CO_2 , especialmente si la temperatura es templada, volviéndose limitante para las microalgas incapaces de utilizar bicarbonato.

Carbono orgánico

La mayor parte del carbono microalgal puede ser proporcionado como solutos orgánicos, como glucosa y acetato, en el medio mejor que el CO_2 en fase gas. Se conocen microalgas presumiblemente fotoautótrofas obligadas capaces de crecer en oscuridad con glicerol y otras capaces de utilizar no solo azúcares y acetato sino incluso ácido pirúvico y ácido láctico. Hoy en día, se admite que la mayoría de las microalgas quimiolitotrofas pueden utilizar acetato. Ahora bien, el rango de sustratos utilizados varía de una especie a otra, y cepas muy próximas entre sí pueden diferir mucho en sus preferencias. Respecto a los sustratos, ácidos grasos, aminoácidos y alcoholes también han sido utilizados en algunos casos (Kaplan *et al.*, 1986).

De las microalgas que utilizan azúcares como sustrato, el más disponible y, por tanto, más utilizado es la glucosa, y después galactosa y fructosa; pero los disacáridos son menos disponibles y menos utilizados. La figura 18 muestra el crecimiento de *Scenedesmus* con diferentes azúcares. Entre los alcoholes, el glicerol es comúnmente utilizado (Becker y Venkataraman, 1982).

La falta de versatilidad en la utilización de sustratos orgánicos como fuente de carbono para las microalgas parece ser consecuencia de restricciones en la permeabilidad. Por ejemplo, la sacarosa no sirve como fuente de carbono en *Chlorella* pero se encuentra dentro de la célula. De igual forma, otros muchos compuestos orgánicos que no sirven como fuentes de carbono han sido identificados como metabolitos intermediarios (Samejima y Myers, 1958).

Los rendimientos obtenidos en cultivos mixotróficos con glucosa o acetato como fuente de C son 2-3 veces superiores a los de los cultivos fototróficos. No obstante, esto incrementa notoriamente los costes de producción.

No todas las especies microalgales pueden crecer mixotróficamente. En cultivos mixotróficos de distintas microalgas marinas, los mejores resultados se obtuvieron con *Tetraselmis suecica* (Cid *et al.*, 1992a), una de las especies más utilizada en acuicultura de moluscos y crustáceos. Se utilizaron 3 compuestos orgánicos: glucosa, extracto de levadura y peptona, ensayándose cada uno de ellos por separado y en combinaciones de dos o de tres. Los cultivos se realizaron a una intensidad de luz 12 veces menor que la utilizada en cultivos fotoautotróficos de esta microalga. Los resultados muestran que la adición de extracto de levadura solo o en combinación con glucosa y/o peptona mejoran significativamente el crecimiento, obteniéndose densidades celulares tres veces superiores a los obtenidos para esta misma especie en cultivos fotoautotróficos en condiciones similares pero con una intensidad de luz doce veces mayor.

Ensayos con otros azúcares, como fructosa, sacarosa y manosa, así como con aminoácidos mostraron que sólo la fructosa presenta un claro efecto estimulador del crecimiento (Cid *et al.*, 1992b).

NITRÓGENO

El siguiente elemento en importancia es el nitrógeno, ya que después del carbono es cuantitativamente el elemento que tiene una mayor contribución a la materia seca de las células microalgales (Vaccaro, 1965??). La fuente de nitrógeno utilizada suele ser inorgánica (nitratos, nitritos y amonio) (Antia *et al.*, 1985; Fisher y Cowdell, 1982; Kaplan *et al.*, 1986), aunque a veces se utiliza nitrógeno orgánico y en este caso el compuesto más comúnmente utilizado es la urea (Neilson y Larson, 1980?). El nitrógeno es uno de los elementos que más influye en la composición bioquímica (Boussiba y Richmond, 1980; Shifrim y Chisholm, 1980; Rajasekaran *et al.*, 1981; Utting, 1985; Cohen, 1986; Vieira y Klaveness, 1986).

Cuando el nitrógeno se incorpora en forma oxidada, como nitrato o nitrito, debe ser reducido antes de que pueda incorporarse en moléculas orgánicas. La reducción del nitrato ocurre en dos pasos catalizados por la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR).

El amonio puede ser utilizado por la mayoría de las microalgas. Cuando a un cultivo de microalgas se le suministra amonio y nitrato como fuente de nitrógeno, el nitrato normalmente no es utilizado hasta que todo el amonio ha sido consumido. En numerosas algas y plantas superiores se sabe que el amonio inhibe la incorporación de nitrato del medio por tres mecanismos diferentes: represión de la formación de un nuevo transportador de nitrato y de nueva nitrato reductasa; inhibición del transportador y de la nitrato reductasa por el propio

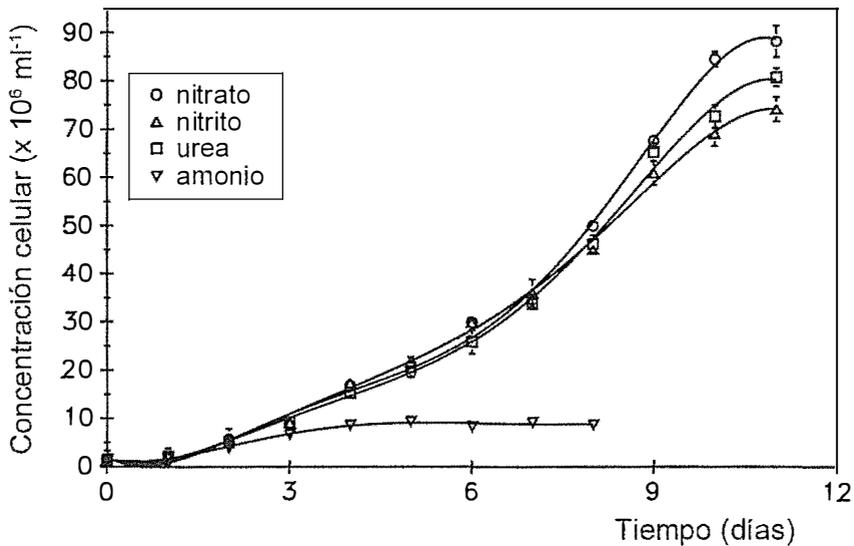


Figura 20.- Crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con distintas fuentes de nitrógeno (Fidalgo *et al.*, 1994).

amonio o uno de sus productos; e inhibición física del mecanismo de incorporación de nitrato por una reducción severa del potencial de membrana, acompañada de una modificación del pH interno de la célula. Estos dos últimos procesos son casi instantáneos y pueden explicar por qué la inhibición finaliza cuando se consume o se retira el amonio (Beevers y Hageman, 1983; Ullrich, 1983). La preferencia del amonio sobre el nitrato en las microalgas es debida a que la incorporación de nitrato supone un gasto de energía ya que debe ser reducido a amonio por la célula, mientras que el amonio es un compuesto reducido y entra a formar parte directamente de las moléculas orgánicas, incorporándose en aminoácidos (Bertl *et al.*, 1984; Ullrich *et al.*, 1984).

Algunas microalgas son sensibles a altas concentraciones de amonio y concentraciones de amonio 1 mM pueden inhibir su crecimiento. La razón de la inhibición por el amonio es desconocida, pero puede estar relacionada con un aumento del pH interno, debido a la penetración de moléculas de hidróxido amónico no disociadas (Morris, 1974). Por encima de pH 7, el NH₃ libre se hace disponible, y la difusión de éste aumentará el pH interno, a diferencia del NH₄⁺. Cuando se utiliza amonio como única fuente de nitrógeno, la incorporación de éste por las células microalgales es acompañada por la producción de hidrogeniones (H⁺) (Ullrich *et al.*, 1984), provocando un fuerte descenso del pH del medio

(Brewer y Goldman, 1976) y la muerte celular, como ya vimos antes al hablar del pH.

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 (Morris, 1974; Cresswell y Syrett, 1982).

La asimilación del nitrógeno inorgánico es fuertemente dependiente de la luz, y 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^- , o de la reducción del NO_3^- a través de la regulación de la síntesis y actividad de la enzima NR. Mientras la luz roja absorbida por los fitocromos parece inducir la síntesis de NR, la luz azul absorbida por las flavinas actúa mediante la activación del enzima inactivo ya existente (Maldonado y Aparicio, 1987).

La luz estimula la incorporación y asimilación de nitrógeno inorgánico por las microalgas, probablemente de varias formas. Una puede ser por fotorreducción directa del compuesto de nitrógeno, afectando principalmente al paso de la reducción del nitrito, que requiere ferredoxina (Thomas *et al.*, 1976). Una segunda forma en que la luz puede estimular la incorporación y asimilación de nitrógeno es con el suministro de ATP vía fotofosforilación (Tischner y Lorenzen, 1979). Parece que el ATP es necesario para la incorporación de nitrato antes de la reducción, lo que sugiere que el nitrato entra en las células por mecanismo activo. Una tercera vía es más indirecta, a través de la producción fotosintética de compuestos de carbono para aceptar el nitrógeno reducido (Grant, 1968). Esta posibilidad se apoya en el hecho de que para obtener las tasas máximas de incorporación de nitrato, nitrito y amonio se necesita tanto luz como CO_2 . El requerimiento de CO_2 puede ser reemplazado por una fuente de C orgánico (Grant, 1968).

La capacidad de utilizar nitrógeno en forma orgánica está ampliamente extendida entre las microalgas. En general, las amidas, urea, glutamina y asparagina, resultan buenas fuentes de nitrógeno (Wheeler *et al.*, 1974; Neilson y Larson, 1980). Diversos aminoácidos, como glicina, serina, alanina, lisina, arginina, ácido glutámico o ácido aspártico, también pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno (Wheeler *et al.*, 1974; Flynn y Syrett, 1986), e incluso otros compuestos tales como purinas y sus derivados, xantina, hipoxantina, ácido úrico, alantoína, etc., pueden ser utilizados por algunas microalgas (Antia *et al.*, 1980; Kaplan *et al.*, 1986).

La urea es una buena fuente de nitrógeno para casi todas las especies de microalgas (Syrett, 1987) y el crecimiento obtenido en aquellas especies capaces

de utilizarla es similar al que se obtiene con fuentes inorgánicas (Kaplan *et al.*, 1986; Vieira y Klaveness, 1986). Generalmente, la urea es hidrolizada antes de que su nitrógeno se incorpore a las células microalgales. En las microalgas se conocen 2 enzimas que metabolizan la urea: la ureasa y la urea amidoliasa. Las microalgas que metabolizan la urea tienen ureasa o urea amidoliasa pero no ambas (Leftley y Syrett, 1973; Syrett, 1987).

Distintos resultados muestran que se produce gran variabilidad tanto en el crecimiento como en la composición bioquímica debido a las variaciones en la concentración de nitrógeno (Boussiba y Richmond, 1980; Shifrin y Chisholm, 1980; Rajasekaran *et al.*, 1982; Utting, 1985; Cohen, 1986; Kaplan *et al.*, 1986; Vieira y Klaveness, 1986; Vonshak, 1986; Wikfors, 1986; Fábregas *et al.*, 1989a, b; Sriharan *et al.*, 1989).

La utilización de distintas fuentes de nitrógeno varía según las especies (Fig. 20). En cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con distintas fuentes de nitrógeno los crecimientos fueron muy similares con nitrato, nitrito y urea, pero significativamente inferiores con amonio (Fidalgo *et al.*, 1990). En los cultivos con amonio se produce una importante acidificación del medio a partir del 4º día de cultivo, y las células cesan en su crecimiento debido a los valores de pH; por el contrario, en los restantes cultivos el pH se mantiene en valores aceptables y las células crecen hasta que entran en fase estacionaria por agotamiento del nitrógeno, según se deduce de la aplicación de la formulación logística. El crecimiento de *Tetraselmis suecica* con distintas fuentes de N se comporta de modo similar al de *P. tricornutum*, con valores similares para nitrato, nitrito y urea, y significativamente menor para el amonio en el que se produce de nuevo un importante descenso en el pH (Fidalgo, 1990). Por el contrario, en *Chaetoceros calcitrans* los mejores resultados se obtienen con el nitrito y nitrato, mientras que la urea dió resultados significativamente menores, muy similares a las obtenidas con el amonio (Fidalgo *et al.*, 1993).

En cuanto a las interacciones entre la fijación de CO₂ y la asimilación de nitrógeno, se pueden distinguir dos niveles: los efectos de la asimilación de nitrato y amonio en la fijación de CO₂ y el papel regulador del CO₂ en la asimilación del nitrato. Respecto a los primeros se sabe que la asimilación de nitrato produce una disminución en la fijación de CO₂ a bajas intensidades de luz (Romero y Lara, 1987); esto no ocurre cuando el nitrógeno se incorpora en forma de amonio porque el nitrato compite con el CO₂ por el poder reductor y el amonio no; además el ion amonio activa la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la piruvato quinasa (Bassham *et al.*, 1981; Kanazawa *et al.*, 1983). Por otro lado, la fijación de CO₂ interviene en los primeros pasos de la asimilación de nitrógeno, concretamente en el transporte

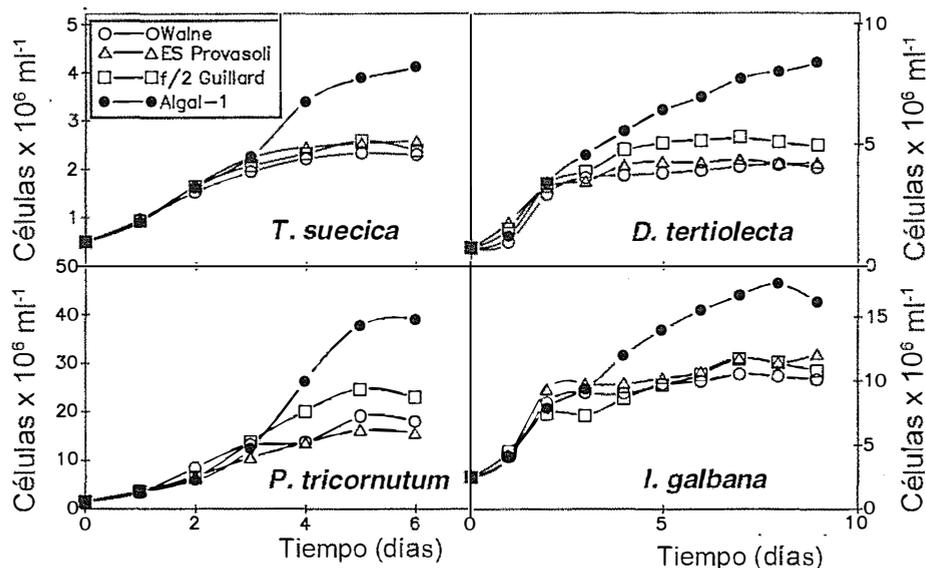


Figura 21.- Crecimiento de distintas microalgas marinas con diferentes medios de cultivo (Herrero *et al.*, 1991).

de nitrato (Lara *et al.*, 1987) y la actividad de la nitrato reductasa (Kaiser y Forster, 1989).

OTROS NUTRIENTES

El fósforo interviene en la mayoría de los procesos celulares de transferencia de energía y de síntesis de ácidos nucleicos. Como fuente de fósforo se utiliza fundamentalmente fosfato inorgánico. Su deficiencia provoca un descenso en la síntesis de ácidos nucleicos, ATP y clorofila (Boney, 1989). Asimismo, es importante la relación N/P. El azufre se toma como sulfato inorgánico y es fundamental para la división celular. La cantidad requerida de calcio varía mucho entre las especies y está relacionada con el tipo de pared celular. El sodio, potasio y cloro son universalmente requeridos por las microalgas, actuando el sodio y el potasio como activadores de enzimas, mientras que el cloro es fundamental para la fotosíntesis. El magnesio forma parte de la molécula de clorofila y determina la agregación de ribosomas (Kaplan *et al.*, 1986).

Los micronutrientes son requeridos en bajas concentraciones y en exceso resultan tóxicos. El primero de ellos es el hierro, necesario para todas las especies de microalgas. Es imprescindible para el metabolismo del nitrógeno, fotosíntesis y síntesis de citocromos. El manganeso y el cobre forman parte de la cadena de

transporte electrónico y son cofactores de muchas enzimas. El molibdeno es necesario para la asimilación del nitrógeno. 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.

Además de los requerimientos de tipo general, ciertos grupos pueden tener requerimientos específicos, como es el caso de las diatomeas y el silicio.

MEDIOS DE CULTIVO

Uno de los obstáculos en la producción industrial de microalgas es la formulación y preparación de un medio de cultivo química y económicamente apropiado.

Los medios de cultivo utilizados para algas se pueden agrupar en 3 categorías: medios completamente sintéticos, medios basados en aguas naturales enriquecidas con suplemento mineral y utilización de residuos o aguas residuales.

Los medios de cultivo sintéticos pueden ser comerciales o prepararse en cada laboratorio o planta a partir de sus componentes. Es conveniente que sean fáciles de hacer o reconstituir en el laboratorio y de fácil conservación.

El enriquecimiento del agua dulce o el agua de mar natural con diferentes nutrientes químicos aumenta enormemente el crecimiento y las tasas de división de los cultivos de microalgas. En el caso de especies marinas, se ha utilizado agua de mar artificial para cultivos masivos exteriores, aunque es prohibitivamente caro preparar los grandes volúmenes requeridos para aplicaciones comerciales, por tanto es preferible el agua de mar natural y de mejor rendimiento. 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 (Guillard y Ryther, 1962; McLachlan, 1973; Stein, 1973; Vonshak, 1986; Becker, 1994), aunque su composición cualitativa suele ser similar. La relación entre N/P oscila entre 5/1 y 10/1 en peso seco y entre N/Si de 0.5/1 a 1/1. 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.

Un estudio del crecimiento de 4 especies de microalgas marinas de importancia comercial (*T. suecica*, *I. galbana*, *D. tertiolecta* y *P. tricornutum*) utilizando

los medios más comunes (ES Provasoli, Walne y f/2) junto con los nutrientes comerciales ALGAL-1 demostró un mejor crecimiento de todas las especies utilizadas con este medio, mientras que no había diferencias significativas entre los otros tres (Fig. 21) (Herrero *et al.*, 1991).

El coste de los productos del medio de cultivo es un componente significativo del coste total de la producción algal. Por esta razón se han desarrollado métodos de enriquecimiento simplificados, menos caros, particularmente para sistemas exteriores donde se cultivan grandes volúmenes de algas. El método más simple es añadir fertilizantes con nitrato/fosfato al agua, en una razón de nitrógeno:fósforo entre 5:1 y 15:1 dependiendo de las especies algales preferidas y de las condiciones locales (Geldenhays *et al.*, 1985). Además un suplemento de silicio, generalmente en forma de metasilicato sódico, favorece el crecimiento de especies de diatomeas, muchas de las cuales son comercialmente útiles. La manipulación de la relación N:P:Si puede ser un buen método de ejercer algún control sobre la composición de especies de microalgas en agua de mar en tanques exteriores. De Pauw *et al.* (1983) encontraron que una relación N:P alta y una relación N:Si baja favorece a especies de diatomeas útiles, como *Skeletonema* y *Chaetoceros*, e impiden los blooms de especies menos deseables como *Phaeodactylum*.

La adición de fertilizantes al agua de mar es más beneficiosa para algunas especies microalgales que para otras. Por ejemplo, en ensayos comparativos de Spectorova *et al.*, (1982) *Dunaliella* creció igualmente bien en medios simples enriquecidos que en formulaciones más complejas. Sin embargo, Fábregas *et al.* (1987) encuentran que agua de mar simplemente fertilizada no es apropiada para cultivos de *Tetraselmis* y un suplemento de micronutrientes y extracto de suelo mejora su comportamiento.

Microalgas producidas en cultivos exteriores con medio preparado con fertilizantes simples son con frecuencia del mismo valor nutritivo que cultivos crecidos bajo condiciones de laboratorio estrechamente controladas utilizando medios más complejos (Rodhouse *et al.*, 1983).

Efluentes domésticos tratados y otras formas de aguas residuales, como efluentes de granjas de peces, utilizados como fuentes de nutrientes pueden reducir más los costes. Sin embargo, puede haber peligro de que las algas acumulen metales pesados u otros contaminantes de los efluentes y esto puede ser perjudicial para los animales que se van a alimentar de ellas (Dunstan y Tenore, 1972; Mihnea y Voinecu, 1977).

Ciertos residuos rurales o efluentes de biodigestión de materiales orgánicos también se han utilizado para preparar medios de cultivo, y en estos casos el

producto obtenido puede ser utilizado en la alimentación animal. Según la mayoría de los autores, estos medios de cultivo simplificados producen más o menos las mismas tasas de crecimiento que los medios de cultivo estándar de laboratorio. El uso de estos medios menos caros reduce efectivamente los costes de producción de la biomasa de *Spirulina* (Seshadri y Thomas, 1979).

Para un cultivo masivo rentable se utilizan productos de excedentes agrícolas o industriales como fuentes de C, en lugar del CO₂, económicamente prohibitivo. Una de las fuentes potenciales de C orgánico son las molasas disponibles en muchos países que cultivan caña de azúcar y el CO₂ producido en procesos de compostaje (Becker, 1994).

Agua rica en nutrientes procedente de afloramientos oceánicos también se ha utilizado para preparar medio de cultivo en ciertas partes del mundo, ej. St. Croix, Islas Vírgenes, Cabo Frio (Brasil) (Rodríguez y Maestrini, 1984)

CONTAMINACIÓN

En los cultivos en el exterior son inevitables cierto tipo de contaminaciones dadas las condiciones no asépticas, ya que ni el medio ni el ambiente están estériles. En la práctica, es necesario monitorizar y controlar tales contaminantes, con el fin de obtener una biomasa algal sin impurezas perjudiciales y para mantener los contaminantes dentro de unos límites tolerables.

La mayoría de los contaminantes de cultivos limpios, además de bacterias, otras formas algales, zooplancton, virus, hongos e insectos, dependen de las condiciones locales, la especie cultivada y el sistema particular de cultivo (Richmond, 1986; Becker, 1986).

1.- ALGAS INDESEABLES

Este es uno de los mayores problemas de los cultivos masivos en el exterior. Estas contaminaciones no pueden evitarse totalmente porque las condiciones de cultivo en estos sistemas no son exclusivos de una especie en particular.

Este tipo de contaminación reduce el rendimiento del cultivo y, en casos extremos, el alga contaminante puede desplazar el cultivo original. En Japón, el mantenimiento de cultivos puros de *Chlorella* implica recultivar con frecuencia partiendo de inóculos no contaminados.

Aunque es imposible prevenir la contaminación con algas indeseables, se pueden tomar cierto tipo de precauciones que ayudan a mantener dichas conta-

minaciones en un nivel aceptable. Las cubiertas de plástico pueden minimizar la tasa de invasión, pero por razones prácticas están limitadas a tanques o lagunas pequeñas y sólo durante periodos de tiempo cortos.

Las mejores estrategias son la utilización de elevadas concentraciones de inóculo, limpiezas periódicas de las lagunas y la creación de condiciones ambientales específicas que favorezcan el crecimiento de las especies algales deseadas. Esto puede conseguirse mediante la ausencia de fertilizantes de nitrógeno en los cultivos de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, con altas concentraciones de sal en los cultivos de *Dunaliella* y *Spirulina*, con el pH o con el aporte de nutrientes. Por ejemplo, la diferente afinidad y las tasas de asimilación de amonio a corto plazo de las algas deseadas e indeseables pueden ser utilizadas para favorecer el crecimiento de las especies deseadas mediante la selección del régimen de aporte de amonio y otros nutrientes.

Dentro de ciertos límites, algunas algas (saludables) establecen monocultivos que suprimen la propagación de otras especies, quizás por la excreción de sustancias supresoras del crecimiento, aunque en la mayoría de los proyectos algales se produce una sucesión de diferentes especies, fundamentalmente basadas en una sucesión estacional. La contaminación de *Spirulina sp.* con otras algas está limitada a unas pocas formas, principalmente a causa de las condiciones de cultivo tan específicas de esta especie (elevada salinidad y pH), que no favorecen a la mayoría de las especies.

2.-MOHOS, LEVADURAS Y HONGOS

La contaminación con levaduras y hongos en los cultivos algales se produce con cierta frecuencia en las lagunas de cultivo; sin embargo, no presentan serios problemas para el comportamiento de las algas ni para el consumidor.

El hongo más dañino para los cultivos de clorofíceas (y no en el caso de *Spirulina*) es *Chytridium sp.*, que a menudo aparece con el flagelado *Aphelidium sp.* Las infecciones en los cultivos de *Scenedesmus* con estos organismos se han detectado en Alemania, Tailandia, Israel, Sudáfrica y Perú. A medida que avanza la infección, se produce una floculación fuerte de las suspensiones algales y el color del medio se vuelve marrón. Los cultivos infectados muestran un descenso de la evolución del oxígeno, incluso durante los periodos de máxima tasa fotosintética. Cuando aparecen estas indicaciones, el cultivo es ya irrecuperable. Por ello se aconseja el examen microscópico diario del cultivo. Cuando aparecen indicios de contaminación por *Aphelidium* es necesario diluir fuertemente el cultivo con medio fresco. Durante el crecimiento exponencial del cultivo, la población algal se multiplica a una tasa mayor que el parásito, y se podría

eliminar la infección mediante repetidas diluciones. Por esto, se aconseja que la densidad del cultivo se mantenga en una fase de crecimiento lineal óptimo mediante la recogida diaria de biomasa.

La aparición de parásitos reduce el rendimiento de los cultivos algales pero no representa ningún problema sanitario si la biomasa se destina a la alimentación o pienso. No se ha encontrado ninguna micotoxina sintetizada por *Aphelidium*, por lo que puede asumirse que este parásito no representa ningún peligro para la salud si está presente en la biomasa microalgal.

3.- BACTERIAS

Las bacterias heterótrofas pueden encontrarse en los cultivos de microalgas creciendo en los medios inorgánicos, ya que las algas exudan diferentes compuestos orgánicos al medio que inducen el crecimiento bacteriano, y el grado de contaminación es bastante elevado cuando se adicionan nutrientes orgánicos o de desecho. Es necesario realizar controles sanitarios de la biomasa como prerequisite para la utilización de la misma. Aunque hay numerosos estudios publicados acerca de la calidad nutritiva y de la toxicidad en general de la biomasa microalgal, apenas hay trabajos acerca de contaminaciones microbianas que puedan afectar a la calidad y seguridad de las algas, si se aplican como alimento o pienso.

Las condiciones de cultivo de las microalgas (altos niveles de materia orgánica disuelta, elevada temperatura) favorecen el crecimiento microbiano, y se han observado altos niveles de bacterias que presentan cambios estacionales dependientes de la temperatura.

4.- ZOOPLANCTON

Este tipo de contaminación aparece ocasionalmente en los cultivos de algas verdes. Apenas tienen efecto sobre el crecimiento algal. Las especies más comunes son *Lycrymanis sp.*, *Colpidium sp.* y *Vorticella sp.*

Cuando la contaminación es por el rotífero *Brachionus* deben tomarse medidas, ya que puede echar abajo el cultivo algal. El tratamiento más efectivo en estos casos es una reducción drástica del pH del cultivo a 3.0 mediante la adición de ácido, manteniéndolo durante 1-2 horas. Después se reajusta el pH a 7.5 con KOH. Este tratamiento no tiene efecto sobre las algas, pero elimina eficientemente los rotíferos. Este procedimiento debe restringirse a cultivos pequeños a causa de la cantidad de productos químicos necesarios para inducir los cambios de pH necesarios.

No se ha encontrado este tipo de contaminación en los cultivos de *Spirulina*, debido probablemente al elevado pH y concentración de sales del medio en estos cultivos.

5.- INSECTOS

Chironomus en los cultivos de *Scenedesmus* y *Ephydra* en los cultivos de *Spirulina*. La utilización de insecticidas puede provocar problemas de contaminación y acumulación y, por tanto, debe evitarse su utilización.

6.- OTROS CONTAMINANTES

Pueden ser pájaros y roedores, principalmente cuando las aguas están estancadas.

Para combatir la presencia de estos contaminantes, el mejor método es mantener el cultivo de microalgas en óptimo crecimiento, ya que se ha demostrado que en esas circunstancias los niveles de contaminación son mínimas. Actualmente, no hay fármacos disponibles para controlar específicamente las infecciones de los cultivos algales. Sin embargo, algunos pesticidas podrían ser potencialmente adecuados. Se han probado diferentes pesticidas como control del parásito *Aphelidium* en cultivos exteriores de *Scenedesmus obliquus*; agentes comúnmente utilizados en medicina y veterinaria y como fungicidas para la protección de plantas. No se ha observado el desarrollo de resistencia de los parásitos a estos fungicidas. Los componentes activos de estos fungicidas son tiocarbamatos, conocidos por su baja toxicidad y porque han sido utilizados durante muchos años en la agricultura. En algunos casos pueden realizarse una retirada mecánica de los contaminantes sólidos de mayor tamaño

4.- Especies utilizadas y criterios de selección

Se han ensayado una amplia variedad de especies y cepas de microalgas para determinar su adecuación al cultivo masivo, así como su interés ya sea como biomasa o para la obtención de algún producto. Esto es debido a que al planterase el cultivo microalgal deben elegirse especies que sean fáciles de cultivar en cultivos masivos y que tengan interés económico.

Una vez se obtiene un género o especie de interés debe tenerse en cuenta que pueden existir distintas especies o cepas con diferencias en crecimiento, morfología y composición celular, por lo que se hacen necesarios métodos adecuados de clasificación y selección para encontrar la especie o cepa óptima (Vonshak, 1987)

Se han establecido diferentes criterios para la evaluación y selección de cepas, normalmente dirigidos a la obtención de altas tasas de producción en cultivos exteriores, ya que son éstos los sistemas rentables de producción de microalgas, aprovechando la iluminación natural (Becker, 1994). Algunos de estos criterios son:

1) Respuesta a las fluctuaciones diurnas. En general, en las áreas adecuadas para el cultivo de microalgas a gran escala son frecuentes las fluctuaciones diurnas de temperatura por encima de los 20°C, debido a su elevada intensidad de luz, lo que significa que durante las horas de la mañana, a pesar de que existe suficiente luz, la temperatura en los tanques de cultivo está por debajo de la temperatura óptima para el crecimiento. Para minimizar este efecto depresivo sobre el crecimiento, las cepas de microalgas a utilizar en estos cultivos son aquellas que presentan un amplio rango de temperatura óptima.

2) Resistencia a la fotoinhibición. Aunque en general la luz es uno de los factores limitantes del cultivo microalgal, las capas más superficiales de los cultivos pueden estar expuestas a una radiación solar tan elevada que llega a producirse la fotooxidación de las células microalgales. Por ello, deben aislarse cepas con intensidades de luz de saturación elevadas y con una mínima inhibición del crecimiento a elevadas intensidades de luz.

3) Cantidad de respiración en la fase oscura. Las medidas de la tasa de respiración en oscuridad han mostrado que durante la noche puede llegar a perderse más del 35% de la biomasa total producida durante el día. Las cepas con una tasa de respiración en oscuridad baja o una relación entre producción de O₂ en luz y consumo de O₂ en oscuridad alta serían buenos candidatos para el cultivo en el exterior a gran escala.

4) Sensibilidad a elevadas concentraciones de O₂. El oxígeno es uno de los factores más importantes de las ecuaciones de fotosíntesis; elevadas concentraciones de O₂ deprimen la tasa de incorporación fotosintética del carbono en forma de un mecanismo de retroalimentación, provocando en algunas ocasiones la pérdida total del cultivo. La agitación de los cultivos, además de asegurar la distribución homogénea de las células en el medio, permite la eliminación del cultivo del exceso de oxígeno producido en la fotosíntesis, que de lo contrario podría alcanzar niveles de saturación del 500%. En cualquier caso, deberán seleccionarse cepas que puedan tolerar concentraciones de oxígeno relativamente altas.

5) Sensibilidad al estrés osmótico. Elevadas tasas de evaporación (por encima de 10 L d⁻¹ m⁻²) en cultivos en el exterior y la adición de medio fresco pueden producir una duplicación de la concentración de sales después de largos periodos de cultivo, lo que puede provocar un fuerte estrés osmótico. Deben seleccionarse cepas que toleren aumentos de la presión osmótica sin aumentar la tasa de respiración.

MICROALGAS DE INTERÉS ECONÓMICO

Se ha estudiado una amplia variedad de cepas y especies de microalgas con el fin de cultivarlas masivamente para obtener elevadas cantidades de biomasa y productos de interés en diferentes industrias. A continuación citamos algunas de las especies más utilizadas.

Chlorella

La producción a escala comercial de *Chlorella* está relativamente extendida en el sureste asiático, mientras que en otras zonas son más frecuentes otras

especies (Soong, 1980). En Asia la producción comercial de *Chlorella* comienza en Taiwan en 1966. Las especies más utilizadas son *C. pyrenoidosa* y *C. ellipsoidea*. La biomasa de *Chlorella* se produce tanto autotróficamente como heterotróficamente (Oh-Hama y Myachi, 1988). El producto de *Chlorella* se distribuye como polvo o como píldoras en el mercado alimenticio. De esta especie se extrae un producto denominado Factor de Crecimiento de *Chlorella* (*Chlorella* Growth Factor, CGF), que mejora el crecimiento de las bacterias lácticas. También se ha propuesto como productora de almidón a nivel comercial (Pint y Pint, 1977); y algunas cepas termofílicas obtenidas por procesos mutagénicos presentan una elevada producción de luteína, pigmento utilizado en la industria alimenticia (Cohen, 1986).

Spirulina

La producción comercial de *Spirulina* se lleva a cabo en México, Taiwan, Tailandia, California, Japón e Israel, así como en la India dentro de sistemas agrícolas de explotación integral. En el lago Texcoco se “cultiva” *S. maxima*; su biomasa se utiliza como complemento alimenticio de la dieta humana desde muy antiguo, por su alto contenido en proteínas y bajo (aproximadamente un 4%) en ácidos nucleicos; la pared celular de mucoproteínas es más fácil de digerir que en otras especies utilizadas y además presenta un elevado contenido en algunas vitaminas (fundamentalmente del grupo B: B₁₂, B₁, B₂ y B₃) y minerales (principalmente hierro) (Richmond, 1986, 1990). También se utiliza como alimento de peces ornamentales, con el fin de potenciar su color. Otros productos que contiene esta especie son β-caroteno, si bien no suele aislarse de esta cianobacteria para su comercialización (ingerida en la dieta se utilizaría como precursor de la vitamina A), y ácidos grasos insaturados esenciales (*S. platensis* es el organismo fotoautotrófico estudiado que contiene una mayor cantidad de ácido linoleico) (Richmond 1986, 1990).

Entre las aplicaciones clínicas de esta especie se citan (Jasby, 1984; Richmond, 1990):

- su utilización como alimento terapéutico en niños y adultos,
- como tratamiento de cicatrización de heridas,
- estimulación tiroidea (lo que a su vez estimula el crecimiento),
- tratamiento del cáncer con ficocianina (uno de los pigmentos más importantes de esta especie), si bien este pigmento estimula el sistema inmune proporcionando protección para una amplia variedad de enfermedades,
- protección contra el cáncer por su contenido en β-caroteno,

- estimulación de las prostaglandinas (PGE₁) por su contenido en ácido γ -linoleico (GLA)
- reactivador de enzimas humanos (demostrado en la eritrocito-colinesterasa).

Dunaliella

Las especies más importantes son *D. salina (bardawil)*, *D. parva* y *D. viridis*. De ellas se extrae fundamentalmente β -caroteno (*D. salina*, es la microalga conocida con mayor contenido en β -caroteno), glicerol y proteína. También se extrae oxycarotenoides (principalmente luteína) que incrementan el color amarillo de la yema del huevo (Ben-Amotz *et al.*, 1988; Borowitzka y Borowitzka, 1988; Borowitzka, 1988; Ben-Amotz y Avron, 1989).

Utilizando sustancias bloqueadoras específicas, se han podido aislar en esta especie varios intermediarios de la ruta de síntesis del β -caroteno, que también pueden ser comercializados: β -zeacaroteno, licopeno, ϵ -caroteno, fitoflueno y fitoeno.

Otras posibilidades comerciales la constituyen diferentes compuestos bioquímicos que incluyen: enzimas, vitaminas, ácidos grasos y reguladores del crecimiento. Ya se comercializa un enzima, la dihidroxiacetona reductasa o glicerol deshidrogenasa (Ben-Amotz & Avron, 1989).

Otro producto obtenido de esta microalga es el glicerol, puesto que esta especie es capaz de crecer en medios con elevado contenido salino (0.1 a 8 M de NaCl) acumulando cantidades de glicerol de hasta un 40% en peso seco.

Scenedesmus

La especie más utilizada comercialmente *S. acutus*. Se utiliza como complemento dietético por su contenido proteico (SCP para el hombre y animales monogátricos) y por su patrón de ácidos grasos (Becker, 1994). También se han aislado algunos componentes bioquímicos menores de interés en la industria del perfume.

Diferentes cepas de *Scenedesmus* o cultivos mixtos de *Scenedesmus* y *Chlorella*, combinados con bacterias, se han utilizado como sustrato de digestión anaeróbica para la producción de metano (Eisenberg *et al.*, 1979).

Esta microalga se ha utilizado también en dietas de adelgazamiento, ya que su ingestión media hora antes de las comidas reduce el apetito.

En Checoslovaquia se utilizan ungüentos que contienen un 20% del extracto alcohólico de *Scenedesmus acutus* para el tratamiento de personas con úlceras en la piel, quemaduras, heridas...

Phaeodactylum

P. tricornutum es capaz de producir y acumular altos niveles de lípidos (>34% de su peso seco), en condiciones de limitación de N. *Phaeodactylum* contiene grandes cantidades de palmítico y hexadecanoico, ácidos poliénoicos y en menor cantidad ácido linolénico. *Phaeodactylum* puede desarrollarse en cultivos muy densos, con tasas de producción muy altas (Thomas *et al.*, 1984). En condiciones de laboratorio el porcentaje de carbono en la fracción lipídica aumenta linealmente con la intensidad de luz hasta 600 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

Porphyridium

En la fase estacionaria del crecimiento produce elevadas cantidades de un exopolisacárido soluble en agua, con interés comercial por sus propiedades gelificantes (*P. cruentum* y *P. aerugineum*, que ha sido patentado). El polisacárido obtenido de *P. aerugineum* se utiliza para la extracción del petróleo en zonas arenosas, el petróleo se separa de estas formaciones mediante un fluido acuoso que contiene el polisacárido (Savins, 1978; Percival y Foyle, 1979).

P. cruentum es una fuente comercial de ácido araquidónico (5, 8, 11, 14-eicosatetranoico), precursor de prostaglandinas. El contenido de este ácido graso en un cultivo puede llegar al 36% del total de ácidos grasos (Ahern *et al.*, 1983).

De esta especie también se extraen pigmentos como la ficocianina y la ficoeritrina (éste último es el pigmento mayoritario de esta microalga y le da su color rojo característico).

También se extrae de esta microalga un enzima, la superóxidodismutasa (SOD) (Cohen, 1986), que se utiliza comercialmente como agente terapéutico general frente a distintas enfermedades.

Botryococcus braunii

Es capaz de acumular grandes cantidades de hidrocarburos, especialmente los que tienen longitudes de la cadena entre C27 y C31 y principalmente C34 que ha sido propuesto como un lubricante y como fuente de combustibles renovables, puesto que estos compuestos son similares en composición al petróleo crudo (Bachofen, 1982).

Chlamydomonas

Se cultiva comercialmente aunque a pequeña escala, y se utiliza como acondicionante de ciertos tipos de suelos, aumentando la concentración de carbohidratos de los suelos tratados, así como su capacidad de retención de agua (Metting y Raybum, 1983).

OTRAS MICROALGAS DE POTENCIAL INTERÉS ECONÓMICO.

Como fuente de EPA: *Heteromastix* (Prasinofícea), *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Amphora*, *Navicula*, *Thalassiosira*, *Biddulphia*, *Ditylum*, *Lauderia*, *Asterionella* (Diatomeas), *Pseudopedinella*, *Emiliana*, *Cricosphaera*, *Isochrysis* (Haptofíceas), *Prorocentrum*, *Peridinium*, *Gonyaulax*, *Amphidinium* (Pirrófitas).

Como fuente de antibióticos: *Gomphosphaeria*, *Scytonema* (cianobacterias), *Chlorella*, *Ochromonas danica*, *Stichococcus mirabilis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Asterionella japonica*. Antivírico y antifúngico en *A. notata*.

Como fertilizantes agrícolas: *Nostoc* y *Tolypothrix* (cianobacterias).

Como fuente de linoleico y linolénico: *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Prymnesium*, *Isochrysis*, *Dicrateria*.

Como fuente de enzimas de restricción: varias especies de *Anabaena*, *Matigocladus laminosus* y *Microcoleus*.

Como productoras de metano: *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Euglena*, *Oscillatoria*, *Synechocystis*, *Melosira*, *Oscillatoria*, *Anabaena*.

SELECCIÓN DE CEPAS

Al plantearse el cultivo microalgal deben seleccionarse cepas que sean fácil de cultivar en cultivos masivos con altas productividades y que tengan interés económico.

Una de las vertientes más desarrolladas del cultivo masivo de microalgas es su utilización como fuente de derivados biomédicos o compuestos químicos de interés. Básicamente se distinguen dos tipos de estrategias de búsqueda de cepas de este tipo (Muñoz y López Cruz, 1992). El primer tipo puede ser considerado como un método directo, en el que se busca una actividad bioespecífica o un compuesto determinado en un gran número de extractos de especies. Cuando se encuentra la actividad deseada, se intenta aislar y caracterizar el/los compuestos responsables de dicha actividad, y en el caso de un producto su obtención en forma purificada.

El segundo tipo de método es indirecto, no se dirige inicialmente hacia la detección de una actividad bioespecífica o compuesto determinado. Las células se reducen a extractos y los compuestos obtenidos son separados, aislados, caracterizados y cuantificados. Si procede, los compuestos aislados son utilizados para detectar una amplia gama de bioactividades.

Los métodos de búsqueda definidos anteriormente son primarios, designados para proporcionar una identificación inicial de bioactividad o presencia de un producto. Una vez que el candidato ha sido seleccionado en el screening primario, los screening secundarios son utilizados para definir el valor de la sustancia. Permiten evaluar la actividad primaria y ampliar el alcance de esta actividad. Por ejemplo, si se ha detectado actividad anti-*Herpes* en un ensayo primario “in vitro”, el screening secundario podría consistir en ensayos “in vitro” contra otros virus DNA o RNA. Incluso podría estudiarse la actuación de la droga “in vivo”. Si se trata de un compuesto, permiten evaluar las condiciones dirigidas a un máximo rendimiento de producción.

Las algas ocupan un lugar importante como fuente de derivados biomédicos; en particular, el estudio de factores inhibitorios del crecimiento de un gran número de bacterias, hongos y levaduras, constituye el aspecto más ampliamente desarrollado. Las primeras observaciones acerca de la capacidad antimicrobiana de las algas marinas se llevaron a cabo con diversas especies de microalgas. Así, Sieburth (1960) observó la escasez de diversos tipos de bacterias en el intestino de pingüinos antárticos, lo que permitió mostrar el efecto antibiótico de la microalga *Phaeocystis puncheri* encontrada en los camarones de los que se alimentaban los pingüinos. También se observó una correlación entre las variaciones estacionales en la actividad anti-*E. coli* del agua de la bahía de Narangausett y el afloramiento de la diatomea *Skeletonema costatum* (Sieburth, 1964). A partir de estos trabajos iniciales, se han detectado muchas actividades biomédicas en microalgas, aunque no siempre se han podido identificar los compuestos activos: antivirales, antibióticos, toxinas, antineoplásicos, anticoagulantes, activadores de enzimas, antiparasitarios, inmunoestimuladores etc. (Richmond, 1990; Rodríguez y Guerrero, 1992; Becker, 1994,). No obstante, las actividades detectadas no siempre permiten un sistema de explotación competitivo.

Además de estos compuestos biomédicos, otros productos químicos de interés producidos por microalgas incluyen: β -caroteno, ácidos grasos, astaxantina, polisacáridos, polioides, etc.

Otra importante aplicación de las microalgas es como alimento en acuicultura. La selección de cepas en este caso se realiza básicamente atendiendo a los requerimientos de los animales a cultivar. Este aspecto se desarrollará en el capítulo 8. Para la utilización como alimento o suplemento alimenticio en alimentación animal y/o humana es fundamental seleccionar cepas de elevados contenidos proteicos, unidos a una adecuada composición en los restantes constituyentes (capítulo 7).

MANIPULACIÓN GENÉTICA DE CEPAS

La manipulación genética de cepas incluye la modificación del genoma tanto por mutagénesis y selección, como por ingeniería genética (Craig *et al.*, 1988). La manipulación genética en áreas bien establecidas de la biotecnología, como la producción de metabolitos por fermentaciones de bacterias o levaduras, ha permitido obtener mejores rendimientos, mejores características para el crecimiento y la utilización de sustratos más baratos (Momose y Furuya, 1980; Rowlands, 1984). Podría, por tanto, jugar un papel similar en el desarrollo de la biotecnología microalgal.

Parallevar a cabo la manipulación genética de especies o cepas microalgales deben tenerse en cuenta una serie de requisitos previos, que incluyen:

- Cultivos axénicos, con el fin de eliminar la interferencia con las especies contaminantes.
- Crecimiento en medio sólido. Todos los trabajos de manipulación genética requieren el crecimiento de un elevado número de colonias discretas procedentes de una sola célula, con el fin de aislar clones, lo que sólo es posible en un medio sólido apropiado.
- Sistemas de transferencia de genes. No son necesarios para la mutagénesis o la selección, pero son necesarios para el mapeo genético y análisis de ligamiento y para la ingeniería genética. Los sistemas de transferencia de genes incluyen la conjugación, la reproducción sexual, la transferencia a través de partículas virales, y la asimilación directa del DNA desnudo por transformación.
- Métodos de extracción de DNA. Como en el apartado anterior, no son necesarios para la mutagénesis y la selección, pero sí son necesarios para la ingeniería genética y para la transferencia de genes via transformación. La extracción de DNA requiere esencialmente un método eficiente para romper las células sin destruir el DNA, así como métodos para la separación del DNA de los otros componentes celulares.

Existen varias diferencias fundamentales entre las microalgas procariontas (cianobacterias) y las eucariotas que afectan a la manipulación genética:

- Los procariontas son haploides, mientras que los eucariotas generalmente tienen estadios haploides y diploides. La mutagénesis es más fácil en los organismos haploides, porque no hay efectos de dominancia de los genes alélicos. Esto es significativo si se tiene en cuenta que las

mutaciones más interesantes suelen ser recesivas. Las formas vegetativas de la mayoría de las microalgas son haploides (Lewin, 1976)

- Los procariotas generalmente son mucho menores que los eucariotas, y con un crecimiento más rápido, lo que supone una ventaja por la rapidez de los experimentos y las células pueden crecer hasta alcanzar elevadas densidades celulares.
- En procariotas no existe interacción entre los genomas de otros orgánulos. Pueden aparecer DNA extracromosómico en forma de plásmidos, pero generalmente no es esencial y puede ser eliminado. En eucariotas tanto el genoma mitocondrial como el del cloroplasto interactúa con el genoma nuclear y existen en múltiples copias.
- El sistema genético de los eucariotas es considerablemente más complejo que el de los procariotas, con numerosos sitios de replicación a lo largo de cromosomas discretos y división mitótica y meiótica. La construcción de vectores de clonación es consecuentemente más compleja.
- La mayoría de los genes eucariotas contienen intrones (regiones no codificadoras) que no aparecen en los genes procariotas. Para clonar genes eucariotas es necesario clonar el DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA maduro. Los genes de procariotas no contienen intrones.

La manipulación genética de microalgas (procariotas y eucariotas) por mutagénesis y selección ha sido relativamente frecuente, mientras que existen menos trabajos de ingeniería genética con estos organismos. Se han clonado varios genes de cianobacterias en *E. coli* (Ciferri *et al.*, 1989). Sin embargo, hay poco trabajo realizado en el desarrollo de sistemas de clonación en microalgas eucariotas, aunque se ha desarrollado un sistema de clonación para *Chlamydomonas*, que puede adaptarse para el género *Dunaliella*, ya que son géneros muy próximos (Brown y Borowitzka, 1979).

Entre las posibles aplicaciones de la manipulación genética pueden citarse:

- Mejora del rendimiento productivo.
- Expansión del rango de productos.
- Mejora del crecimiento y características celulares.
 - Tasas de crecimiento más altas.
 - Adaptación a nuevas condiciones ambientales (cambios de pH, temperatura, luz UV, metales pesados y otros contaminantes).
 - Mejores características celulares.

5.- Sistemas de cultivo y recogida

ESPECIES CULTIVADAS

Se ha ensayado la idoneidad de muchas especies de microalgas para aplicaciones comerciales, lo que ha implicado el desarrollo de métodos para aislar y cultivar microalgas, tanto en cultivos interiores como exteriores. Esto ha permitido el establecimiento de una tecnología de cultivo de distintas especies microalgales con aplicaciones comerciales. Las microalgas tanto marinas como de agua dulce son relativamente fáciles de cultivar, con altos rendimientos, alto contenido proteico y no tóxicas.

DISPONIBILIDAD DE ESPECIES

La obtención de cepas para cultivo puede realizarse mediante el aislamiento de microalgas del medio natural o bien pueden obtenerse en universidades, centros de investigación y centros especializados en colecciones de cultivos en todo el mundo, en los que se mantienen muchas líneas puras de especies microalgales.

Si se aíslan directamente de agua de mar o dulce, pueden utilizarse distintos métodos de aislamiento. Se consigue más fácilmente durante un "bloom" algal cuando una especie particular domina en la población. Para propósitos comerciales el aislamiento puede ser preferible a la utilización de algas de otras fuentes ya que las especies locales estarán adaptadas a las condiciones de calidad del agua local y pueden comportarse mejor en cultivo masivo (Laing y Ayala, 1990).

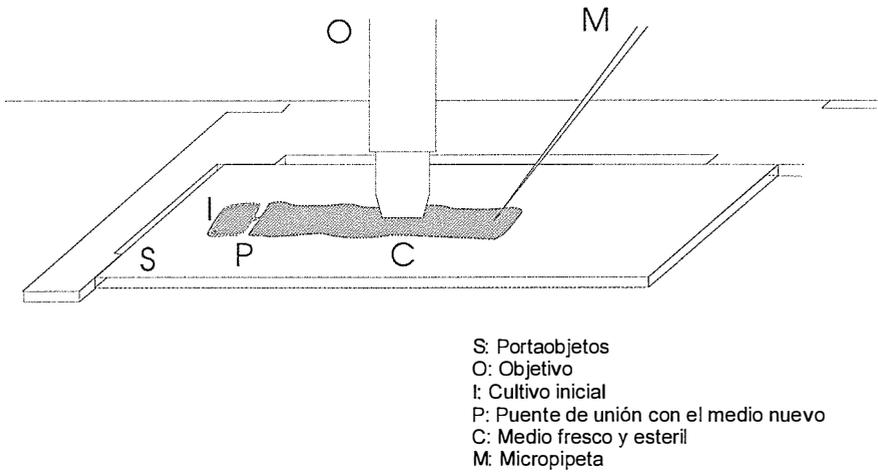


Figura 22.- Aislamiento de microalgas con micropipeta

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO

Aislamiento con micropipetas

Este sistema de aislamiento permite obtener cultivos microalgales partiendo de una muestra con diversidad poblacional. Permite un amplio intervalo de separación entre microalgas móviles y no móviles, ya que las primeras son aisladas con mayor facilidad por este método. Para realizar el aislamiento se parte de una muestra que previamente es concentrada por centrifugación y que se mantiene en cultivo durante 48 horas. Una gota del cultivo obtenido se coloca en el extremo anterior de un portaobjetos y se sitúa en la platina del microscopio. Justamente al lado, se establece una superficie larga y delgada hasta el extremo del portaobjetos de medio fresco y estéril. Posteriormente, se establece una delgada unión entre la gota del cultivo y la superficie con micropipeta cerrada (Fig. 22). Observando con el microscopio el extremo de la superficie de medio estéril, se puede seguir el movimiento de los flagelados hasta el extremo posterior del portaobjetos, donde se podrán recoger fácilmente las células que llegan con un microcapilar (Fábregas, 1982). No se obtienen cultivos axénicos.

Métodos basados en tactismos

Son muy útiles para microalgas móviles. Consisten en crear un gradiente (de luz, temperatura, salinidad, etc.) dentro de un tubo, casi capilar y añadir la muestra que queremos aislar en uno de sus extremos. Las algas móviles nadarán

activamente hacia la luz, o hacia la temperatura idónea. Generalmente los aislamientos por fototactismo dan buenos resultados, aunque no es un método que permita aislar con seguridad una sola célula. Tampoco se obtienen cultivos axénicos.

La disponibilidad de micromanipuladores facilita los dos métodos anteriores.

Diluciones seriadas

El material original puede ser diluido seriadamente varias veces en medio de cultivo estéril y se toman pequeños volúmenes de cada dilución para transferir a recipientes de cultivo, que se incuban con la luz y la temperatura adecuada. Generalmente se dispone de una gradilla con tubos de ensayo llenos de medio de cultivo. En uno de ellos se pone una gota del agua donde se supone que existen los organismos que interesa aislar, se agita y se pasa una gota de esta mezcla al segundo tubo, y así sucesivamente. De este modo se obtienen diluciones progresivamente superiores. Después de varios días se detecta por examen microscópico de muestras de cada contenedor aquel con cultivos unialgales.

Es un método que aunque resulta muy sencillo y poco laborioso no permite conocer *a priori* que especie se va a aislar. Presenta el inconveniente de que siempre se aíslan las especies más abundantes, por lo que puede resultar práctico para aislar especies dominantes en un "bloom" microalgal.

Como norma general se procura aislar de muestras recién cogidas, o bien de muestras que se enriquecen con nutrientes o se pasan directamente a medios de cultivo. El éxito de los aislamientos es bajo, entre 1-20%, por lo que conviene realizar un número elevado de ellos. Suelen obtenerse mejores resultados pasando las algas recién aisladas a tubos de ensayo con poco volumen de medio, y esperar a que alcancen un número elevado de individuos antes de pasarlos a los frascos o cajas estándar.

Aislamiento en placa

La mayoría de las microalgas crecen bien en una placa Petri o en tubo sobre agar al 1-2% preparado con medio de cultivo. Si el material original se siembra por estría en la superficie del agar con un asa curva será posible después de varios días de incubación a la luz y con la temperatura adecuada, retirar colonias aisladas que se habrán formado a partir de una única célula microalgal. Sin embargo, puede ser necesario repetir el proceso 2 ó 3 veces hasta conseguirlo. Estas colonias unialgales pueden ser entonces asépticamente transferidas a medio de cultivo estéril.

Una vez aisladas, los cultivos de microalgas pueden ser tratados para dejarlos libres de contaminación bacteriana y obtener cultivos axénicos (Wiedeman *et al.*, 1964; Droop, 1967), aunque esto probablemente no es necesario cuando estas especies se van a utilizar para el cultivo masivo ya que es poco probable que éste se mantenga en condiciones asépticas. Para obtener los cultivos axénicos se pueden utilizar distintos sistemas, aunque los más utilizados son cultivos en los que se añaden antibióticos a los medios.

MANTENIMIENTO DE LAS ESPECIES

Todos los sistemas de cultivo de microalgas deben tener una serie de cultivos “stock” en los que se mantiene una línea pura de cada una de las especies requeridas. Estos cultivos stock serán regularmente subcultivados para proporcionar medio de cultivo nuevo a las células, de forma que puedan continuar creciendo y dividiéndose y permanezcan en buen estado. Los subcultivos deben realizarse en medio de cultivo estéril bajo condiciones asépticas para asegurar que no se contaminan por otras microalgas. Existen diferentes medios de cultivo para el mantenimiento de estos cultivos stock, ya sean de microalgas marinas o de agua dulce (Stein, 1978; Vonshak, 1986; Becker, 1994). Generalmente son medios pobres, respecto a los utilizados normalmente, ya que no interesa un rápido crecimiento que obligaría a reepar en breve tiempo.

Un método adecuado para los cultivos stock es mantenerlos en tubos de vidrio o en matraces de vidrio borosilicato de pequeño volumen, sin agitación ni aireación. El subcultivo se realiza vertiendo asépticamente una alícuota de cultivo algal con una alta concentración de células en un tubo o matraz que contiene medio fresco. Después de 6 ó 7 días el nuevo cultivo stock puede utilizarse para iniciar la producción de un cultivo de mayor volumen y/o un nuevo cultivo stock. Si no se requiere inmediatamente el cultivo stock puede guardarse unas semanas a temperatura ambiente y luz de día (pero no directamente al sol) pero después de este tiempo debe ser desechado. Para asegurarse que las líneas puras de microalgas no se pierden es conveniente tener otra serie de cultivos stock en reserva en incubadores iluminados y a menor temperatura (14-18°C). Estos cultivos stock necesitaran subcultivarse cada 2-3 meses (Laing y Ayala, 1990).

Alternativamente, y particularmente para las especies de agua dulce, los stocks se pueden mantener sobre medio de cultivo en agar inclinado. El subcultivo se realiza en condiciones asépticas, utilizando un asa curva para transferir colonias microalgales a agar fresco a intervalos regulares (Laing y Ayala, 1990).

TIPOS DE CULTIVO

Los tipos de cultivos se pueden definir en función de distintos criterios, como tipo de población, origen del inóculo, situación fisiológica de la población y sistema de control de la densidad celular, etc.

TIPO DE POBLACIÓN

Teniendo en cuenta el tipo de población, el cultivo puede ser axénico, unialgal o mixto.

Los cultivos axénicos son aquellos en los que hay una sola especie de microalgas y que están exentos de bacterias.

Los cultivos unialgales tienen una sola especie de microalgas pero con una pequeña carga bacteriana. Estos son los que más se utilizan industrialmente, debido a que es muy difícil mantener cultivos sin bacterias. En los cultivos unialgales las microalgas crecen mejor que en los axénicos, ya que se produce una interacción beneficiosa entre las bacterias y las microalgas, pues las bacterias excretan vitaminas y otras sustancias al medio que pueden ser utilizadas por las microalgas. No obstante, si la carga bacteriana es excesiva puede inhibir el crecimiento algal o bien hacer el cultivo no apto para su utilización.

Los cultivos mixtos son aquellos en los que existe más de una especie de microalgas, con o sin bacterias. No se suelen utilizar porque es difícil su mantenimiento. Las interacciones entre ellas llevan a la eliminación de las especies no dominantes.

TIPO DE INÓCULO

En general, la producción masiva de microalgas, sobre todo para su utilización en acuicultura, se lleva a cabo por dos vías:

- a.- condiciones controladas con cultivos monoalgaes
- b.- condiciones de afloramiento semicontrolado.

El afloramiento, "bloom" natural o inducido mediante diversos tipos de fertilizantes, presenta graves problemas en cuanto al inantenimiento, debido a su diversidad de especies. Se observa una monopolización progresiva por parte de ciertas especies del cultivo y la aparición de otras especies indeseable o incluso que pueden presentar toxicidad. Este método tiene la gran ventaja de que económicamente supone un bajo coste de mantenimiento, pero su utilización sólo compensa en determinados casos.

Los mejores resultados se obtienen con cultivos monoalgaes cultivados en condiciones controladas. El hecho de que las condiciones de cultivo tengan que ser

bastante estrictas, en cuanto a tratamiento de agua, temperatura, iluminación, etc, para obtener un buen producto, hace de esta vertiente de cultivo uno de los mayores costes en las instalaciones dedicadas al desarrollo de larvas de moluscos y otros sistemas de acuicultura. En otros casos las condiciones de cultivo son menos estrictas.

FASE FISIOLÓGICA DE LA POBLACIÓN

A lo largo del ciclo celular las células que forman parte de una población pasan por distintas fases fisiológicas; los parámetros celulares, principalmente la composición química de las células, varían enormemente en función de la fase en que se encuentren; la composición química, y por tanto la calidad de la biomasa producida, dependerá de la resultante de la composición de cada una de las células que forman parte de la población. En función de la situación de las células en el ciclo celular en un momento dado, los cultivos se clasifican en sincronizados y no sincronizados

En un cultivo sincronizado todos los ciclos de vida de las células individuales se inician simultáneamente. Esto requiere al menos un factor de crecimiento discontinuo que cause sincronización. En las microalgas el factor de sincronización normalmente es el ciclo luz-oscuridad. Las ventajas de utilizar cultivos sincronizados son múltiples; tienen excelente reproductividad; la población total de un cultivo sincronizado representa una sola célula cuya biomasa fuera la de toda la población; se pueden estudiar los cambios de actividad, vías biosintéticas, estados sensibles y otros parámetros fisiológicos relacionados con el ciclo celular. Finalmente, los cultivos sincronizados son una excelente herramienta para estudiar algunos fenómenos de los ritmos endógenos.

SISTEMAS DE CULTIVO

Existen tres tipos de métodos a escala comercial de cultivo masivo de microalgas, dependiendo de como opere el sistema: cultivo discontinuo ("batch"), cultivo semicontinuo y cultivo continuo. Con cualquiera de estos métodos las unidades de cultivo masivo pueden ser recipientes de varios miles de litros de capacidad, generalmente pocos, o unidades mucho más pequeñas. La ventaja de esto último es que pueden cultivarse simultáneamente varias especies de microalgas. Esto puede ser importante en acuicultura donde se necesitan varias especies de microalgas para utilizar como alimento, generalmente en dietas mixtas, para obtener la mejor dieta para los animales en cultivo. Asimismo, en un sistema de muchas unidades aunque más pequeñas si un cultivo falla o se contamina la pérdida de producción no es grande. Se han descrito varios métodos

para mantener cultivos de microalgas en varios tipos de unidades de producción.

CULTIVOS DISCONTINUOS ("BATCH")

En estos cultivos la población va pasando por las distintas fases de crecimiento (latencia, exponencial, estacionaria), ajustándose generalmente a una función logística (Schanz y Zahler, 1981). Esto produce cambios fisiológicos de la población a medida que transcurre el tiempo de cultivo.

Los cultivos discontinuos se utilizan generalmente en estudios fotoautotróficos, pero su población celular es muy difícil de definir. Estos tipos de cultivos tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular.

El cultivo batch supone la recogida completa del recipiente de cultivo y es la forma más simple de operar, aunque supone mayor trabajo que otros sistemas. Todas las aplicaciones comerciales, excepto aquellas diseñadas para producir "blooms" de especies naturales de microalgas en tanques exteriores, generalmente necesitan utilizar un sistema de cultivo en batch, aunque sea sólo como iniciador de un cultivo continuo o semicontinuo.

CULTIVO SEMI-CONTINUO

En este tipo de cultivo, parte del volumen se recoge para su utilización, generalmente al final de la fase exponencial, y la cantidad que se retira se reemplaza con medio de cultivo fresco. Este método requiere menos mano de obra que los cultivos en batch. Se pueden mantener sistemas interiores para la producción de microalgas durante varias semanas utilizando métodos semicontinuos, en los que las condiciones de cultivo pueden ser cuidadosamente controladas. En sistemas de energía lumínica eficiente se puede recoger 3 veces por semana hasta el 90% del volumen de cultivo a altas concentraciones celulares (Laing, 1985).

También pueden operar semicontinuosamente cultivos de especies naturales, tanto marinas como dulceacuícolas, inducidos para la producción de blooms (Dunstan y Tenore, 1972; Dickson, 1987).

CULTIVO CONTINUO

Es aquel en el que se mantiene la población en fase exponencial de crecimiento ("steady-state") durante largos periodos de tiempo. La ventaja de estos cultivos es que muestras tomadas a distintos tiempos son idénticas. Para ello hay que añadir continuamente nutrientes en la misma medida en que son

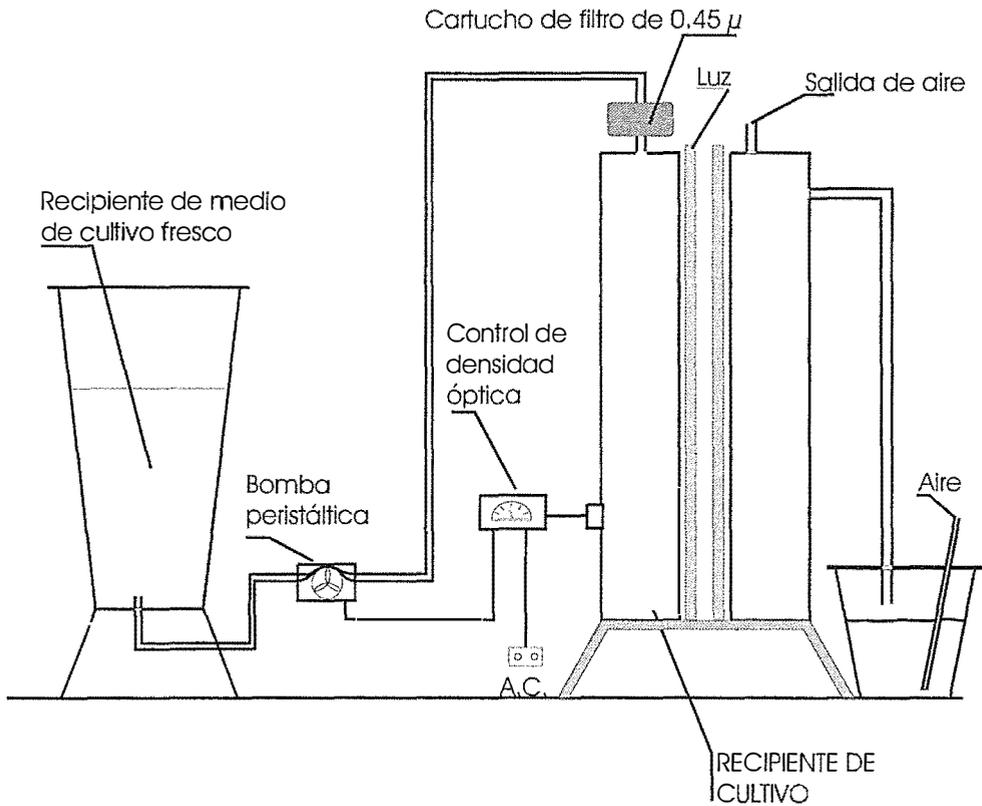


Figura 23.- Sistema de cultivo en turbidostato con iluminación interior para microalgas (modificado de Laing y Jones, 1983).

retirados del medio, para mantener los parámetros de crecimiento y la población celular a nivel constante. En estos sistemas el factor que controla el crecimiento es la tasa a la que se añade el medio fresco. El cociente entre la tasa de flujo y el volumen de cultivo se denomina tasa de dilución ($D=f/V$). Esta tasa es el volumen de medio que pasa por un recipiente de cultivo en un tiempo; su recíproco ($1/D$) es el tiempo medio de residencia de una célula en el sistema. La variación del número de individuos con el tiempo depende de la velocidad de crecimiento relativa y el lavado de células del recipiente: $dN/dt = \mu N - DN$. Para que la población microalgal permanezca constante en el sistema dN/dt debe ser 0, para lo cual $\mu = D$. En ese momento el sistema está en régimen ("steady-state").

Para obtener cultivos continuos, todos los factores de crecimiento deben mantenerse constantes. La densidad del cultivo se controla, manteniéndola a concentración constante. La ventaja del cultivo continuo es que se pueden mantener unas condiciones óptimas del "steady-state" en el cultivo, con un mayor grado de control de calidad sobre el producto algal. Los cultivos continuos pueden operar como quimiostatos, donde el medio fresco se suministra a una tasa fija predeterminada, o como turbidostatos, donde la concentración celular de los cultivos es controlada y mantenida a un nivel predeterminado por una entrada de medio fresco equivalente a la tasa de división celular. Los turbidostatos tienen la ventaja sobre los quimiostatos de que la variación en el crecimiento celular y la tasa de división no causará que los cultivos crezcan vigorosamente, hasta alcanzar altas densidades celulares y entonces se colapsen, ni crecerán tan lentos como para ser la vados del recipiente. Por otra parte, el volumen de salida previsto de un turbidostato no es tan preciso como el de un cultivo en quimiostato.

Ballard y Taub (1972) describen un sistema de quimiostato que produce altas concentraciones celulares de *Monochrysis* a una tasa de dilución de 25% por día. Palmer *et al.* (1975) desarrollan un sistema similar con una tasa de dilución de 30%/día. Trotta (1981) utiliza un sistema de bolsas de polietileno para el cultivo continuo en quimiostato de microalgas marinas. Laing y Jones (1983) describen un sistema de cultivo continuo en turbidostato de microalgas marinas con iluminación interior, representado esquemáticamente en la figura 23. Cualquier aumento o disminución de la concentración celular dentro del recipiente de cultivo es detectada por una célula fotoeléctrica conectada a una bomba peristáltica; el medio de cultivo es bombeado al recipiente si la densidad celular aumenta, recogándose la parte equivalente de medio con microalgas por rebosamiento. Esta unidad produce el 70-80% del volumen de cultivo diariamente. Otros sistemas diseñados para maximizar la eficiencia de la utilización de la luz emplean cultivos en finas capas iluminadas una batería de tubos fluorescentes (Nesaratnam *et al.*; 1986). Varios autores han descrito, asimismo, el cultivo continuo de microalgas en tanques exteriores (De Pauw *et al.*, 1983; Rodhouse *et al.*, 1983). Cuando estos sistemas se usan para producir "blooms" de especies naturales en función de las tasas de dilución se puede ejercer algún control sobre la composición de especies microalgales (Rodhouse *et al.* 1983).

A pesar de las ventajas de los cultivos en quimiostato, éstos no reflejan las condiciones naturales, al no sufrir cambios rítmicos. La introducción de un ciclo celular (ciclostato) es un importante adelanto ya que el ciclo día-noche es quizá el factor cíclico ambiental más importante en la mayoría de los sistemas.

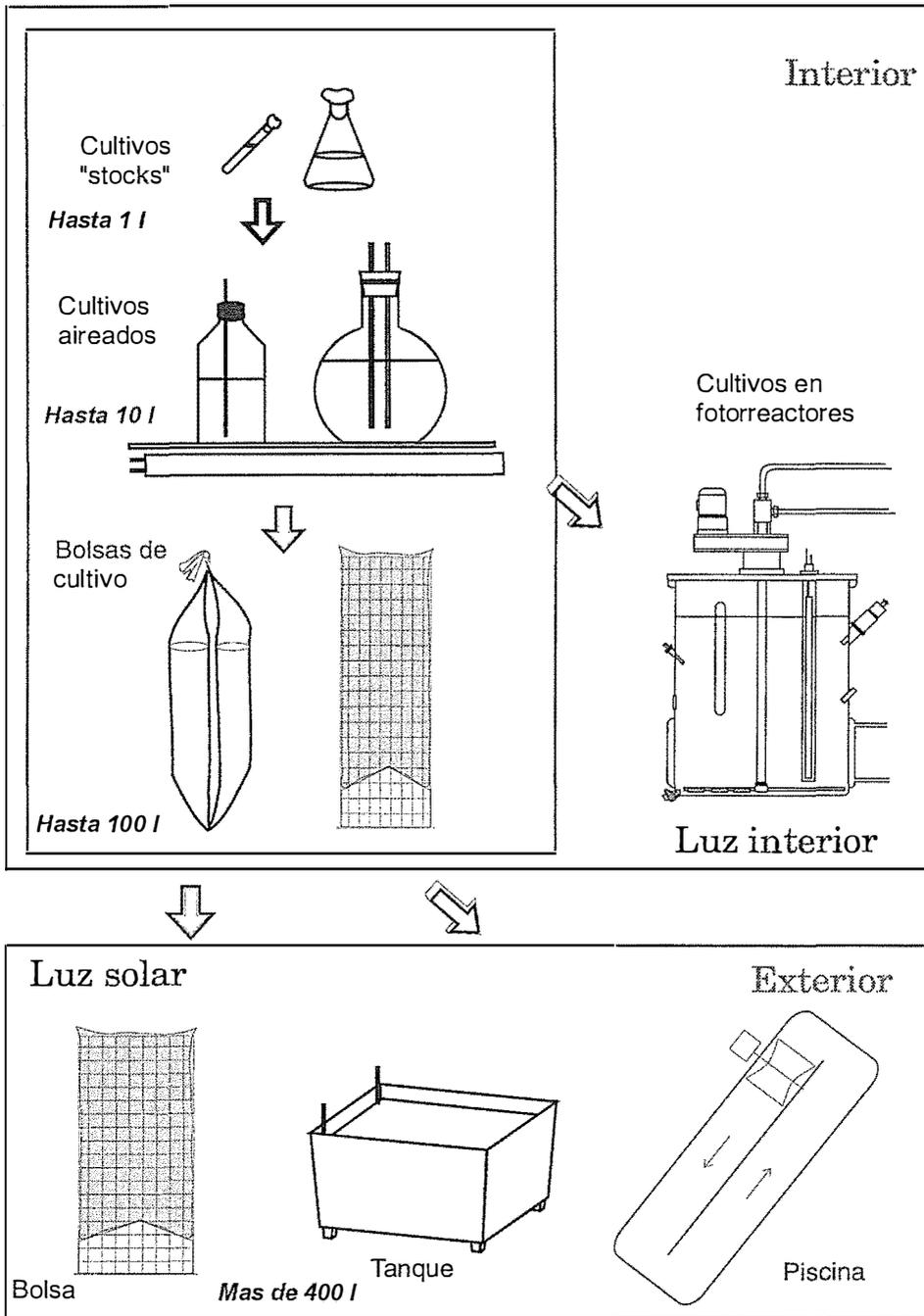


Figura 24.- Esquema de escalación de cultivos de microalgas

ESCALACIÓN Y MANEJO DE LOS CULTIVOS DE MICROALGAS

En las instalaciones de cultivo de microalgas se necesita disponer de cultivos que presentan distintos volúmenes y condiciones de cultivo. En general, se dispone de instalaciones con temperatura controlada y con luz artificial en los que se pueden disponer distintos sistemas de cultivo hasta un volumen máximo de 400 litros por recipiente. Estas instalaciones interiores permiten mantener constante la temperatura, luz incidente y duración de los ciclos de luz:oscuridad; sin embargo, tienen el inconveniente de su coste, debido al mayor consumo energético. Aun cuando la producción se realice totalmente en el exterior, es necesario disponer de instalaciones interiores para el mantenimiento de los cultivos "stock" y la escalación de los cultivos que servirán de inóculo a los sistemas de producción. Los cultivos de 400 litros o más se realizan ya normalmente en instalaciones exteriores, en las que la temperatura, la luz y el fotoperíodo no son controlados y, por tanto, la productividad y la calidad de la biomasa producida es menor; por contrapartida, se pueden producir grandes volúmenes de cultivo y con un bajo coste económico. Los cultivos exteriores utilizan generalmente diseños horizontales en sus unidades de producción (estanques) mientras que los cultivos interiores utilizan preferentemente sistemas de diseño vertical (cilindros, bolsas, etc.) que aprovechan mejor el espacio.

El proceso de cultivo (Fig. 24) se inicia a partir de colonias algales axénicas mantenidas sobre medio sólido con las que se siembran cultivos líquidos de poco volumen (generalmente hasta 250 ml). Estos cultivos se mantienen como cultivos "stock" de reserva, para disponer de inóculos siempre que se necesiten. Estos a su vez sirven para inocular en botellas de 1 litro y así sucesivamente de una forma escalonada se obtienen volúmenes de cultivo cada vez mayores, en recipientes de 10 litros y tubos de metacrilato o bolsas de polietileno de 40 a 400 litros. Los cultivos en bolsas pueden ser interiores o exteriores. Estas fases de cultivo se realizan normalmente en cámaras cerradas con luz y temperatura controladas y se consiguen producciones fijas de microalgas en un estado fisiológico óptimo. A partir de volúmenes de 1-2 litros, los cultivos se mantienen agitados continuamente para mantenerlos homogéneos, favoreciendo el contacto entre las células y el medio y que toda la población algal reciba la misma irradiación. Normalmente la agitación se realiza mediante burbujeo de aire desde el fondo del recipiente de cultivo, que puede ir enriquecido con CO_2 para mantener el pH óptimo y aumentar la disponibilidad de la fuente de carbono para el alga. Los cultivos pueden ser continuos o semicontinuos, siendo este último tipo el más utilizado. El cultivo continuo suele tener menor productividad y el sistema es complejo y caro. En el cultivo semicontinuo al final de la fase exponencial se retira la mitad de la biomasa y se incorpora la mitad de medio nuevo, manteniéndose el cultivo en fase

exponencial. Para volúmenes superiores se realizan los cultivos en tanques, piscinas o sistemas de reactores tubulares de distinto diseño.

Debe resaltarse que aunque el uso de estanques exteriores es atractivo, debido a su gran capacidad, el rendimiento de células microalgales puede ser mejor en sistemas intensivos interiores, debido a la mayor eficiencia de la unidad y, por tanto, se lograrán mayores densidades celulares.

En las bolsas de plástico debe tenerse en cuenta el material que las constituye, pues puede incidir en la intensidad o longitud de onda de la luz que reciba el cultivo. Es frecuente la utilización de tubos transparentes de polietileno como contenedores de cultivo. El calor utilizado en la manufactura del polietileno hace innecesario la esterilización de la unidad antes de su utilización. Se pueden utilizar tubos de plástico que se llenan de agua y se cuelgan por ambos extremos introduciendo aireadores en ambas partes de la bolsa; en otros casos se utilizan bolsas rectas cerradas en su extremo inferior con distintos sistemas, estas bolsas son de menor tamaño; también se pueden utilizar estructuras metálicas que rodean una base de poliéster permitiendo el mantenimiento de la bolsa, que se introduce en su interior, este sistema permite utilizar bolsas de hasta 400 l.

En la mayor parte de los casos el rendimiento en bolsas es mayor que en tanques debido a las características estructurales de ambos sistemas. En las bolsas los cultivos se hacen en condiciones de mayor asepsia, se consigue una mejor irradiación y agitación y se aprovecha mejor el espacio.

El siguiente salto de escala implica cultivos exteriores a gran escala. La selección del lugar para una unidad de producción algal es uno de los principales factores a considerar. Es necesario clima apropiado, topografía adecuada, buen suministro de agua (en calidad y cantidad) y fuente de energía disponible. En caso de microalgas marinas, el agua de mar puede ser natural o artificial; el agua de mar artificial presenta una composición constante y se puede obtener en zonas alejadas de la costa, sin embargo se han obtenido mejores resultados con agua de mar natural.

En el diseño de los estanques o piscinas hay que tener en cuenta la relación entre los costes de inversión y las ganancias esperadas, ya que su construcción es el mayor ítem en la inversión total de una planta de producción. Los factores a tener en cuenta son (Becker, 1994):

- Profundidad. Se relaciona con la capacidad de penetración de la luz.
- Revestimiento. Representa lo más caro del sistema. Para una óptima circulación de líquido se requieren superficies lisas en el fondo y las paredes del estanque. Actualmente, los estanques algales comerciales

están revestidos de hormigón o plástico, aunque se han utilizado distintos materiales con resultados diversos.

- **Agitación.** El método de mezcla y turbulencia es importante para conseguir altos rendimientos de biomasa algal (capítulo 3). La mayoría de los sistemas utilizados para inducir flujo son inadecuados para conseguir el máximo potencial fotosintético de la célula, debido a que la turbulencia inducida es al azar. La agitación suele ser por dispositivos como: ruedas de paletas, hélices, inyectoros de aire, etc.

Las piscinas presentan problemas de suciedad, evaporación, contaminación, etc. Una posible solución es cubrirlas por un material transparente. Tiene varias ventajas, como la reducción de las pérdidas por evaporación, la elevación de la temperatura y la disminución de la cantidad de suciedad e insectos que contaminen las microalgas. Si la evaporación es muy alta, los costes de agua y bombeo suben y aumenta la salinidad del medio, con lo que el crecimiento algal se hace más lento. Cubriendo la piscina se previene el enfriamiento del sistema, sobre todo por la noche o en invierno, ya que las cubiertas actúan como un invernadero por el día para atrapar la radiación de onda larga. Sin embargo, también tiene desventajas, como la reducción de la penetración de la luz, ya que los materiales utilizados por las cubiertas no son del todo transparentes. Estos factores contribuyen a reducir la radiación incidente en aproximadamente un 40%. En algunas áreas subtropicales con elevada irradiación solar, esta reducción de luz puede ser una ventaja. Asimismo, se acumula polvo en la superficie externa de las cubiertas y se condensa agua en la interna, lo que contribuye a disminuir la radiación que llega al cultivo. En la estación calurosa la temperatura del cultivo puede llegar a exceder los límites tolerados y entonces deben ser enfriados con agua o hay que darles sombra.

Los estanques o piscinas son unidades abiertas de cultivo, y los tipos básicos son (Fig. 25): estanques circulares, oblongos (tipo "raceway") o inclinados (Dodd, 1986; Oswald, 1988). Las piscinas circulares suelen tener un sistema de agitación mediante un brazo rotatorio. Este sistema tiene una serie de desventajas: son construcciones de hormigón caras y con una ineficiente utilización del terreno y consumen mucha energía para la agitación, aunque la turbulencia en el centro es baja. Actualmente apenas se usan. Las piscinas tipo "raceway" son las más utilizadas, ya sea en unidades aisladas o con varias unidas constituyendo meandros. La agitación suele ser por palas, propulsores o bombas de aire. En las piscinas inclinadas, generalmente dispuestas constituyendo meandros, la agitación de la suspensión algal se consigue mediante flujo por gravedad y bombeo. En este último tipo se trata de crear turbulencia mientras la suspensión microalgal fluye a través de canales o superficies inclinadas por gravedad; el medio algal es

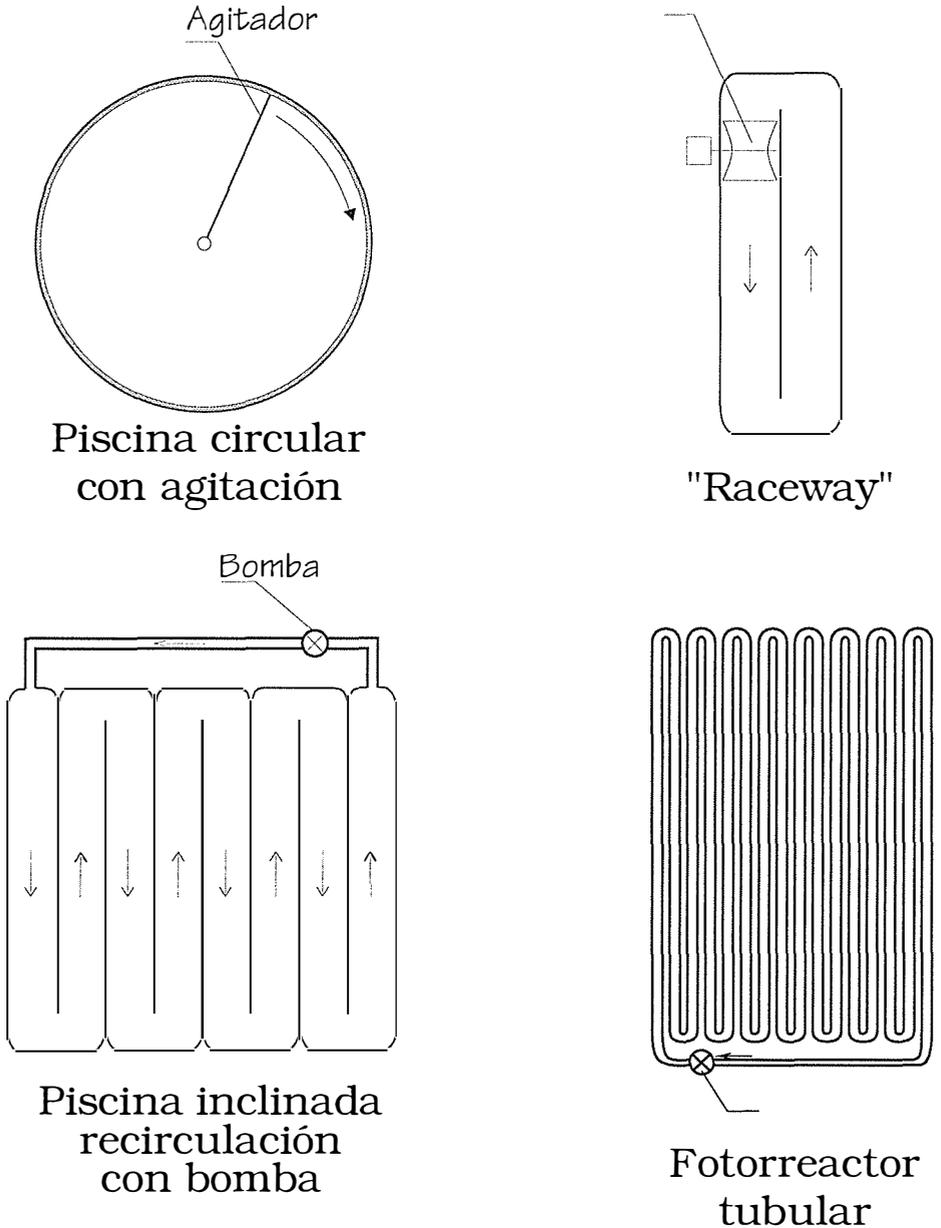


Figura 25.- Tipos básicos de estanques y fotorreactores para el cultivo de microalgas

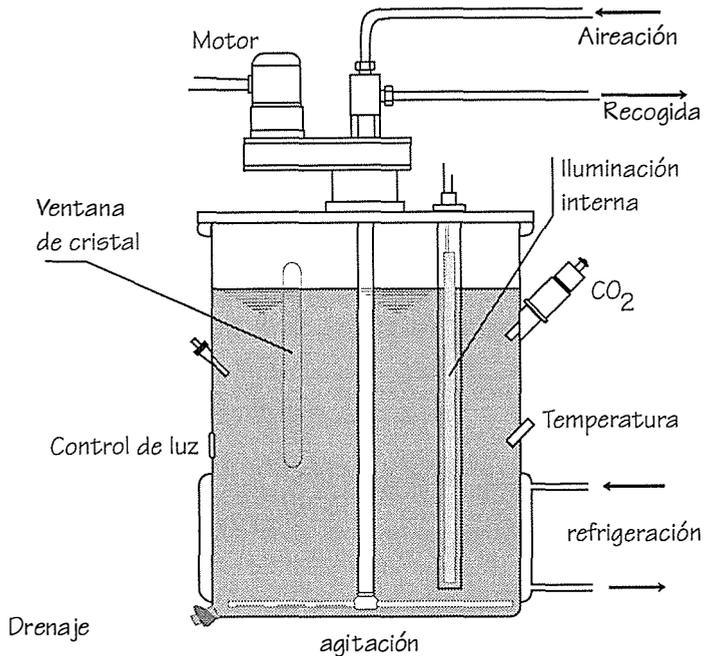


Figura 26.- Fotorreactor cilíndrico de acero inoxidable.

bombeado a la parte superior cuando llega al punto inferior. La velocidad de flujo viene dada por la pendiente.

Además de estos sistemas abiertos, existen sistemas de producción en biorreactores cerrados, que pueden ser tanto interiores como exteriores (Lee, 1986). Son sistemas económicamente más caros que los abiertos que se utilizan normalmente para el cultivo de cepas especiales para la producción de productos químicos específicos de gran valor. Estos biorreactores pueden ser básicamente cilíndricos o tubulares. Los reactores cilíndricos suelen ser acero inoxidable (Fig. 26) y la mayoría de ellos con iluminación interior. Están provistos de agitación, control de temperatura, luz, entrada de aire enriquecido con CO_2 , etc. No requieren su instalación en una cámara de temperatura y luz controlada, ya que el control lo realiza el propio biorreactor. En algunos casos están dotados de un sistema de control automático de cultivo por ordenador.

En los fotorreactores tubulares debe tenerse en cuenta el diámetro del tubo, para obtener una eficiente utilización de la luz; es importante asimismo el material de construcción. Los reactores tubulares son ventajosos en zonas de

temperatura moderada, pero tienen problemas en climas cálidos ya que la temperatura en los tubos puede alcanzar 10-15°C más que la ambiente, lo que hace necesarios sistemas de enfriamiento, que pueden ser ensombrecimiento de los tubos, rociados con agua o situar el reactor tubular en un lecho de agua. Los fotobiorreactores tubulares pueden presentar asimismo problemas de deplección de CO₂ y acumulación de O₂ que afectan al rendimiento y composición química de las especies en cultivo.

OBTENCIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL. MÉTODOS DE RECOGIDA Y SECADO

En la acuicultura comercial de animales marinos las concentraciones celulares producidas en los sistemas de cultivo microalgal generalmente son suficientes para uso directo, adicionando el cultivo microalgal a los contenedores donde se encuentran los animales que van a alimentar. Para otras aplicaciones comerciales las algas están relativamente diluidas y generalmente es necesario concentrar las células algales al recogerlas y, con frecuencia, secar la biomasa.

Existen varios métodos para concentrar las células del medio de cultivo en el que están suspendidas y la búsqueda de un método eficiente, con poco gasto de energía y económico es fundamental (Mohn, 1988; Becker, 1994).

La centrifugación es el método más eficiente, aunque supone un gasto de energía elevado. La calidad del producto microalgal recogido por centrifugación es muy bueno. El método más eficiente es la centrifugación continua. No obstante existen otros métodos de concentración.

La filtración por gravedad es el método más sencillo y económico, aunque poco eficiente. Es difícil cuando las células presentan cierto grado de plasticidad, como *Chlorella* o *Scenedesmus*. Está restringido a algas filamentosas o formadoras de colonias. Otros sistemas de filtración son filtración por arena, filtración a presión y filtración a vacío.

Los microcoladores ("microstrainer"), diseñados en un principio para eliminar el material particulado de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, resultan idóneos para concentrar la biomasa en el caso de algas filamentosas, pero no es eficaz con las microalgas más pequeñas (<20 micras).

El separador laminar se basa en la sedimentación por gravedad natural; consiste en una combinación de láminas inclinadas que garantizan que el sedimento siga hacia abajo y se deposite en una especie de cárter al final del cual se puede recoger la biomasa.

Otro método es la autoflotación, dónde se liberan pequeñas burbujas de gas desde el fondo de la unidad de cultivo que llevan a las células microalgales a la superficie donde pueden ser retiradas con un recogedor u otro sistema.

Algunas especies sedimentan al cesar la agitación del cultivo, y se recogen retirando el sobrenadante. Este proceso puede ayudarse utilizando floculantes químicos que pueden dar un rendimiento de hasta un 90% de recuperación de las células microalgales en un cultivo. Este método tiene la desventaja de que el producto obtenido está contaminado con el floculante. Los floculantes utilizados incluyen varias policiones, como aluminatos, hidróxido férrico y cloruro férrico. Cuando se utiliza aluminio para la floculación las microalgas contienen aproximadamente un 4% (P/V) de aluminio. La floculación con aluminatos y otros floculantes químicos entraña problemas de toxicidad y la calidad del producto microalgal resultante es pobre, siendo la principal limitación el alto contenido del producto químico utilizado en la floculación y un gusto desagradable. Se ha utilizado quitina parcialmente desacetilada o quitosán como potencial floculante catiónico. El quitosán es un polímero de β -N-acetil-D-glucosamina. Como es un producto natural y un polisacárido presente en la naturaleza tiene un gran potencial en la concentración de microalgas de cultivos masivos sin problemas tóxicos.

La biomasa algal recogida y concentrada por estos métodos puede utilizarse directamente en preparaciones alimenticias para animales; sin embargo, para casi todas las aplicaciones en las que se usa esta biomasa microalgal es necesario que esta sea tratada posteriormente, generalmente por secado. Generalmente se requiere un producto con menos de un 10% de humedad (Becker, 1994). Los distintos métodos difieren en los costes de inversión y en el consumo de energía.

Los métodos de secado del "slurry" algal varían desde la exposición al calor del sol, secado en horno, a vapor, a vacío, en tambor caliente o liofilizado (Becker, 1994). En el caso del secado en tambor caliente utilizan altas temperaturas que se aplican en tiempos cortos, de pocos segundos. La pasta microalgal pasa a un tambor rotatorio caliente, donde es deshidratada a altas temperaturas en pocos segundos, provocándose la ruptura de la pared celular. Se obtiene así un producto de calidad, prácticamente esterilizado y de gran digestibilidad. La única desventaja de este método es que requiere gran cantidad de energía.

La elección del método de secado depende de la especie microalgal, la escala a la que estemos operando y de la utilización a que se destine el producto final. El secado es un proceso caro, dada la humedad inicial del producto. El proceso de secado supone una parte importante de los costes de producción (aproximadamente 25-35%). La importancia del secado radica en el riesgo de fermentaciones

y otros daños que podrían producirse durante el almacenamiento, reduciendo la calidad del producto final.

La digestibilidad del producto final varía según el proceso de secado, así como la composición y valor nutritivo de la biomasa obtenida. El efecto mayor es sobre el contenido en vitaminas, y puede asimismo afectar a la disponibilidad de algunos aminoácidos como la lisina (Mohn, 1988).

Alternativamente, el "slurry" algal puede almacenarse como un producto congelado, con o sin crioprotectores como glicerol o dimetilsulfóxido, para usos posteriores.

6.- Composición bioquímica

El valor de una especie microalgal es función de su composición bioquímica. Un mejor conocimiento de la composición química de las microalgas permite una utilización más adecuada y rentable.

Como en cualquier planta superior, la composición química de las microalgas no es un factor intrínsecamente constante sino que varía en un amplio rango. Varios factores ambientales influyen en la proporción de los diferentes constituyentes de la biomasa algal. Ya en 1949 Spoehr y Milner publicaron información detallada sobre efectos de condiciones ambientales en la composición de algas, describiendo el efecto de variaciones en el suministro de N sobre el contenido de lípidos y clorofila de *Chlorella* y algunas diatomeas. Otros autores indican cambios en la composición y perfil de aminoácidos de proteínas básicas. Se han descrito variaciones muy extremas en la composición en respuesta a parámetros como la temperatura (Tadros y Johansen 1988; Thompson *et al.*, 1992a), iluminación (intensidad, longitud de onda y fotoperiodo) (Falkowski y Owens, 1978; Kowallik, 1987; Tadros y Johansen, 1988; Sukenik y Wahnon, 1991), pH del medio, suministro de CO₂, concentración y tipo de nutrientes (Shifrim y Chisholm, 1981; Fábregas *et al.*, 1984, 1989; Utting, 1985; Enright *et al.*, 1986b; Herrero *et al.*, 1991), salinidad (Tadros y Johansen, 1988; Al-Hasan *et al.*, 1990) y fase de crecimiento (Emdadi y Berland, 1989; Fernández Reiriz *et al.*, 1989; Henserson y Sargent, 1989), que afectan al crecimiento y metabolismo de las microalgas, etc. Para obtener una biomasa microalgal con una composición deseada, la proporción de los constituyentes de distintas algas puede modificarse muy específicamente variando las condiciones de cultivo, por ejemplo reducción del N o P del medio o cambios en factores físicos como presión osmótica, intensidad de radiación, densidad de población, crecimiento en luz u oscuridad, etc. Se ha publicado un

amplio espectro de análisis sobre la composición química bruta de diferentes algas. No obstante, no pueden realizarse generalizaciones sobre las respuestas de las microalgas a las alteraciones ambientales dado que tales respuestas difieren según la especie.

No sólo la composición bioquímica bruta de una especie, sino también la composición y concentración de aminoácidos, así como la composición de los lípidos, 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; Brown *et al.*, 1989). Estos contenidos 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; Stromgen y Cary, 1981).

COMPOSICIÓN BRUTA

Las microalgas presentan un alto contenido en proteínas (incluyendo aminoácidos esenciales), lípidos ricos en ácidos grasos insaturados y carbohidratos, además de ácidos nucleicos; también presentan vitaminas hidro- y liposolubles y otras moléculas como carotenoides, clorofilas, enzimas, aceites esenciales, hidrocarburos, glicerol, aminas, etc.

Aproximadamente el 90% del peso seco de una célula algal está constituido por proteínas, lípidos y carbohidratos (Tabla 1). El componente principal generalmente es la proteína, que supone generalmente más del 50% del peso seco. El segundo componente son los lípidos o carbohidratos, según las especies y condiciones de cultivo. Los ácidos nucleicos y las cenizas constituyen proporciones menores del peso seco microalgal.

PROTEINA

El elevado contenido proteico de distintas especies de microalgas fue una de las principales razones para considerar estos organismos como fuente no convencional de proteína. La mayoría de los datos sobre proteínas de microalgas se basan en la estimación del N total por el método Kjeldahl y la multiplicación

Tabla 1.- Composición química (% en materia seca) de diferentes microalgas de agua dulce y marina. (Tomada de Becker, 1994 y Brown *et al.*, 1989).

Clase	Proteína	Carbohidratos	Lípidos
<u>Agua dulce</u>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47		1.9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	22-38
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<u>Marinas</u>			
<i>Isochrysis</i> sp Clon T-ISO	44	9	25
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21
<i>Paulova lutheri</i>	49	31	12
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	33	17	10
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	33	24	10
<i>Skeletonema costatum</i>	37	21	7
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	29	17	10
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	9
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7

de este valor por el factor 6.25 (proteína bruta). Sin embargo, las microalgas contienen una importante fracción de N no proteico, por lo que el cálculo anterior sobreestima la cantidad de proteína. Entre los compuestos de nitrógeno no proteico, los ácidos nucleicos suponen el componente mayor, los otros constituyentes son pequeños péptidos, aminoácidos libres y pigmentos.

En *Scenedesmus* se encontró que el 12% del N total era N no proteico, y para *Dunaliella* y *Spirulina* se dieron valores de 6 y 11.5. En general, se puede asumir que el 10% del N de microalgas es N no proteico (Becker, 1994). Es por ello que en la actualidad se han propuesto otros factores para determinar la cantidad de proteína a partir del N total, y el más adecuado parece el propuesto por Gnaiger y Bitterlich (1984).

Otros procedimientos para la determinación de proteína se basan en ensayos espectrofotométricos, siendo los más utilizados el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y el de Bradford (1976).

El contenido proteico de las microalgas depende de la fuente de nitrógeno suministrada (Boussiba y Richmond, 1980; Rajasekaran *et al.*, 1981; Utting, 1985; Vieira y Klaveness, 1986). La cantidad de proteína disminuye si desciende el nitrógeno en el medio. Para conseguir que el contenido en proteína de las microalgas sea alto debe tenerse cuidado, por tanto, de que haya siempre nitrógeno disponible en el medio en cantidad suficiente. Asimismo, una deficiencia en carbono, normalmente, disminuye el contenido en proteína y aumenta las cenizas (Becker, 1977).

AMINOÁCIDOS

El valor nutricional de una proteína se determina por el contenido y disponibilidad de sus aminoácidos constituyentes. De los aminoácidos totales de las algas el 90-98% están en las proteínas (Dortch *et al.*, 1984). Se han realizado y publicado numerosos análisis de la composición de aminoácidos de distintas microalgas, de agua dulce y marina, generalmente a partir de hidrolizados de células completas. Un primer aspecto a considerar es en qué medida la composición de estos hidrolizados es el reflejo de la composición de las proteínas celulares; así, el triptófano se destruye en la hidrólisis ácida porque la ausencia de este aminoácido recogida en algunas publicaciones realmente significa que no ha podido ser detectado por la metodología utilizada.

Comparada con otras proteínas, las proteínas microalgales muestran diferencias en la proporción de aminoácidos, pero en general es una distribución bien equilibrada que incluye todos los aminoácidos esenciales.

La tabla 2 muestra la composición de aminoácidos de distintas algas de agua dulce y marinas. El análisis de aminoácidos de casi todas las algas muestra que las proporciones de aminoácidos individuales no varían mucho entre las diferentes especies, aunque puede haber variaciones en función de condiciones ambientales. Pueden existir deficiencias en los aminoácidos de azufre, metionina y cisteína, lo que es común en muchas proteínas de plantas. Por el contrario suelen ser ricas en lisina, aminoácido limitante en muchos cereales. En cualquier caso hay que tener en cuenta que los valores que se dan en esta tabla no corresponden a microalgas cultivadas en condiciones idénticas.

Algunos aminoácidos pueden no ser disponibles para la digestión y absorción de un animal, si partes de su molécula están unidas a otras moléculas. Por

Tabla 2.- Diferentes patrones de aminoácidos de las principales algas de agua dulce y de agua de mar utilizadas en biotecnología microalgal y maricultura (Fábregas y Herrero, 1986; Becker, 1988 y Brown *et al.*, 1994)

	Ile	Leu	Val	Lys	Phe	Tyr	Met	Cys	Trp	Thr	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Pro	Ser	
Agua dulce																			
<i>Spirulina maxima</i>	6.8	10.9	7.5	5.3	5.7	5.0	2.3	0.7	1.5	5.6	9.0	7.2	12.2	17.4	6.6	2.0	4.1	4.9	
<i>S. maxima</i>	6.0	8.0	6.5	4.6	4.9	3.9	1.4	0.4	1.4	4.6	6.8	6.5	8.6	12.6	4.8	1.8	3.9	4.2	
<i>S. platensis</i>	6.7	9.8	7.1	4.8	5.3	5.3	2.5	0.9	0.3	6.2	9.5	7.3	11.8	10.3	5.7	2.2	4.2	5.1	
<i>Spirulina sp.</i>	4.8	8.4	5.4	4.7	4.0	n.d.	2.3	1.0	1.5	4.6	6.9	6.6	9.1	12.2	4.9	1.6	3.8	4.9	
<i>Oscillatoria amphibia</i>	6.1	9.3	7.0	5.1	4.9	4.3	1.0	n.d.	1.5	6.7	9.1	7.3	10.6	13.9	5.8	1.3	4.8	5.2	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3.6	7.3	6.0	5.6	4.8	3.2	1.5	0.6	0.3	5.1	9.0	7.1	8.4	10.7	7.1	2.1	3.9	3.8	
<i>S. obliquus</i>	3.7	8.1	5.5	5.6	5.0	n.d.	2.1	1.4	1.4	4.8	7.8	5.3	9.0	10.0	5.5	1.6	4.6	4.3	
<i>S. obliquus</i>	3.4	9.6	5.4	6.4	5.8	2.8	1.4	n.d.	n.d.	6.7	10.3	6.3	10.2	12.4	6.8	1.7	5.3	5.9	
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	4.5	9.3	7.9	5.9	4.2	1.7	0.6	0.7	n.d.	4.9	12.2	5.8	8.8	10.5	10.4	1.7	5.0	5.2	
<i>C. pyrenoidosa</i>	3.4	4.0	5.1	7.9	4.5	2.7	1.8	n.d.	1.4	3.2	5.9	5.6	5.9	9.3	4.8	1.4	4.0	2.2	
<i>C. vulgaris</i>	3.2	9.5	7.0	6.4	5.5	2.8	1.3	n.d.	n.d.	5.3	9.4	6.9	9.3	13.7	6.3	2.0	5.0	5.8	
<i>Dunaliella primolecta</i>	5.5	11.1	5.6	5.3	5.4	3.7	1.9	0.8	n.d.	5.5	7.5	6.1	11.3	11.7	5.8	0.5	n.d.	4.7	
<i>D. bardawil</i>	4.2	11.0	5.8	7.0	5.8	3.7	2.3	1.2	0.7	5.4	7.3	7.3	10.4	12.7	5.5	1.8	3.3	4.6	
Agua de mar																			
<i>Isochrysis galbana</i>	4.9	10.5	6.0	12.1	6.1	4.0	0.9	0.9	n.d.	6.1	7.5	8.7	7.0	5.3	5.3	2.5	4.3	4.8	
<i>Isochrysis sp clon T-ISO</i>	4.8	9.7	6.5	6.7	5.4	4.0	2.1	n.d.	tr.	5.8	8.1	7.8	11.1	15.1	5.3	2.3	n.d.	5.4	
<i>Pavlova lutheri</i>	2.9	6.7	5.0	8.2	2.8	2.2	1.6	1.1	1.7	3.6	8.3	11.3	6.1	6.3	6.7	3.6	3.2	4.3	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	5.5	9.1	5.9	7.3	5.9	4.5	2.3	n.d.	tr.	5.9	7.7	6.4	11.4	15.0	5.5	2.3	n.d.	5.9	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5.1	8.9	6.4	5.1	5.7	3.2	1.9	0.6	0.0	5.7	8.3	9.6	10.8	13.4	7.0	1.4	4.4	5.1	
<i>Skeletonema costatum</i>	5.9	8.4	5.5	7.9	5.5	3.9	1.3	n.d.	tr.	5.5	9.2	6.1	11.3	16.9	5.5	2.1	n.d.	5.5	
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	5.6	9.6	6.7	6.3	6.0	3.6	2.3	1.0	0.4	4.2	6.8	6.6	10.3	11.2	7.0	2.4	4.9	5.0	
<i>Dunaliella salina</i>	tr.	tr.	4.2	12.0	4.5	tr.	tr.	n.d.	tr.	6.3	19.0	tr.	16.5	13.6	16.8	n.d.	tr.	n.d.	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	4.2	10.7	5.3	13.8	6.6	4.1	0.8	0.7	n.d.	2.6	7.5	7.2	7.5	9.5	5.5	2.5	4.1	4.5	
<i>Tetraselmis suecica</i>	4.2	9.2	5.6	9.8	5.9	3.5	1.4	0.6	n.d.	5.3	6.8	7.6	7.5	9.9	5.8	2.5	6.0	4.9	
<i>Chlorella stigmatophora</i>	3.8	9.3	5.7	13.4	5.5	3.7	1.4	1.4	n.d.	4.9	7.9	8.6	6.5	8.5	5.4	2.2	5.2	4.1	

tr.: presente en cantidades traza; n.d.: no detectado

ejemplo, el grupo amino libre de la lisina a veces se une a carbohidratos. Esto es frecuente en el proceso de secado y debe tenerse en cuenta si se usan algas secas en alimentación animal. La mayoría de los métodos de análisis de aminoácidos no diferencian la lisina disponible de la no disponible, aunque se ha citado un 85% de disponibilidad para la lisina en *Spirulina* (Richmond, 1986)

El análisis de la composición bioquímica de 16 especies de microalgas marinas comúnmente utilizadas en acuicultura, en las mismas condiciones de cultivo, mostró que la composición en aminoácidos de las microalgas fue bastante similar, aunque *T. chui* y *T. suecica* fueron más ricas en arginina, mientras que *N. atomus* tenía elevados niveles de prolina (Brown, 1991). No obstante, en general se considera que las diferencias en las cualidades nutricionales de las microalgas marinas en acuicultura no están en la mayoría de los casos relacionadas con la composición de aminoácidos. La composición en aminoácidos de las microalgas es bastante similar a la del huevo (considerada de alto valor biológico en nutrición humana) aunque ésta es más rica en metionina y menor en arginina. Este aspecto es poco claro. Así pequeñas variaciones en la composición de aminoácidos no presentan frecuentemente correlación con grandes diferencias en su capacidad para la nutrición de un determinado animal. No hay evidencias claras sobre el efecto de deficiencias en un aminoácido de una especie microalgal y su adecuación como alimento. Así especies microalgales carentes de un determinado aminoácido dan pobres crecimientos, pero especies con valores bajos de un aminoácido dan en unos casos buenos resultados y otros malos.

CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos aunque no forman parte principal de los constituyentes primarios juegan un papel importante. Suelen formar parte del material de reserva o componentes de la pared celular.

Aparte de los contenidos totales en carbohidratos (Tabla 1), se han realizado pocos análisis sobre la composición cualitativa de carbohidratos de microalgas. Los carbohidratos totales están constituidos por la fracción de polisacáridos (que puede constituir desde el 45 al 97% de los carbohidratos totales), monosacáridos y oligosacáridos. Los perfiles de carbohidratos de las especies microalgales varían ampliamente.

Análisis de la composición de monosacáridos de distintas microalgas marinas mostraron cierta variabilidad, siendo los principales azúcares glucosa, galactosa, manosa y ribosa, con otros azúcares en distintas proporciones (Brown *et al.*, 1989), si bien las condiciones de cultivo no fueron idénticas en todos los casos.

Por el contrario, análisis de la composición de azúcares de los polisacáridos de 16 especies de microalgas marinas utilizadas en acuicultura y cultivadas en condiciones idénticas mostraron mayores diferencias entre especies y entre clases, mientras que no había apenas diferencias en la composición de aminoácidos. La glucosa fue el azúcar principal, mientras que la ramnosa, fucosa, ribosa, arabinosa, xilosa, manosa y galactosa fueron detectadas en proporciones muy variables (Brown, 1991). Las variaciones en la composición de azúcares podría contribuir a las diferencias en el valor nutricional de algunas especies, dado que los animales digieren los polisacáridos de diferente composición a diferentes tasas, aunque es un aspecto poco conocido (Brown *et al.*, 1989).

También existen diferencias en los polisacáridos microalgales. En las diatomeas predominan la crisolaminarina (glucano β 1- \rightarrow 3) y mananos, mientras que los fitoflagelados contienen glucanos principalmente de glucosa y galactosa. Las algas rojas acumulan altos niveles de polisacáridos sulfatados.

Muchas microalgas almacenan polisacáridos como productos de reserva en forma de gránulos de almidón, y en las Chlorophyceae y Prasinophyceae están siempre dentro de los cloroplastos, al igual que en las plantas superiores. En las Cryptophyceae el almidón se encuentra entre la envoltura del cloroplasto y la cubierta de retículo endoplasmático que rodea al cloroplasto. En otros grupos como las Dinophyceae y Rhodophyceae los gránulos de almidón están libres en el citoplasma. Los gránulos de almidón varían bastante en forma y tamaño. En las Euglenophyceae encontramos como producto de reserva otro polisacárido, el paramilón, que forma gránulos que están libres en el citoplasma o alrededor del pirenoide. En las Chrysophyceae y Haptophyceae existe como material polisacárido líquido de reserva la leucosina (crisolaminarina). Aparece en forma de grandes gotas situadas normalmente cerca del extremo posterior de la célula.

LÍPIDOS

Los lípidos de las microalgas pueden variar desde menos de 1% hasta más del 40% del peso seco (Paoletti, 1976). Los factores ambientales pueden afectar tanto a las proporciones relativas de ácidos grasos como a la cantidad total de lípidos, como se verá posteriormente. El mayor aumento de la fracción lipídica se produce cuando el nitrógeno es limitante; por ejemplo, en las diatomeas, se acumula grasa en las células llegando hasta un 80% si la cantidad de nitrógeno suministrada a los cultivos es baja. Otros factores que pueden influir son luz, temperatura, ciclo luz-oscuridad (Shifrim y Chisholm, 1980; Piorreck *et al.*, 1981).

Tabla 3.- Diferentes fracciones de lípidos presentes en las distintas calses de algas. (* expresada en % sobre la materia seca. # % sobre el total de lípidos). (modificada de Borowitzka, 1988)

<i>Clase</i>	<i>Lípidos totales*</i>	<i>Neutros#</i>	<i>Glicolípidos#</i>	<i>Fosfolípidos#</i>
Cianobacterias	2-23	11-68	12-41	16-50
Chlorophyceae	1-70	21-66	6-26	17-53
Crysoephyceae	12-72	-	-	-
Prymnesiophyceae	5-48	-	-	-
Cryptophyceae	3-17	-	-	-
Xanthophyceae	6-16	44	17	39
Rhodophyceae	1-14	41-58	42-59	-
Bacillariophyceae	1-39	14-60	13-44	10-47

Existen notables diferencias en la bioquímica y metabolismo de los lípidos de las distintas microalgas. Así, las cianobacterias muestran una variedad intrínseca en la composición de ácidos grasos, pero la biosíntesis de los mismos no se ve apenas influenciada por factores ambientales. Por el contrario, en las algas verdes la composición de ácidos grasos varía mucho en función de factores ambientales y organismos taxonómicamente distintos con frecuencia presentan una composición similar al crecer en idénticas condiciones (Materassi *et al.*, 1980).

Los lípidos y ácidos grasos funcionan como componentes de membrana, como productos de reserva, como metabolitos y como fuentes de energía.

La fracción lipídica se divide en lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) y lípidos neutros (triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenonas, esteroides y pigmentos) (Tabla 3). La mayoría de los lípidos microalgales son lípidos polares (fundamentalmente fosfolípidos y glicolípidos), que son componentes de membrana comunes; y los triglicéridos (neutros) que son una reserva de ácidos grasos para la división celular, energía metabólica, mantenimiento de la membrana, síntesis y una amplia variedad de funciones fisiológicas. Los triglicéridos pueden llegar a constituir hasta el 80% del total de lípidos en microalgas eucariotas. Las cantidades relativas de cada clase de lípido en las células microalgales pueden cambiar considerablemente con variaciones de las condiciones de cultivo.

Las vías básicas para la síntesis de lípidos en algas son análogas a las que se encontraron en aceites de semilla de plantas superiores; sin embargo, hay ciertas cepas microalgales que producen ácidos grasos únicos de cadena larga o altamente insaturados.

Las principales diferencias con las plantas superiores son: 1) el hecho de que las microalgas responden a fluctuaciones de las condiciones de crecimiento o diferentes tipos de estrés con variaciones en la composición de ácidos grasos de sus lípidos; y 2) que, en contraste a las plantas superiores, las células microalgales que acumulan grasa están realizando fotosíntesis, lo que significa que la vía completa desde la fijación del CO_2 hasta la síntesis de triacilglicerol puede ser ajustada por la célula. Como bajo todas estas condiciones de estrés la síntesis de lípidos ocurre cuando la actividad fotosintética decrece, la máxima producción de acilglicerol en algas oleaginosas se obtiene en dos pasos: 1) rápido crecimiento bajo condiciones óptimas seguido de 2) imposición de deficiencia en N u otros factores de estrés con el propósito de conseguir un máximo contenido en lípidos. Muchos sistemas de microalgas podrían ser competitivos, ya que aunque la mayoría de los lípidos microalgales tienen una composición en ácidos grasos similar a la de aceites vegetales comunes, hay varios ácidos grasos inusuales de elevado valor que pueden ser sintetizados exclusivamente por una variedad de microalgas (Becker, 1994).

ACIDOS GRASOS

Constituyen la mayor fracción de lípidos microalgales, suponiendo del 20 al 40% de los lípidos totales. Están formando ésteres de glicerol y se encuentran en los tri- y diglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos. La mayoría de la literatura muestra estudios del contenido total de ácidos grasos, aunque hay algunos datos sobre perfiles de las distintas fracciones (Fried *et al.*, 1982; Shefer *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1989; Volkman *et al.*, 1989).

La mayoría de los ácidos grasos encontrados en los lípidos microalgales son moléculas de cadena recta con un número par de átomos de C (generalmente entre C12 y C22) resultado de su biosíntesis desde acetato por alfa-adición. Pueden ser saturados o insaturados.

Los ácidos monoinsaturados suelen provenir de un precursor común, o por elongación de la cadena o por beta-oxidación (Fig. 27a). Los ácidos grasos poliinsaturados se suelen dividir en familias según la derivación a partir de precursores biosintéticos. Las más importantes son las familias $\omega 3$, $\omega 6$ y $\omega 9$. Algunos de los más importantes son:

Nombre sistemático	nombre vulgar
serie $\omega 6$:	
9, 12 octadecadienoico (18:2 $\omega 6$)	linoleico
6, 9, 12 octadecatrienoico (18:3 $\omega 6$)	γ -linolénico
8, 11, 14 eicosatrienoico (20:3 $\omega 6$)	homo- γ -linolénico
5, 8, 11, 14 eicosatetraenoico (20:4 $\omega 6$)	araquidónico

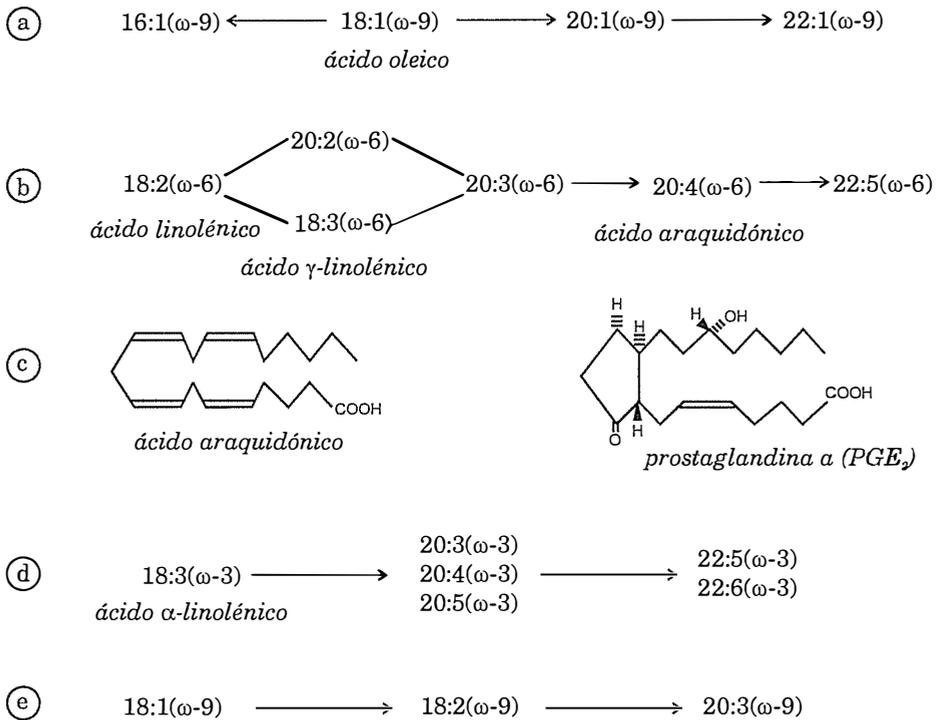


Figura 27.- Bioderivación de los ácidos grasos a partir de sus precursores (modificado de Christie, 1987).

4, 7, 10, 13, 16 eicosapentaenoico (20:5 ω 6)	-
serie ω3	
9, 12, 15 octadecatrienoico (18:3 ω 3)	β -linolénico
5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaenoico (20:5 ω 3)	-
7, 10, 13, 16, 19 docosapentaenoico (22:5 ω 3)	-
4, 7, 10, 13, 16, 19 docosahexaenoico (22:6 ω 3)	-
serie ω9	
5, 8, 11 eicosatrienoico (20:3 ω 9)	-

El ácido linoléico (18:2 ω 6) es generalmente el más ampliamente extendido y está presente en numerosas plantas y animales. Es un ácido esencial en las dietas animales ya que no pueden sintetizarlo. Este ácido sirve de precursor para una familia de ácidos grasos que se forman por desaturación y elongación de

cadena, manteniéndose la estructura $\omega 6$ (Fig. 27b). De éstos es de particular importancia el ácido araquidónico, como un componente esencial de los fosfolípidos de membrana y precursor de las prostaglandinas (Fig. 27c). Estas están implicadas en funciones esenciales en el cuerpo, como regulación de la presión sanguínea, de la síntesis del colesterol, inflamación y proliferación celular. Las grasas saturadas en la dieta así como el alcohol y otros factores suprimen la formación de PGE1. El octadecatrienoico (18:3 $\omega 6$) es un importante intermediario en la síntesis del araquidónico y constituyente de ciertos aceites de semillas (Chistie, 1987).

En muchas plantas superiores el ácido linolénico (18:3 $\omega 3$) es punto final de la biosíntesis. Pero en otros casos, como en algunas microalgas, puede ser el precursor de otra importante familia de ácidos grasos con estructura $\omega 3$ (Fig. 27d). Estos ácidos grasos son componentes nutritivos esenciales especialmente en peces y otros invertebrados. El 20:5 $\omega 3$ y el 22:6 $\omega 3$ parecen tener funciones especiales en los fosfolípidos del tejido nervioso y en el ojo, y el primero es precursor de prostanoides específicos.

Otra familia de ácidos grasos poliinsaturados ($\omega 9$) deriva del ácido oleico (Fig. 27e) y parecen importantes en animales con deficiencia en ácidos grasos.

No obstante se han descrito variaciones respecto a estos esquemas generales de síntesis en diferentes especies microalgales, sin que se puedan correlacionar con grupos taxonómicos, aunque la síntesis de ácidos grasos hasta el esteárico parece ser la misma en todas las microalgas estudiadas hasta ahora, excepto en un dinoflagelado.

Los ácidos grasos más importantes desde un punto de vista económico son algunos de los poliinsaturados, como linoleico (9,12-18:2 $\omega 6$), γ -linolénico (9,12-18:3 $\omega 6$), dihomo- γ linolenico (8,11,14-20:3 $\omega 6$), araquidónico (5,8,1,14-20:4 $\omega 6$) y eicosapentanoico (5,8,11,14,17-20:5 $\omega 3$). Excepto el linoleico, son raros en plantas y animales pero ciertas microalgas contienen relativamente grandes cantidades de algunos de ellos. Algunos de los ácidos grasos poliinsaturados que se han encontrado en los lípidos microalgales son importantes fármacos. Son precursores de prostaglandinas, prostaciclina y leucotrienos, y como tales son interesantes para la industria farmacéutica. Existen patentes para su uso como antihipertensivos, como tratamiento de la hiperlipidemia, para reducir el colesterol, como alimentos sanos, etc.

En la tabla 4 se presentan contenidos en ácidos grasos de especies dulceacuicolas de interés comercial y especies marinas usadas en acuicultura. Las diferentes clases de algas pueden mostrar diferentes patrones de distribución

Tabla 4: Ácidos grasos de algunas microalgas utilizadas en maricultura y en biotecnología. A: *Isochrysis galbana*; B: *Isochrysis sp* clon T-ISO, C: *Paulova lutheri*; D: *Chaetoceros calcitrans*; E: *Phaeodactylum tricornutum*; F: *Skeletonema costatum*; G: *Thalassiosira pseudonana*; H: *Dunaliella salina*; I: *Tetraselmis suecica*; J: *Spirulina platensis*; K: *Scenedesmus acutus*; L: *Chlorella vulgaris*; M: *Dunaliella bardawill*. tr.: traza. - : no detectado (Brown et al., 1989; Becker, 1994)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
saturados	37.0	32.2	35.9	30.2	30.2	39.2	27.2	23.3	26.8	48.2	17.2	40.3	44.6
monoinsaturados	30.4	26.1	20.4	33.8	35.3	32.0	19.5	24.0	20.5	13.6	16.1	14.4	15.9
C16 poliinsaturados	0.4	2.6	0.8	13.1	10.2	13.1	22.2	6.8	17.2	1.2	27.0	1.7	3.7
18:2ω6	2.3	2.5	1.5	0.8	1.1	2.2	0.4	10.9	13.9	14.5	6.0	1.5	15.1
18:3ω6	0.2	2.1	0.1	0.4	-	0.3	0.2	-	2.7	21.1	-	-	-
18:3ω3	0.4	3.6	1.8	tr.	1.3	0.3	0.3	30.5	4.6	0.3	28.0	-	20.5
18:4ω3	8.0	17.4	6.0	0.5	1.3	2.2	5.3	-	4.8	-	-	-	-
18:5ω3	-	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	-
20:4ω6	0.1	-	tr.	5.7	-	-	0.3	-	2.1	0.4	-	20.8	-
20:4ω3	-	-	-	0.2	-	tr.	0.3	-	0.1	-	-	-	-
20:5ω3	7.2	0.2	19.7	11.1	14.7	6.0	19.3	-	5.3	-	-	-	-
22:5ω6	-	1.8	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22:6ω3	4.3	8.3	9.4	0.8	0.3	2.0	3.9	-	tr.	-	-	-	-

de ácidos grasos y hay numerosas variaciones entre especies muy próximas e incluso dentro de la misma especie en función de las condiciones de cultivo. Como se ve en la tabla, *Spirulina platensis* puede servir como valiosa fuente de γ -linolénico, dado que el 20-30% de sus ácidos grasos lo constituye este compuesto. Se ha comprobado que el γ -linolénico disminuye el colesterol en plasma y se ha utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades.

La rodofícea *Porphyridium cruentum* es una de las fuentes naturales más importantes de araquidónico, que constituye el 36% de sus ácidos grasos totales a 25°C de temperatura de cultivo. A temperaturas más bajas (16°C) esta proporción puede aumentar hasta un 60% (Arad, 1988).

Otros constituyentes lipídicos:

Los fosfolípidos pueden constituir hasta el 50% de los lípidos totales pero suele haber una media mucho menor en la mayoría de las especies. Las subfracciones de fosfolípidos detectadas en la mayoría de las microalgas incluyen fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y difosfatidilglicerol (Ben-Amotz *et al.*, 1985).

Los esteroides son componentes mínimos de la fracción lipídica (0.2-5.5%) (Ballantine *et al.*, 1979)

Los hidrocarburos y alquienonas constituyen una fracción minoritaria. Sin embargo, en el alga halotolerante *Botryococcus braunii* pueden alcanzar niveles de hasta el 15% (Bachofen, 1982).

GLICEROL

Todas las células, incluidas las microalgas, están rodeadas por membranas que separan el citoplasma celular del medio. Estas membranas son más o menos permeables al agua pero casi impermeables a los solutos. En este contexto es esencial para todas las células mantener un balance entre la presión osmótica del interior celular y su medio circundante. Dentro de ciertos límites la célula es capaz de responder a las fluctuaciones osmóticas de los ambientes acuáticos mediante la asimilación o excreción de agua. Como respuesta a elevadas concentraciones de sal en el medio, la célula equilibra el aumento de los solutos externos aumentando la síntesis de solutos dentro del citoplasma y/o aumentando la asimilación de solutos desde el exterior.

Las algas representan un grupo de organismos que presentan un amplio rango de tolerancia a diferentes concentraciones de sal en sus ambientes, que van desde cantidades milimolares de sal hasta las soluciones saturadas de sal. Con respecto a esta habilidad para resistir bajas o altas concentraciones de sal, las

microalgas pueden dividirse en halotolerantes y halófilas; estas últimas necesitan sal para un crecimiento óptimo, mientras que las halotolerantes presentan mecanismos osmorreguladores que le permiten sobrevivir en medios salinos.

El ejemplo más conocido de osmorregulación es el del género *Dunaliella*, con diferentes especies y cepas que viven en medios con concentraciones de sal entre 0.1 y 8 M (saturación). El componente orgánico mayoritario que permite sobrevivir a esta microalga en ambientes extremos es el glicerol, y ya se ha propuesto la extracción y comercialización de este compuesto (Avron, 1992).

Se ha sugerido que existen, además del glicerol, otros osmorreguladores: aminoácidos, carbohidratos, manitol, manosa, sorbitol, etc, que protegen la actividad enzimática a elevadas presiones osmóticas.

Con lo poco que se sabe, es evidente que la fracción lipídica de las microalgas se caracteriza por una elevada variabilidad, que puede ser controlada y modificada por las condiciones ambientales y de cultivo. Las cianobacterias muestran una variabilidad intrínseca en la composición de ácidos grasos apenas modificable por factores externos, mientras que las clorofíceas responden de manera acentuada a los cambios ambientales.

Como se ha dicho anteriormente, las microalgas pueden contener cantidades significativas de lípidos parecidos a los aceites vegetales y de pescado, que podrían ser considerados como sustitutos de productos del petróleo, obtenidos por extracción directa o por refinamiento. También pueden ser utilizados como sustitutos de los aceites vegetales, tanto en nutrición humana como animal o directamente en la producción de plásticos y cosméticos.

Algunos lípidos microalgales pueden utilizarse como surfactantes con propiedades diferentes a las de los compuestos sintéticos. La ventaja de estos derivados microalgales (fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina y diferentes galactosil-diglicéridos) es que son biodegradables.

PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Los pigmentos forman parte de la fracción lipídica polar. Las microalgas, al igual que las restantes algas, contienen 3 grupos principales de pigmentos: clorofilas, carotenos y ficobilinas. Los principales pigmentos son las clorofilas y los carotenoides, que suponen del 0.5 al 5% del peso seco de la célula (Ben-Amotz *et al.*, 1985). Las cianobacterias, algas rojas y criptomonadinas también poseen ficobilinas.

CLOROFILAS

La clorofila a es el pigmento fotosintético primario en todas las microalgas (incluidas cianobacterias). Los diferentes *phyla* de algas eucariotas pueden tener clorofila b, c ó d como accesorias, mientras que las cianobacterias no poseen más que clorofila a, a excepción de las Prochorales que tienen además clorofila b.

En las microalgas y plantas superiores la clorofila forma un complejo con proteínas *in vivo*. Los distintos complejos proteína-clorofila tienen distintos espectros de absorción dependiendo del tipo de proteína así como de la clorofila. El espectro de absorción normal a temperatura ambiente muestra solamente una amplia banda a 675 nm para la clorofila a en rojo. Las clorofilas b, c y d están limitadas sólo a ciertas especies de microalgas; b en Prasinophyceae, Euglenophyceae, Chlorophyceae; c en Cryptophyceae, d en Rhodophyceae).

La acumulación de clorofila parece estar íntimamente coordinada con el desarrollo de los tilacoides y la actividad fotosintética. La síntesis de clorofilas, aunque puede ocurrir en plastos, parece estar bajo control nuclear, y los últimos pasos requieren cooperación entre los genomas nuclear y del plasto para la síntesis de los componentes estructurales del aparato fotosintético.

Diversos nutrientes tienen un marcado efecto sobre la formación de clorofilas en microalgas. Deficiencias en hierro, nitrógeno y magnesio inhiben la síntesis y acumulación de clorofila. La abundancia de carbono orgánico en el medio y la alta intensidad luminosa también inhiben la formación de clorofilas en algunas microalgas.

CAROTENOIDES

Los carotenoides son moléculas poliisoprenoides que poseen dobles enlaces conjugados y un anillo de ciclohexano en cada extremo de la molécula. El licopeno es probablemente el precursor de todos los carotenoides encontrados en microalgas.

Los carotenoides funcionan como fotoprotectores y pigmentos captadores de luz (Cohen, 1986). Cada especie algal puede contener entre 5 y 10 carotenoides distintos; se conocen unos 60 carotenoides en los distintos *phyla* algales.

El β -caroteno es un carotenoide típico que se encuentra en todas las algas y plantas superiores. Se encuentra en mayores concentraciones en las algas verdes. Generalmente supone menos del 1% del peso seco, pero puede acumularse hasta niveles del 10% en algas halotolerantes como *D. bardawil* (Ben-Amotz y Avron, 1989) y *D. salina* (Borowitzka, 1988). Las mayores concentraciones de β -caroteno se obtienen en condiciones de salinidad e iluminación elevadas. En *D. bardawil* el β -caroteno está compuesto principalmente como 9*cis* y todo-*trans*; la

acumulación de β -caroteno y un aumento de la relación entre el *9cis* y el *trans* depende de la intensidad de luz pero no de la longitud de onda (Ben-Amotz y Avron, 1989).

Los carotenoides más complejos pueden derivar de ciertos esqueletos carbonados por una progresión de modificaciones químicas acompañadas de cambios en sus estados de oxidación. La variedad de carotenoides es mayor en microalgas que en plantas superiores. Algunos grupos de algas tienen nombres comunes que reflejan su contenido en carotenoides, por ejemplo, las algas pardas, Phaeophyceae, que contienen varias xantofilas, sobre todo fucoxantina. La mayoría de los carotenoides son amarillos o anaranjados, pero su color puede estar enmascarado por la clorofila predominante.

Existen muchos tipos de xantofilas en microalgas. La similitud entre las Chlorophyceae y las plantas superiores se manifiesta de nuevo por el elevado contenido en luteína en estas algas. Las Rhodophyceae y Cryptophyceae también contienen cantidades considerables de este pigmento. Las otras xantofilas importantes son la peridina, que es la xantofila primaria de los dinoflagelados, y fucoxantina presente en Phaeophyceae y Bacillariophyceae.

Con frecuencia es difícil determinar la banda precisa de absorción de uno cualquiera de los carotenoides de microalgas debido a que además de que normalmente existe más de un tipo de carotenoide, sus bandas de absorción también se superponen con las de las clorofilas. En general, las bandas de absorción de los carotenoides *in vivo* están entre 400 y 540 nm.

FIGOBILINAS

Las ficobilinas, pigmentos solubles en agua, se encuentran en abundancia sólo en cianobacterias y en algas rojas, aunque se han encontrado trazas de distintos tipos de ficobilinas en especies aisladas de otros grupos algales. Las cianobacterias contienen fundamentalmente ficocianina y las Rhodophyceae ficoeritrina. Ambas contienen pequeñas cantidades de aloficocianina. La presencia de estos pigmentos es muy importante para la capacidad de captación de luz de estas bacterias y algas. Las ficobilinas captan mucha de la energía dejada por las clorofilas y carotenoides, haciendo que las cianobacterias y las algas utilicen más eficientemente la radiación solar en la fotosíntesis. Esto es posible debido a la característica absorción de las ficobilinas: ficocianina en 620 nm, ficoeritrina en 545 nm y aloficocianina en 650 nm *in vivo*.

La mayor característica identificativa de una molécula de pigmento es su espectro de absorción; sin embargo, los espectros de absorción de la mayoría de los pigmentos cambian con la extracción, y se obtienen distintos espectros de la

misma molécula en diferentes solventes y a diferentes temperaturas. Por tanto, los espectros de absorción sólo pueden compararse cuando se obtienen en condiciones similares.

ACIDOS NUCLEICOS

La fracción de ácidos nucleicos puede variar del 1 al 10%, aunque el rango usual es 4-6%. La relación RNA:DNA es aproximadamente 3:1. Cuando las algas crecen en condiciones favorables la relación puede ser 50-200:1 (debido a la síntesis proteica) (Fábregas *et al.*, 1986a, b).

El nivel de ácidos nucleicos es mayor en las microalgas (4-7%) que en las plantas superiores (1-2%), pero es menor que en las levaduras (10-12%) y bacterias (hasta el 20%).

MINERALES

La fracción mineral (cenizas) de las células algales puede proporcionar una fracción importante del peso seco. En general, las microalgas marinas presentan un contenido en cenizas mayor que el de las especies dulceacuícolas. Hay todavía menos trabajos sobre contenido mineral en microalgas dulceacuícolas. En *Scenedesmus* y *Spirulina* las cenizas suponen entre el 6 y el 15% del peso seco y los elementos más abundantes son el P y el K (Becker y Venkataraman, 1982). En distintas microalgas marinas se ha encontrado un contenido en minerales entre 6-39%, pero hay muy pocos análisis detallados. De las especies estudiadas, los mayores contenidos minerales se dan en las diatomeas (Brown *et al.*, 1989). No obstante, hay que tener cuidado a la hora de realizar el análisis de cenizas, sobre todo en microalgas marinas, ya que la interferencia de las sales del medio puede dar lugar a sobreestimaciones.

El contenido en minerales es importante en las microalgas marinas que se utilizan en acuicultura, aunque la capacidad de acumular metales pesados puede ser una desventaja. Aunque hay pocos trabajos sobre la composición elemental de las cenizas, los datos existentes muestran que presentan los elementos requeridos en las dietas de invertebrados, como P, Ca, Mg, Fe, etc. (Brown *et al.*, 1989). Por ello, se ha sugerido la incorporación de microalgas marinas secas en dietas de peces que puedan sustituir, al menos en parte, la adición de minerales a la dieta. Esta incorporación de microalgas es especialmente efectiva en las dietas de peces

Tabla 5.- Contenidos en vitaminas (expresada en mg kg⁻¹ de materia seca) de distintas especies de microalgas cultivadas. 1: *Spirulina platensis*; 2.- *Spirulina maxima*; 3.- *Scenedesmus obliquus*; 4.- *Scenedesmus quadricauda*; 5.- *Chlorella pyrenoidosa*; 6.- *Tetraselmis suecica*; 7.- *Isochrysis galbana*; 8.- *Dunaliella tertiolecta*; 9.- *Chlorella stigmatophora*. (Tomado de Becker 1994 y Fábregas & Herrero, 1990).

Vitaminas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vitamina A	840	225	230	554	480	296	76	825	493
Tiamina (B ₁)	44	14	8	11.5	10	32.2	14.0	29.0	14.6
riboflavina (B ₂)	37	28.5	36.6	27	36	19.1	30.0	31.2	19.6
piridoxina (B ₆)	3	1.3	2.5	-	23	2.8	1.8	2.2	1.9
cobalamina (B ₁₂)	7	0.3	0.4	1.1	0.02	0.5	0.6	0.7	0.7
Vitamina C	80	103	20	396	-	191.0	119.0	163.2	100.2
Vitamina E	120	-	-	-	-	421.8	58.2	116.3	669.0
acido nicotínico	-	-	120	108	240	89.3	77.7	79.3	82.5
biotina	0.3	-	0.2	-	0.15	0.8	1.0	0.9	1.1
acido fólico	0.4	-	0.7	-	-	3.0	3.0	4.8	3.1
acido pantoténico	13	-	16.5	46	20	37.7	9.1	13.2	21.4

marinos, y así la mayoría de las necesidades minerales del rodaballo se pueden cubrir con la incorporación de entre un 3.5 y un 5.7% de microalgas secas a la dieta (Fábregas y Herrero, 1986).

VITAMINAS

Hasta muy recientemente los estudios de vitaminas en microalgas son escasos y difíciles de comparar debido al efecto de la composición del medio de cultivo. Hay poca información acerca de este particular, posiblemente debido a que la determinación de varias vitaminas es bastante difícil. El desarrollo de métodos por HPLC ha facilitado este análisis, pero los análisis anteriores, básicamente microbiológicos, eran difíciles de realizar y los resultados estaban sujetos a muchas interferencias. Como sucede en plantas superiores, el contenido en vitaminas varía dependiendo de las condiciones de crecimiento. Además de estas fluctuaciones a causa de factores ambientales, los métodos utilizados para el secado y procesamiento de la biomasa microalgal reducen la concentración de varias vitaminas. Este hecho es especialmente importante en el caso de las vitaminas B₁, B₂, C y ácido nicotínico que son termolábiles y su concentración disminuye considerablemente durante el proceso de secado, si se compara con el material fresco.

En la tabla 5 se representan los valores de vitaminas en distintas microalgas de agua dulce y marinas. Además de la provitamina A, están presentes vitaminas del grupo B (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12}), biotina, ácido fólico, ácido nicotínico y ácido pantoténico. La biomasa microalgal representa una fuente válida de vitaminas importantes, lo que mejora sus propiedades nutricionales. Es de destacar el contenido en β -caroteno (pro-vitamina A) de la microalga marina *D. tertiolecta*.

VARIABILIDAD BIOQUÍMICA

Distintos trabajos han demostrado la importancia de las condiciones ambientales en la composición bioquímica de las microalgas, realizados fundamentalmente con especies marinas, quedando establecido que la composición de una especie determinada se refiere única y exclusivamente a unas condiciones de cultivo precisas. Estos resultados abren asimismo la posibilidad de manipular la composición bioquímica microalgal simplemente variando los parámetros de cultivo, lo que puede ser una ventaja para la utilización de estas microalgas en acuicultura, alimentación u obtención de productos, ya que de su composición bioquímica dependerá en gran parte su valor nutritivo o importancia comercial.

La alteración de la composición bioquímica de las microalgas puede permitir obtener mayores rendimientos de productos de interés, o, si la biomasa microalgal es utilizada en acuicultura, suministrar un alimento más adecuado a los requerimientos nutricionales de los niveles superiores de la cadena alimentaria, así como optimizar la conversión de nutrientes en biomasa de especies marinas cultivables de importancia comercial. Dada la variabilidad bioquímica de las microalgas, el estado nutricional de éstas es más importante que la especie en sí misma (Goldman, 1976; Wikfors *et al.*, 1984), estado nutricional que depende de su composición bioquímica (Becker y Venkataraman, 1982).

Luz

La intensidad de luz afecta a la composición bioquímica de las microalgas. Un primer efecto claramente definido es a nivel de los pigmentos fotosintéticos. Como ya hemos citado al hablar de parámetros de cultivo (capítulo 3) la adaptación más típica a bajas intensidades de luz es el aumento en el contenido en clorofilas.

Una célula que se encuentre en condiciones limitadas de luz crecerá lentamente, pero hará que la mayor parte de esa energía luminosa sea asequible al producir un sistema más eficiente de captura de luz. La típica adaptación a la sombra, como se observa bajo condiciones de cultivo, implica un incremento de dos

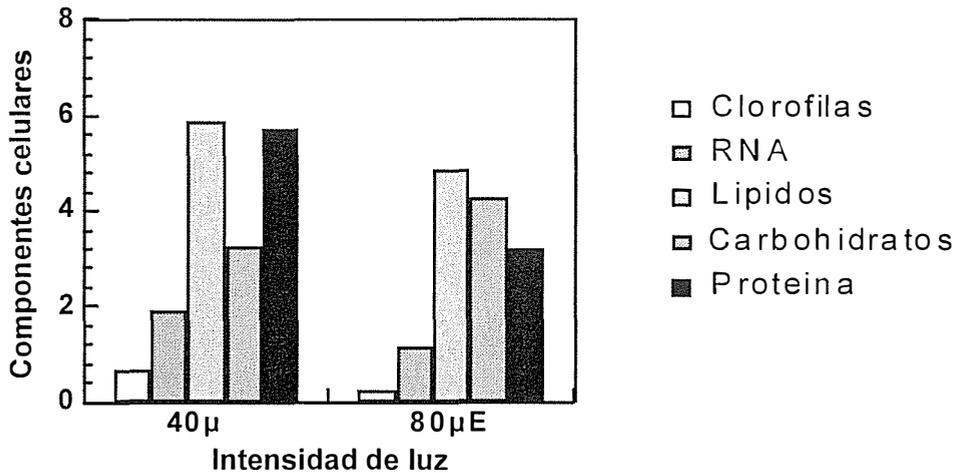


Figura 28.- Composición bioquímica (pg/célula) de *P. tricornutum* en fase estacionaria con diferentes intensidades de luz ($\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

a diez veces el contenido de clorofila por célula con una menor intensidad de saturación (I_k) y una pendiente inicial más pronunciada. Las células expuestas a altas intensidades de luz utilizan menos recursos propios para la síntesis de clorofila y más para la síntesis de la RuBP carboxilasa y quizá otras enzimas de las reacciones oscuras. Como resultado, dichas células se caracterizan por mostrar menos clorofila por célula (a veces correlacionada con una disminución del tamaño del cloroplasto), una menor pendiente inicial, mayor I_k y con frecuencia mayor tasa de fotosíntesis máxima ($F_{m\acute{a}x}$) (Darley, 1982).

En un estudio sobre el efecto de la intensidad de luz sobre la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* se observó que además del crecimiento, la composición bioquímica microalgal también fue afectada. Al aumentar la intensidad de luz aumenta la concentración celular de carbohidratos, mientras que descienden los restantes componentes bioquímicos celulares (Fig. 28). De esta forma las mayores concentraciones celulares de clorofilas, proteínas, RNA y lípidos se obtienen en los cultivos que crecen a la mayor intensidad de luz de las ensayadas (López- Muñoz *et al.*, 1990). El aumento en la cantidad de clorofila al disminuir la intensidad de luz es un mecanismo fotoadaptativo de las células (Falkowski, 1980, 1985; Dubinsky *et al.*, 1986).

La intensidad de luz afecta al esquema de síntesis macromolecular a partir de CO_2 fijado fotosintéticamente (Mortain-Bertrand *et al.*, 1987). A intensidades de luz bajas la incorporación total de CO_2 disminuye, descendiendo también el

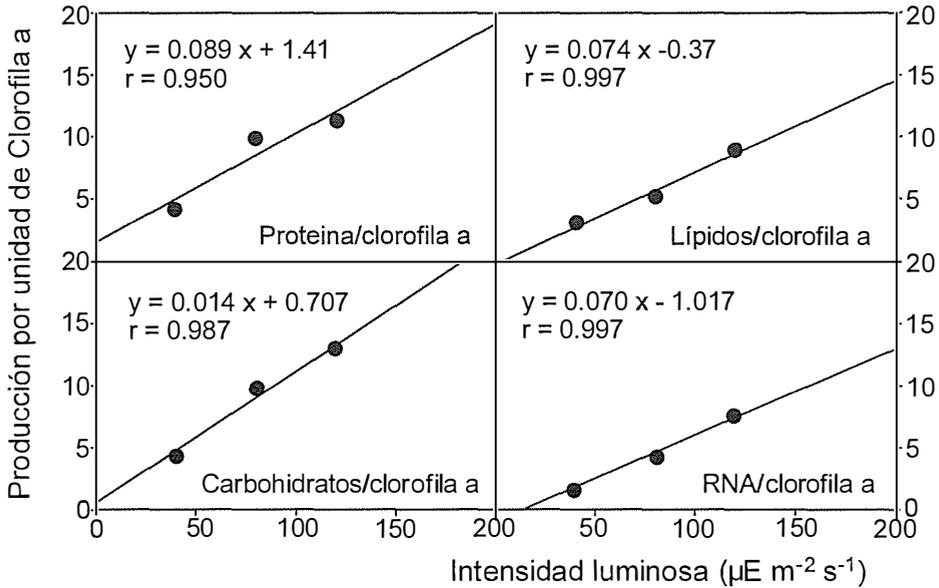


Figura 29.- Producción de los distintos componentes celulares por unidad de clorofila a en función de la intensidad de luz en cultivos de la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Herrero *et al.*, 1991).

porcentaje de C que es fijado en forma de carbohidratos y aumentando el porcentaje de C fijado en forma de proteína. A intensidades más altas de luz, la fijación de carbono 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).

El efecto de la intensidad de luz se estudió también en cultivos de *Tetraselmis suecica*, con resultados similares a los obtenidos para *P. tricornutum*. En función de las variaciones en la composición bioquímica se calculó la producción de los distintos componentes celulares por unidad de clorofila a; las producciones de proteínas, carbohidratos, lípidos y RNA por unidad de clorofila a se ven afectadas de forma significativa por la luz, existiendo una relación lineal entre cada una de ellas y la intensidad luminosa (Fig. 29) (Herrero *et al.*, 1991). Se ha citado que aunque las células a menor intensidad de luz son más eficientes para absorber la energía luminosa (contienen más clorofila), sin embargo el rendimiento del quantum (moles de $\text{O}_2 \cdot \text{einsteinios}^{-1}$) permanece constante, lo cual sugiere que no pueden utilizar la luz absorbida con mayor eficiencia. Las producciones de los distintos componentes por unidad de clorofila a demuestran que a mayor inten-

sidad de luz, aunque la cantidad de clorofila es menor, la luz absorbida se utiliza más eficientemente en el crecimiento y la biosíntesis.

Estudios sobre el efecto de la intensidad luminosa sobre el crecimiento y composición bioquímica de *I. galbana* demostraron que elevadas intensidades de luz provocan la acumulación de carbohidratos, mientras que el contenido celular de lípidos desciende ligeramente. Las variaciones en el contenido celular de lípidos estaban asociados con cambios en la composición en ácidos grasos. Condiciones de elevada iluminación produjeron un aumento de la abundancia relativa de palmítico (C16:0) y oleico (C18:1) y un descenso en el porcentaje del ácido graso poliinsaturado C18:4. La distribución relativa de docosahexanoico (C22:6) aumenta ligeramente bajo condiciones de elevada iluminación. Así la ratio entre ácidos poliinsaturados y saturados decrece cuando *I. galbana* crece en condiciones de elevada iluminación (Sukenik y Wahnnon, 1991). Por el contrario, altas intensidades de luz aumentan el grado de insaturación de los ácidos grasos de *Scenedesmus* (Brown *et al.*, 1989). El mismo efecto de la intensidad de luz sobre los lípidos se observó en *S. platensis*; cuando la iluminación pasa de 170 a 870 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aumenta la tasa de crecimiento y los lípidos totales disminuyen pero la composición en ácidos grasos no se vió afectada (Tedesco y Duerr, 1989).

En *Nannochloropsis* sp., a elevados niveles de irradiancia desciende el contenido total de carotenoides, pero de un modo desproporcional con respecto a la reducción del contenido en clorofila *a*; consecuentemente, la relación carotenoide/clorofila *a* aumenta a medida que aumenta la irradiancia. El contenido celular en proteína se mantiene sin cambios, mientras que el "pool" de carbohidratos y el de lípidos aumentan bajo condiciones de elevada irradiancia (Tabla 6). Asimismo, al aumentar la intensidad de luz se provoca la variación de la distribución celular de ácidos grasos; el porcentaje del 20:5 ω 3 decrece mientras que la distribución relativa del 16:0 y del 16:1 aumentaron a medida que aumentaba el nivel de irradiancia; consecuentemente, la relación de ácidos grasos poliinsaturados con la suma de ácidos grasos saturados y monoenoicos decrece al aumentar la intensidad de luz (Sukenik *et al.*, 1993).

LONGITUD DE ONDA

La influencia de la longitud de onda en la regulación de distintas actividades enzimáticas se refleja en cambios en la composición bioquímica. Así, con luz azul el carbono fijado en el ciclo de Calvin se dirige a un relativo aumento de la producción de proteínas, mientras que con luz roja aumenta la producción de carbohidratos. Células de *Chlorella* cultivadas bajo luz azul contienen un 60% de proteína pero sólo un 15% de carbohidratos, mientras cuando son cultivadas bajo

Tabla 6.- Variaciones en la composición celular y la composición de ácidos grasos de *Nannochloropsis* s.p. cultivada con altas y bajas intensidades de luz (Sukenic *et al.*, 1993)

	Nivel de irradiación del cultivo ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	
	35 (Baja irradiancia)	290 (alta irradiancia)
Contenido celular (pg cell ⁻¹)		
Proteína	4.20	4.11
Carbohidratos	1.16	1.51
Lípidos	2.62	3.27
Clorofila	0.20	0.07
Carotenoides totales	0.11	0.06
Distribución de ácidos grasos (% peso)		
14:0	3.4	3.8
16:0	18.2	36.4
16:1	17.6	25.8
18:0	3.3	3.7
18:1 ω -9	5.1	7.6
18:2 ω -6	6.1	1.2
20:4 ω -6	7.8	4.6
20:5 ω -3	37.6	15.9
ω -3 PUFA/ Σ (S + M)	0.79	0.21

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; S: ácidos grasos saturados; M: ácidos grasos monoinsaturados

luz roja la proteína decrece al 30% y los carbohidratos aumentan al 40% (Grotjohann y Kowallik, 1989)

VARIACIONES DIARIAS

Las fluctuaciones periódicas de la actividad fisiológica de las microalgas producen las consecuentes variaciones en la composición química de las células microalgales. Así, en un cultivo de *Scenedesmus* se encontró que la cantidad de proteína era mayor siempre por la mañana y menor por la tarde, mientras que el contenido en carbohidratos era menor por la mañana y alto en las últimas horas de la tarde. La variación en proteína entre la mañana y la tarde llegaba a ser entre un 10 y un 15 % de la biomasa total (Becker, 1977). En *Cyclotella meneghiniana* el perfil de ácidos grasos varía a lo largo del fotoperiodo, siendo los ácidos grasos saturados la fracción predominante al comienzo de la fase de luz (Brown *et al.*, 1989).

Cuando las células microalgales están creciendo en ciclos de luz-oscuridad la síntesis de proteínas y otras macromoléculas continúa en oscuridad a expensas del carbono y energía almacenados generalmente en los carbohidratos.

TEMPERATURA

No hay demasiados trabajos sobre el efecto de la temperatura en la composición bioquímica microalgal. Se ha citado su influencia en la saturación de ácidos grasos y su relación con estabilidad de las membranas. Así, elevadas temperaturas disminuyen el grado de insaturación de los ácidos grasos en *Scenedesmus* (Brown *et al.*, 1989).

En *Spirulina platensis* cambios de temperatura produjeron cambios en la composición bioquímica. Con un aumento de la tasa de crecimiento el contenido de lípidos aumentó, lo que sugiere que el almacenamiento de carbono aumenta a temperaturas que provocan altas tasas de crecimiento; el grado de saturación de los ácidos grasos aumentó con la temperatura, si bien el efecto de la temperatura sobre el contenido en ácidos grasos y el grado de saturación tuvo una importancia secundaria.

Como se ha citado anteriormente, la interacción entre la intensidad de luz y la temperatura es muy marcada. Ambos factores afectaron de forma significativa al crecimiento y composición de pigmentos de 4 especies de microalgas marinas (Tabla 7). En cuanto al contenido celular en clorofilas, se comportan respecto a la intensidad de luz como se indicó anteriormente para *P. tricornutum*, mientras que respecto a la temperatura, en las microalgas verdes (*T. suecica* y *D. tertiolecta*) los mayores contenidos de clorofilas se obtienen a baja intensidad y la temperatura más alta de las ensayadas, mientras que en *I. galbana* y *P. tricornutum* se obtienen a baja intensidad y baja temperatura (López Muñoz *et al.*, 1992).

SALINIDAD

La salinidad puede ser importante para la acumulación de ciertos productos de interés, como glicerol y β -caroteno, como ya hemos indicado. Altas salinidades aumentan el contenido en β -caroteno de *D. salina* y de los aminoácidos esenciales metionina y fenilalanina de la cianobacteria *Aphanethece halophytica* (Brown *et al.*, 1989). Por lo demás no tiene mucho efecto sobre la composición bioquímica, a no ser que se relacione con otra variable.

NUTRIENTES

La modificación del medio de cultivo y la elección de diferentes puntos del ciclo de crecimiento para la cosecha es probablemente el modo menos costoso de

Tabla 7.- Velocidad de crecimiento, densidad celular y composición de pigmentos fotosintéticos obtenidos en los cultivos de distintas microalgas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz (Lopez-Muñoz *et al.*, 1992).

	16°C		20°C	
	40μE m ⁻² s ⁻¹	80μE m ⁻² s ⁻¹	40μE m ⁻² s ⁻¹	80μE m ⁻² s ⁻¹
<i>T. suecica</i>				
dens.celular (cel 10 ⁶ ml ⁻¹)	1.28±0.11	2.12±0.38	4.09±0.22	9.24±0.25
clorofila a (pg cel ⁻¹)	1.63±0.09	1.60±0.12	1.99±0.27	1.43±0.24
clorofila b (pg cel ⁻¹)	1.00±0.05	0.85±0.08	0.82±0.13	0.62±0.10
<i>I. galbana</i>				
dens.celular (cel 10 ⁶ ml ⁻¹)	12.48±0.49	28.70±0.84	18.92±0.43	26.59±0.67
clorofila a (pg cel ⁻¹)	1.59±0.04	1.37±0.02	0.96±0.06	0.71±0.03
clorofila c ₁ +c ₂ (pg cel ⁻¹)	0.24±0.03	0.18±0.01	0.13±0.01	0.10±0.01
<i>D. tertiolecta</i>				
dens.celular (cel 10 ⁶ ml ⁻¹)	2.05±0.13	3.79±0.05	5.84±0.17	9.36±0.66
clorofila a (pg cel ⁻¹)	2.36±0.15	2.11±0.09	3.10±0.22	2.17±0.09
clorofila b (pg cel ⁻¹)	0.64±0.04	0.49±0.03	0.94±0.06	0.59±0.05
<i>P. tricornutum</i>				
dens.celular (cel 10 ⁶ ml ⁻¹)	17.05±0.08	39.35±0.40	28.14±0.32	48.32±1.04
clorofila a (pg cel ⁻¹)	0.64±0.05	0.26±0.02	0.58±0.03	0.27±0.03
clorofila c ₁ +c ₂ (pg cel ⁻¹)	0.23±0.01	0.11±0.01	0.09±0.01	0.05±0.005

obtenervariabilidad en la calidad de la biomasa microalgal. En muchas microalgas puede alterarse la proporción de los componentes celulares principales, proteínas, carbohidratos y lípidos, modificando la composición del medio de cultivo (Mykkestad y Haug, 1972; Parsons y Takahashi, 1973; Becker, 1977; Witt *et al.*, 1981). El contenido y composición de las fracciones lipídicas y ácidos grasos (Sriharan *et al.*, 1989) y vitaminas (Becker, 1986) depende asimismo de las condiciones y medio de cultivo.

NITRÓGENO

Entre los distintos componentes del medio de cultivo, la fuente y concentración de nitrógeno son determinantes de importantes cambios en el crecimiento y composición bioquímica de una especie microalgal (Utting, 1985; Goldman, 1976; Kaplan *et al.*, 1986; Vieira y Klaveness, 1986; Vonshak, 1986; Wikfors, 1986).

Tabla 8. - Efecto de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la composición en proteínas y lípidos de distintas microalgas y cianobacterias (modificada de Piorreck *et al.*, 1984).

	Concentración de nitrógeno(%)				
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1
A. Proteína total (% de peso seco)					
<i>Chlorella vulgaris</i>	11.1	19.9	28.9	31.2	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	9.43	22.0	33.2	34.4	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	6.75	14.5	30.7	31.1	32.2
<i>Scenedesmus obliquus</i>	9.00	8.81	34.0	32.1	32.9
<i>Anacystis nidulans</i>	18.3	33.4	33.9	39.7	46.3
<i>Spirulina platensis</i>	25.8	26.6	33.4	52.1	47.4
B. Lípidos totales (% de peso seco)					
<i>Chlorella vulgaris</i>	41.8	20.2	14.1	11.8	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	33.1	21.7	23.0	22.4	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	62.9	42.7	22.0	21.8	22.6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	44.3	50.1	26.9	29.8	21.2
<i>Anacystis nidulans</i>	12.7	13.6	12.0	15.4	14.8
<i>Spirulina platensis</i>	11.2	9.1	12.6	15.5	21.8

Tanto el contenido proteico (Venkataraman y Nigan, 1979; Boussiba y Richmond, 1980; Rajasekaran *et al.*, 1981; Fábregas *et al.*, 1989a,b) como la fracción lipídica (Shifrim y Chisholm, 1980; Cohen, 1986; Fábregas *et al.*, 1989a,b; Sriharan *et al.*, 1989) varían sustancialmente en función del nitrógeno (fuente y/o concentración) del medio.

Por ejemplo, Fábregas *et al.*, (1985) encuentran que el contenido en proteína, clorofila a y RNA de *Tetraselmis suecica* puede variar hasta un 200% en función de la concentración de nitrato en el medio de cultivo. *Chlorella stigmatophora* aumenta su concentración de proteína 10 veces con el incremento de la concentración de nutrientes (Fábregas *et al.*, 1986). Utting (1985) encuentra diferencias significativas en el contenido en proteínas, lípidos y carbohidratos de tres especies de microalgas de interés comercial manipulando el contenido en N del medio de cultivo. Estas diferencias pueden afectar al valor nutricional de una especie microalgal en aplicaciones de acuicultura. Desafortunadamente, las condiciones de cultivo que dan la composición bioquímica celular más deseable no son necesariamente las que producen máximas tasas de producción. Sin embargo,

las diferencias en el valor alimenticio dentro de una especie, debido a variaciones en las condiciones de cultivo, son generalmente menores que las diferencias entre especies de alto y bajo valor nutricional.

En general, las microalgas responden a la escasez de nitrógeno degradando preferencialmente una o más macromoléculas que contengan nitrógeno. Esto da como resultado un descenso significativo del contenido en nitrógeno de las células (proteínas) y una acumulación de compuestos de carbono de reserva, como carbohidratos y/o lípidos (Tabla 8).

En condiciones de deficiencia en nitrógeno se reduce el contenido en pigmentos fotosintéticos y la tasa de fotosíntesis. La capacidad de incorporar y asimilar compuestos de nitrógeno combinado aumenta en estas condiciones. Durante la escasez de nitrógeno también se observan cambios en las actividades enzimáticas, aumentando la actividad de las enzimas que permiten la asimilación del nitrógeno. Los mecanismos de incorporación de los distintos compuestos de nitrógeno también cambian durante la limitación de nitrógeno.

Si bien, el aumento de la concentración de N aumenta la proteína, el efecto sobre los lípidos varía según las especies (tabla 9), sin que haya una tendencia definida ni siquiera dentro de cada grupo taxonómico. Muchas microalgas creciendo bajo limitación de N muestran un incremento en el contenido lipídico. Sin embargo, algunas especies responden decreciendo los contenidos lipídicos y producen carbohidratos mejor que lípidos en tales condiciones. Además del N otras deficiencias de nutrientes pueden producir un incremento en el contenido lipídico. En diatomeas, por ejemplo, la cantidad de lípidos puede aumentar con la deficiencia en silicio. Se ha citado que a bajos niveles de nitrógeno las clorofíceas contienen elevados porcentajes de lípidos totales (45% de la biomasa) y siendo el 70% lípidos neutros, como los triglicéridos (conteniendo fundamentalmente ácidos grasos 16:0 y 18:1). Con altos niveles de N, el porcentaje de lípidos totales es menor (20%); en este caso predominan los lípidos polares que contienen ácidos grasos polinsaturados C16 y C18.

En *Nannochloropsis* sp. desciende el contenido en clorofila a y proteína en respuesta a la reducción del N, mientras aumentan los carbohidratos y lípidos. La composición de ácidos grasos también es afectada por la concentración de N. Con severa deficiencia aumenta el porcentaje de 16:0 a expensas del 20:5 ω 3. Al aumentar el N aumenta el porcentaje de 20:5 ω 3 y la relación de ácidos grasos poliinsaturados de la serie ω 3 a ácidos grasos saturados más monoinsaturados (Sukenik *et al.*, 1993). En *I. galbana*, la limitación de N provocó un aumento tanto de carbohidratos como de lípidos. Las variaciones en el contenido celular de lípidos se vieron asociadas con cambios en la composición de ácidos grasos. Al

Tabla 9.- Efecto de la limitación de nitrógeno sobre el contenido en lípidos de las principales especies de microalgas cultivadas (tomada de Borowitzka, 1988).

Alga	Contenido en lípidos (% en peso seco)	
	No limitada en N	Limitada en N
Cyanophyceae		
<i>Spirulina platensis</i>	21.8	11.2
<i>Anacystis nidulans</i>	14.8	14.3
Chlorophyceae		
<i>Botryococcus braunii</i>	44.5	54.2
<i>Chlamydomonas applanata</i>	18.2	32.8
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	13.4	29.2
<i>Chlorella vulgaris</i>	11.8	52.8
<i>C. vulgaris</i>	21.8	57.9
<i>C. luteoviridis</i>	17.5	28.8
<i>C. capsulata</i>	11.7	11.4
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	16.6
<i>D. salina</i> (UTEX 20C)	25.3	9.2
<i>Nannochloris sp.</i>	20.8	35.5
<i>Scenedesmus obliquus</i>	22.4	34.6
<i>Tetraselmis suecica</i>	23.4	14.6
Bacillariophyceae		
<i>Nitzschia palca</i>	22.2	39.5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20.0	24.0
<i>Skeletonema costatum</i>	23.8	30.3
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	22.2	24.0
Chrysophyceae		
<i>Isochrysis sp.</i> (UTEX 2307)	7.1	26.0
<i>Isochrysis galbana</i>	23.0	23.1
Cryptophyceae		
<i>Cryptomonas rufescens</i>	12.2	16.8
Rhodophyceae		
<i>Porphyridium cruentum</i>	98.0	176.0

descender el N aumentan el C16:0 y el C18:1 y desciende el C18:4 y ligeramente el C22:6. Así la relación de ácidos grasos poliinsaturados a ácidos grasos saturados más monoinsaturados desciende bajo condiciones de limitación de N (Sukenik & Wahnon, 1991).

En *Spirulina platensis* la deficiencia de nitrógeno aumentó el contenido total de lípidos pero disminuyó el contenido en ácidos grasos, mientras que la relación entre ácidos grasos saturados e insaturados no se vió afectada (Tedesco y Duerr, 1989). El contenido de 22:6 ω 3 de *Chaetoceros gracilis* o el de 20:5 ω 3 en *I. galbana* disminuyen bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Brown *et al.*, 1989). El contenido de β -caroteno de *Dunaliella bardawil* o el contenido de hidrocarburos neutros de *Botryococcus braunii* aumentan bajo deficiencia de nitrógeno (Brown *et al.*, 1989).

El efecto de la edad del cultivo (en cultivos con suficiencia de N) es similar al de la deficiencia de nitrógeno, ya que a medida que avanza el cultivo se consume el N del medio. En realidad cuando se estudian los efectos de la fase de cultivo es difícil saber su valor intrínseco o en qué medida se deben al agotamiento de algún nutriente.

FUENTE DE NITRÓGENO

Además de la concentración, la fuente de N tiene efecto sobre la composición bioquímica microalgal.

En cultivos de *D. tertiolecta* con distintas concentraciones de nitrato, nitrito y urea se observó que la fuente y concentración de N afectaba a la composición bioquímica (Fábregas *et al.*, 1989). Se definen dos tipos de cultivos, en función de que las concentraciones de nitrógeno sean bajas o altas (Fig. 30a, b, c); en los primeros el contenido celular de proteínas y carbohidratos permanece constante, mientras que la densidad celular aumenta proporcionalmente a la concentración de nitrógeno; en el segundo grupo aparece mayor variabilidad bioquímica y los contenidos celulares de proteína y carbohidratos aumentan con la concentración de N en las fuentes de N inorgánica (y apenas en la urea) mientras que la densidad celular tiende a descender; el contenido de lípidos no presenta esta variabilidad. Las relaciones entre distintos componentes suelen utilizarse como indicadores del estado fisiológico en cultivos de microalgas. En este caso (Fig. 30d, e, f), las relaciones proteína/lípidos y proteína/carbohidratos aumentan con la concentración de N en los cultivos con nitrato y nitrito, mientras la relación proteína/lípidos permanece constante y la proteína/carbohidratos baja en los cultivos con urea; la relación lípidos/carbohidratos disminuye proporcionalmente a la concentración de N en las tres fuentes de N utilizadas. Por tanto, las razones entre componentes y su relación con la actividad fisiológica dependen de la fuente de N utilizada.

Asimismo, se determinó el efecto de estas fuentes de N sobre los contenidos de β -caroteno, vitamina C y vitamina E en esta misma especie, obteniéndose los mejores resultados de β -caroteno y vitamina C en los cultivos con urea y nitrato;

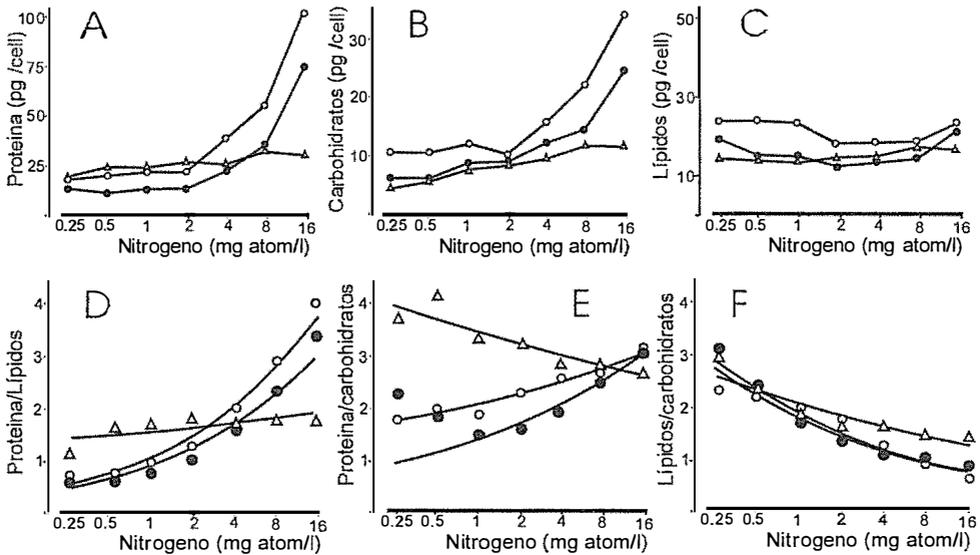


Figura 30.- Contenido celular en proteína (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) y relaciones proteínas/lípidos (D), proteína/carbohidratos (E) y lípidos/carbohidratos (F) en cultivos de *Dunaliella tertiolecta* con distintas fuentes y concentraciones de nitrógeno (Fábregas *et al.*, 1989).

sin embargo, los cultivos con urea presentan los valores menores de vitamina E (Abalde *et al.*, 1992).

En *P. triornutum* se estudió el efecto de la fuente de nitrógeno (nitrato, nitrito, amonio y urea) así como la fase de crecimiento (Fidalgo *et al.*, 1994). Los resultados muestran que el contenido en proteína es mayor durante la fase logarítmica, siendo el principal constituyente, pero desciende al detenerse el crecimiento, mientras que los contenidos celulares de carbohidratos aumentan durante la fase estacionaria (Fig. 31). Los contenidos de lípidos descienden en la fase estacionaria, excepto en los amonios, dónde constituyen la mayor fracción frente a los carbohidratos de los restantes cultivos. En los cultivos con amonio cesa pronto la síntesis de proteínas al no haber crecimiento y el carbono fijado se dirige a la síntesis de lípidos. En *P. triornutum* los carbohidratos son los productos primarios de reserva, pero pueden ser reemplazados por lípidos en tiempos largos de limitación de crecimiento. Esto se ha observado en muchas microalgas, ya que se requiere un tiempo para que se produzcan los enzimas necesarios para la síntesis de lípidos. Los cultivos con amonio llevan más tiempo

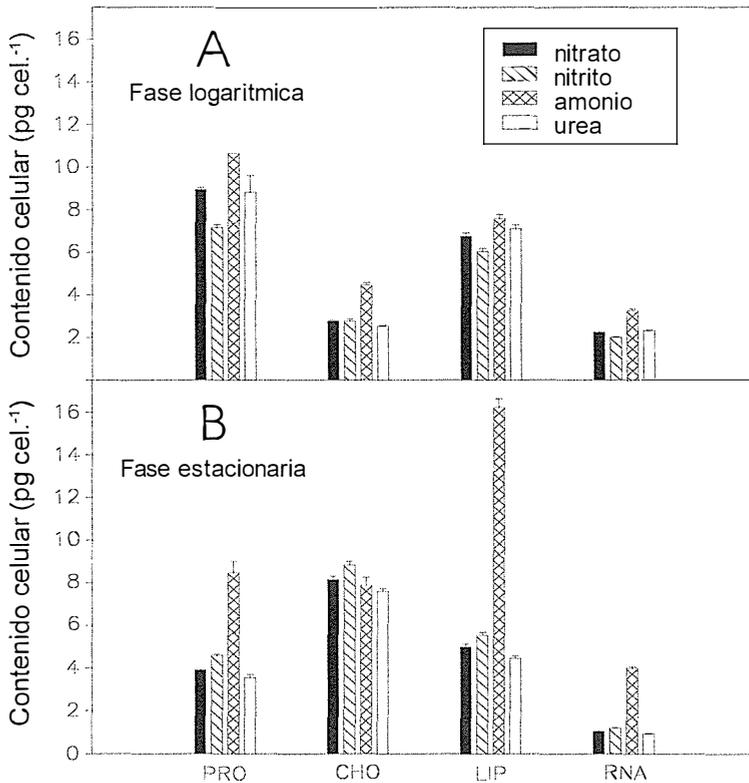


Figura 31.- Contenido celular (pg cel^{-1}) en proteína (PRO), carbohidratos (CHO), lípidos (LIP), y RNA, de cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con distintas concentraciones y fuentes de nitrógeno, en las fases logaritmica (A) y estacionaria (B) de crecimiento (Fidalgo *et al.*, 1994).

en condiciones de crecimiento no idoneas por lo que ya han llegado a esta segunda fase de síntesis de lípidos.

Similares resultados se obtuvieron en otras especies, como *T. suecica* e *I. galbana*. Esta última especie se ha revelado de interés comercial por su contenido en lípidos, especialmente en determinados ácidos grasos. En cultivos de esta microalga con urea y nitrato, las dos fuentes de N con mejores producciones de biomasa, el contenido celular en lípidos aumenta a lo largo del período de crecimiento; en la fase estacionaria el agotamiento de los nutrientes da lugar a una desviación del C fijado hacia las rutas biosintéticas de productos de reserva; a diferencia de *T. suecica* y *P. tricornutum*, *I. galbana* responde rápidamente

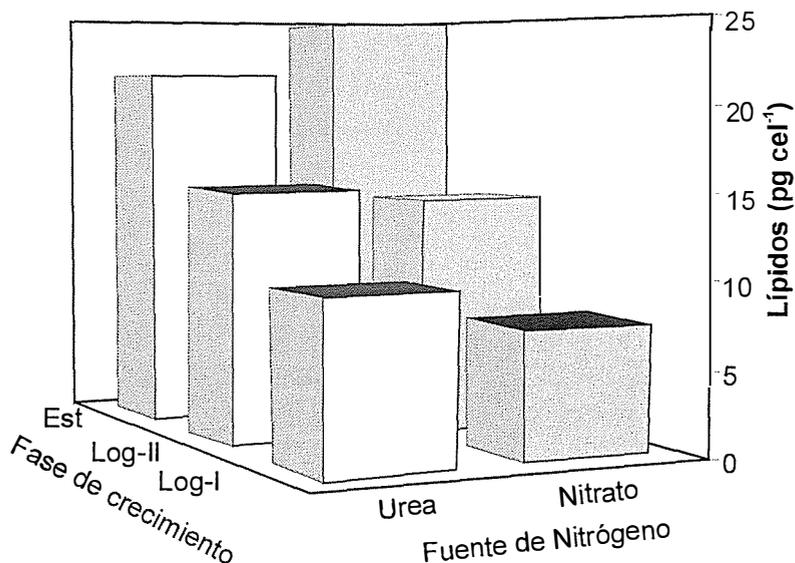


Figura 32.- Contenido celular de lípidos en cultivos de *Isochrysis galbana* con distintas fuentes de nitrógeno y en diferentes fases de crecimiento (Fidalgo *et al.*, 1992)

almacenando una elevada cantidad de lípidos en condiciones no idóneas de crecimiento (Fig. 32). La variación en función de la edad es mayor que en función de la fuente de N. Los contenidos de ácidos grasos varían también en función de la fuente de N y edad del cultivo. En los cultivos con nitrato y nitrito se obtienen los mejores porcentajes de lípidos, sin diferencias significativas. Sin embargo, los mejores porcentajes de ácidos grasos, especialmente de eicosapentaenoico y docosahexaenoico se obtienen en los cultivos con nitrato (Fidalgo *et al.*, 1993).

CARBONO

La composición bioquímica celular varía en función de los compuestos orgánicos adicionados al medio, sobre todo los carbohidratos y las proteínas. El crecimiento fotoheterotrófico aumenta el grado de insaturación de los ácidos grasos de *Scenedesmus* sp. (Brown *et al.*, 1989). En *Scenedesmus* la suplementación con glucosa y/o CO₂ incrementa en todos los casos el contenido total de carbohidratos intracelulares libres y los de los polisacáridos, produciéndose el mayor aumento con la adición de glucosa sola; los cambios a nivel de monosacáridos individuales varían en cada caso (Becker, 1994). También se ha descrito el efecto de diferentes niveles de CO₂ sobre la composición de ácidos grasos de *Chlorella fusca*.

7.- Microalgas en nutrición animal

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. Uno de los aspectos conocidos ya desde la antigüedad es la utilización de microalgas como alimento. Las microalgas representan una fuente de proteína -SCP- con posibles aplicaciones en nutrición humana pero principalmente como complemento de piensos animales. Esto es debido básicamente a sus elevados contenidos proteicos, potenciado por el hecho de poseer un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos comparadas con otras fuentes de SCP.

A diferencia de su utilización en acuicultura, para nutrición animal hay que separar las microalgas de su medio y secar la biomasa, para lo cual existen varios métodos (capítulo 5). La digestibilidad del producto final varía según el proceso de secado, así como la composición y valor nutritivo de la biomasa obtenida. El efecto mayor es sobre el contenido en vitaminas, y puede asimismo afectar a la disponibilidad de algunos aminoácidos como la lisina, aspectos que se desarrollarán más adelante.

ESTUDIOS NUTRICIONALES

La utilización de diferentes tipos de SCP, incluidas las microalgas, tiene cierta tradición en algunos lugares (capítulo 2); durante las últimas cuatro décadas el mercado se ha ampliado para este tipo de productos, lo que ha llevado a organizaciones internacionales como el PAG (Protein-Calorie Advisory Group) de Naciones Unidas (1972) o la IUPAC (International Union of Pure and Applied

Chemistry) (1974) a publicar recomendaciones y líneas generales para la utilización de estas fuentes no convencionales de proteínas.

Las evaluaciones o tests recomendados para la utilización de nuevas fuentes de SCP son esquemáticamente las siguientes (Becker, 1994):

- Características generales.
 - Descripción de la cepa de microorganismo y sus propiedades biológicas, asegurando su inocuidad y la pureza de la cepa cultivada.
 - Características del sustrato y fuente de suministro de nutrientes y de otros agentes utilizados durante el proceso de producción.
 - Condiciones de recogida y procesado de la biomasa.
 - Constancia y calidad sanitaria del producto.
- Características del producto.
 - Morfología microscópica.
 - Propiedades físicas.
 - Composición química detallada.
- Estudios nutricionales en animales test (roedores).
 - Valor biológico (BV), utilización neta de la proteína (NPU).
 - Grado de eficiencia proteica (PER), coeficiente de digestibilidad (DC).
 - Energía digerible y metabolizable.
 - Propiedades de la suplementación.
- Tests de alimentación de especies animales de referencia.
 - Aceptabilidad.
 - Evaluación del máximo nivel de suplementación en dietas normales.
 - Tests de posibles efectos secundarios.
- Análisis toxicológicos.
 - Análisis de contaminación con diferentes compuestos.
 - Estudios de pureza bacteriológica y micológica.
 - Estudios a corto plazo de alimentación de roedores, cerdos, pájaros, etc.
 - Estudios a largo plazo incluyendo tests de teratogenicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad con dos especies animales diferentes.
 - Estudios de reproducción.
 - Estudios de multigeneración.
- Estudios clínicos con humanos.

Los primeros experimentos sistemáticos para la evaluación nutricional de la proteína microalgal se realizaron con ratas y pollos en los años 50 y 60, pero proporcionaron resultados contradictorios. La razón obvia de estas observaciones divergentes fueron los diferentes métodos utilizados por los investigadores para procesar las microalgas después de la recogida. El valor nutritivo de las algas, además de su composición química básica, depende del tipo del método de secado después de la recogida. Con la excepción de la cianobacteria *Spirulina*, la mayoría de las microalgas tiene una pared celular celulósica relativamente gruesa, que hace que las microalgas no tratadas no sean digeribles por los no rumiantes.

Las evaluaciones nutricionales que se consideran normalmente son:

Grado de eficiencia proteica (PER)

El método más simple y el más comúnmente utilizado para evaluar proteínas mediante tests de alimentación animal, es la determinación del grado de eficiencia proteica (PER). Está basado en experimentos de alimentación a corto plazo (de 3 a 4 semanas) de ratas recién destetadas. La respuesta a las dietas se expresa en términos de peso ganado por unidad de proteína consumida por el animal:

$$\text{PER} = \text{peso ganado (g)} / \text{proteína asimilada (g)}$$

Este método sólo necesita de una medida segura de la proteína ingerida en la dieta y el peso ganado, pero necesita que se ajuste estrictamente a determinadas condiciones: la ingesta de calorías debe ser la adecuada, y la proteína deber ser suministrada de forma adecuada también, pero no de modo excesivo porque con elevados niveles de proteína en la dieta, el peso ganado puede no incrementarse proporcionalmente a la ingesta proteica. Para obtener datos reales es absolutamente necesario que el material testado sea completamente digestible. La principal fuente de error en este método está en utilizar la ganancia de peso *per se* como el único criterio de valor proteico. La ganancia en peso no puede asumirse que represente la ganancia proporcional de proteína corporal bajo todas las condiciones.

El valor del PER obtenido se compara normalmente con una referencia proteica como es la caseína. Dada la diferente respuesta a la misma proteína estándar, los valores asumidos generalmente deben ser corregidos con valores experimentales.

FER (Índice de transformación)

$$\text{alimento consumido (g)} / \text{peso ganado (g)}$$

Valor biológico (BV)

Es la medida del nitrógeno retenido para el crecimiento y mantenimiento, y se expresa como el nitrógeno retenido dividido por el nitrógeno absorbido. El nitrógeno absorbido se define como la diferencia entre el N ingerido y el excretado por el intestino y puede ser utilizado siguiendo la siguiente ecuación:

$$BV = [I - (F - F_0) - (U - U_0)] / I - (F - F_0)$$

dónde I es el nitrógeno ingerido, U el nitrógeno urinario, F el nitrógeno fecal, y F_0 y U_0 son el N fecal y urinario excretado cuando los animales se mantienen con una dieta "libre" de nitrógeno. El BV calculado a partir de esta ecuación tiene en cuenta las pérdidas de nitrógeno metabólico (o endógeno). Si no se hace esta corrección, es decir, si F_0 y U_0 no son considerados, el BV obtenido se denomina "valor biológico aparente". Este método no es muy común y la mayoría de los valores para el BV representan el valor biológico aparente de proteína.

Coefficiente de digestibilidad (DC)

A veces también se denomina "digestibilidad verdadera", expresa la digestibilidad de la proteína testada, es decir, la proporción de nitrógeno del alimento que es absorbido por el animal y puede ser calculado por la siguiente ecuación, usando los datos experimentales obtenidos para la estimación del BV:

$$DC = [I - (F - F_0)] / I$$

Utilización neta de proteína (NPU)

Este parámetro puede representarse por una expresión muy simple:

$$NPU = N \text{ retenido} / N \text{ ingerido.}$$

Es el equivalente al producto del valor biológico por el coeficiente de digestibilidad ($BV \times DC$) y es una medida tanto de la digestibilidad de la proteína de la dieta como del valor biológico de los aminoácidos absorbidos a partir del alimento. NPU representa la proporción de N retenido del alimento, mientras que BV representa la proporción del nitrógeno absorbido del requerido. NPU puede estimarse utilizando la siguiente ecuación:

$$NPU = BV \times DC = (B - B_k) / I$$

dónde B es el nitrógeno corporal, medido al final del periodo de estudio en animales alimentados con la dieta testada, y B_k es el nitrógeno corporal medido al final del periodo de estudio en otro grupo de animales alimentados con una dieta libre de proteína o con un bajo contenido en proteína.

Nutrición en aminoácidos

Las diferentes especies animales difieren cuantitativamente y, en parte, también cualitativamente en sus requerimientos de aminoácidos. Se ha encontrado que si se almacena la biomasa microalgal durante prolongados periodos de tiempo o se trata con calor, los grupos amino libres de la lisina tienden a formar compuestos con carbohidratos reductores (reacción de Maillard), haciendo que este aminoácido no esté disponible para la digestión. Este efecto ha de ser considerado especialmente con respecto a varios pasos de secado utilizados en el procesado del material microalgal.

Los datos analíticos sobre la composición en aminoácidos de la proteína permite ciertas conclusiones para determinar su valor nutricional. Sin embargo estas consideraciones presuponen información detallada sobre la cantidad de aminoácidos esenciales requeridos por el consumidor, que son diferentes según las especies, la edad, el sexo, etc.

Dos son los métodos más comúnmente utilizados para estimar la calidad de una proteína dada en función de su composición en aminoácidos: la calidad química y el índice de aminoácidos esenciales (EAA).

Calidad proteínica (CS)

Es un mecanismo simple, no biológico, que implica la comparación de la composición de aminoácidos de la proteína que se va a analizar con otra de alta calidad como es el huevo, la leche o un patrón de referencia. La posición se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$CS = \frac{\text{mg de aminoácidos en 1 g de proteína test}}{\text{mg de aminoácidos en 1 g de la referencia}} \times 100$$

El valor menor para cualquiera de los aminoácidos esenciales se designa como el “aminoácido limitante” y proporciona una estimación aproximada de la calidad de la proteína estudiada. En la práctica, es preferible que se calcule la posición para la lisina, metionina+cisteína y triptófano, dado que uno de estos aminoácidos es generalmente el limitante de la mayoría de las proteínas de cualquier origen.

Índice de aminoácidos esenciales (EAA)

Este método está basado en la asunción de que el valor biológico de una proteína es función de los niveles de todos los aminoácidos esenciales en relación con su contenido en una proteína de referencia; en otras palabras, el EAA se define como la media de los aminoácidos esenciales en la proteína test en relación con la proteína de referencia (huevo).

El test considera los siguientes 10 aminoácidos esenciales: lisina, triptófano, valina, isoleucina, leucina, treonina, fenilalanina, metionina y cistina (como uno), arginina e histidina.

$$\text{EAA} = \left[\left(\frac{\text{lys}_{\text{test}}}{\text{lys}_{\text{ref}}} \right) \times \left(\frac{\text{try}_{\text{test}}}{\text{try}_{\text{ref}}} \right) \times \left(\frac{\text{val}_{\text{test}}}{\text{val}_{\text{ref}}} \right) \times \dots \times \left(\frac{\text{his}_{\text{test}}}{\text{his}_{\text{ref}}} \right) \right]^{1/10}$$

En general, la calidad proteínica (CS) tiende a infraestimar la calidad de la proteína porque este método está basado en un solo aminoácido limitante, mientras que el EAA proporciona resultados muy próximos a los valores determinados en los tests biológicos de alimentación. La proteína algal es a menudo deficiente en metionina y cisteína; estas deficiencias pueden compensarse con una suplementación de esta proteína tanto directamente con el aminoácido limitante como con proteínas de otra naturaleza rica en estos aminoácidos.

EVALUACIONES NUTRICIONALES

Para una evaluación de las microalgas como una posible fuente alimenticia es fundamental el análisis de su composición química, especialmente la calidad de su proteína (posición química e índice de aminoácidos). Sin embargo, aunque estos datos proporcionan importante información sobre su valor nutritivo, no pueden considerarse como sustitutos de las apreciaciones biológicas de la calidad proteica en animales, generalmente ratas o ratones.

ESTUDIOS METABÓLICOS

Uno de los ensayos biológicos más utilizados para estimar la calidad nutritiva de una proteína es el PER. Además de una evaluación general de la calidad nutritiva de las microalgas, este método se ha utilizado para demostrar la influencia de los tratamientos post-recogida sobre la digestibilidad de varias especies microalgales, así como para determinar los efectos de la suplementación de la biomasa microalgal con distintos aminoácidos en los que puedan ser deficientes.

En la tabla 10 se muestran algunos datos de PER de diferentes especies microalgales, observándose variaciones en función del nivel de proteína de la dieta y del método de secado utilizado. Se puede observar que *Scenedesmus* secada en tambor caliente tiene un PER significativamente mayor que los obtenidos con otros métodos de secado; este PER es menor cuando la microalga se incorpora en la dieta a un nivel de proteína del 20% que al 10%. Por el contrario el secado al sol da pobres resultados tanto en *Scenedesmus* como en *Chlorella*.

En función de lo observado en la tabla se puede concluir que aquellas algas consideradas de mayor valor como fuente de proteína (*Scenedesmus*, *Chlorella*,

Tabla 10.- Valores comparativos del coeficiente de eficiencia proteica (PER) de dietas realizadas con microalgas sometidas a distintos procesos de secado (parcialmente tomados de Becker, 1994).

Alga	Proteína (%)	Procesado	PER
Caseína	10		2.50
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10	DD	1.99
<i>S. obliquus</i>	10	SD	1.14
<i>S. obliquus</i>	10	Cocida-SD	1.20
<i>S. obliquus</i>	10	FD	1.12
<i>S. obliquus</i>	20	DD	1.68
<i>S. obliquus</i>	20	SD	1.41
<i>S. obliquus</i>	20	Cocida-SD	1.52
<i>S. obliquus</i>	15	SD	0.87
<i>S. obliquus</i>	10	Cocida 8 min	1.78
<i>Chlorella sp.</i>	10	Cruda	0.84
<i>Chlorella sp.</i>	10	Autoclavada	1.31
<i>Chlorella sp.</i>	10	DD	1.89
<i>Chlorella sp.</i>	10	FD	1.66
<i>Chlorella sp.</i> +0.2% met	10	FD	2.20
<i>Chlorella sp.</i>	15	SD	0.68
<i>Chlorella sp.</i>	20	Secada al aire	1.52
<i>Spirulina sp.</i>	10	SD	1.78
<i>Spirulina sp.</i>	20.5	SD	2.10
<i>Dunaliella bardawil</i>	10	DD	0.77

Nota: DD, secado en tambor; SD, secado al sol; FD, liofilizado.

Spirulina) tienen una alta calidad nutricional, proporcionada por un procesamiento adecuado del material. La calidad de esta proteína es elevada si se compara con otras proteínas vegetales y es aproximadamente el 80% respecto a la caseína.

Aunque la estimación del PER es el método más utilizado para evaluar la calidad de las proteínas tiene ciertas limitaciones. Por tanto, deben utilizarse otros métodos más específicos para evaluar el valor nutritivo de la proteína microalgal. Aplicando estudios del balance nitrogenado es posible distinguir entre la digestibilidad del material proteico y la cantidad de nitrógeno retenida

Tabla 11.- Valores comparativos del valor biológico (BV), coeficiente de digestibilidad (DC) y utilización neta de proteína (NPU) de diferentes dietas realizadas con biomasa microalgal sometida a distintos procesos de secado (parcialmente tomados de Becker, 1994).

Alga	Procesado	BV	DC	NPU
Caseína		87.8	95.1	83.4
Huevo		94.7	94.2	89.1
<i>Scenedesmus sp.</i>	AD	60.6	51.0	31.0
<i>Scenedesmus obliquus</i>	DD	81.3	82.8	67.3
<i>S. obliquus</i>	SD	72.1	72.5	52.0
<i>S. obliquus</i>	Cocida-SD	71.9	77.1	55.5
<i>Chlorella sp.</i>	AD	52.9	—	31.3
<i>Chlorella sp.</i>	DD	71.6	79.9	57.1
<i>Chlorella sp.</i>	Extrato de proteína	79.9	83.4	66.2
<i>Spirulina sp.</i>	Cruda	63.0	76.0	48.0
<i>Spirulina sp.</i>	Stewed	51.0	74.0	38.0
<i>Spirulina sp.</i>	SD	77.6	83.9	65.0
<i>Spirulina sp.</i>	DD	68.0	75.5	52.7

Nota: DD, secado en tambor; SD, secado al sol; FD, liofilizado.

para almacenamiento y/o anabolismo. Por ello, deben realizarse determinaciones del valor biológico, coeficiente de digestibilidad, utilización neta de la proteína, etc.

Los resultados del valor biológico, coeficiente de digestibilidad y utilización neta de la proteína de distintas microalgas confirman la importancia del proceso de secado sobre el valor nutritivo (Tabla 11). En este caso *Scenedesmus* secada en tambor caliente también presentó mejor calidad nutricional que la secada por otros métodos, con un valor próximo a la caseína; sin embargo, el valor de la utilización neta de la proteína (NPU) es menor en este alga que en la proteína de referencia, lo que indica que al menos un aminoácido es limitante. Los mismos resultados se obtienen con *Chlorella*, si bien la extracción y utilización de la proteína pura de *Chlorella* da mejores resultados que la utilización de la biomasa microalgal completa. Los datos de los balances de N para *Spirulina* confirman que esta microalga, con su pared celular delgada y frágil, no presenta serios problemas a la hora de ser utilizada su proteína, e incluso el simple secado al sol es

suficiente para obtener valores aceptables.

Aunque existen diferencias entre las cepas y especies analizadas, es evidente que la biomasa microalgal presenta buenas cualidades como nueva fuente de proteína. Desechando los valores extremos, después de un adecuado procesado de la biomasa la calidad media de la mayoría de las microalgas analizadas fue igual o incluso superior a la de otras proteínas vegetales convencionales de alta calidad. Este hecho ha sido repetida e inequívocamente confirmado por una larga serie de investigaciones diferentes e independientes, que analizan varios parámetros metabólicos en diferentes especies animales.

Los análisis de aminoácidos esenciales de muchas proteínas microalgales muestran deficiencia en algunos de ellos, especialmente en aminoácidos azufrados, cistina y metionina. Debido a ello, se han realizado distintas experiencias suplementando las dietas microalgales con diferentes aminoácidos esenciales, con lo que se obtienen valores del PER más próximos a los de la caseína. El efecto de la suplementación con metionina parece que varía dependiendo de las diferentes especies (Tabla 12). Cuando las deficiencias de aminoácidos azufrados se solventan mediante la suplementación con metionina, la biomasa seca de *Scenedesmus* proporciona valores de PER próximos a los de la caseína (Becker y Venkataraman, 1982), aunque otros autores encuentran resultados diferentes (Gross *et al.*, 1982). Sin embargo, la suplementación con metionina, lisina o histidina, por separado o en combinaciones de los tres, no aumenta el PER de *Spirulina*, lo que parece indicar que en esta microalga estos aminoácidos no son limitantes (Hernández y Shimada, 1978). Otra especie de importancia en los últimos años ha sido *Dunaliella*, debido a su capacidad de producir y acumular grandes cantidades de β -caroteno y glicerol. Tras la extracción de estos productos queda un residuo con un 65% de proteína, cuya calidad, en función del valor del PER (0.77), es muy baja. Esto indica que varios aminoácidos están en concentraciones limitantes; los análisis de aminoácidos mostraron concentraciones limitantes de isoleucina, triptófano y lisina, y las determinaciones del PER suplementando la proteína de *Dunaliella* con estos aminoácidos deficientes mejoran significativamente (Tabla 12) (Mokady y Cogan, 1988).

ESTUDIOS DE REGENERACIÓN DE PROTEÍNAS

Otro tipo de evaluaciones nutricionales son los estudios de regeneración de la proteína. Este proceso determina el valor nutritivo de las proteínas mediante una depleción seguida de una repleción de las reservas proteicas de animales adultos. Existen correlaciones significativas entre la ganancia en peso durante la repleción y la regeneración de la proteína de la sangre, hígado o cadáver, haciendo que la recuperación de peso sea por sí sola una buena medida del valor nutritivo

Tabla 12.- Efecto de la suplementación de aminoácidos sobre el PER obtenido en dietas realizadas con distintas microalgas (A: Gross *et al.*, 1982; B: Hernández y Shimada, 1978; C: Mokady y Cogan, 1988).

Dieta	Proteína (%)	PER	Ref.
Caseína	10.0	2.50	A
<i>Scenedesmus</i>	10.0	1.90	A
<i>Scenedesmus</i> + met (0.05%)	10.0	2.20	A
<i>Scenedesmus</i> + ile (0.05%) + met (0.05%)	10.0	2.20	A
<i>Spirulina</i>	19.6	1.78	B
<i>Spirulina</i> + met (0.29 %)	19.6	1.35	B
<i>Spirulina</i> + met (0.29 %) + lis (0.27%)	19.6	1.21	B
<i>Spirulina</i> + met (0.13 %) + his (0.13 %)	22.0	1.65	B
<i>Spirulina</i> + met (0.13%) + his (0.13 %)	22.0	1.40	B
<i>Dunaliella</i>	10.0	0.77	C
<i>Dunaliella</i> + lis (0.5%) + met (0.25%)	10.0	2.20	C
<i>Dunaliella</i> + met (0.25%) + ile (0.07%) + try (0.05%)	10.0	1.33	C
<i>Dunaliella</i> + lis (0.5%) + ile (0.07%) + try (0.05%)	10.0	1.55	C
<i>Dunaliella</i> + lis (0.5%) + met (0.25%) + ile (0.07%)	10.0	2.15	C
<i>Dunaliella</i> + lis (0.5%) + met (0.25%) + try (0.05%)	10.0	2.00	C

his: histidina; ile: isoleucina; lis: lisina; met: metionina; thr: treonina; try: tirosina.

(Becker, 1994). La depleción puede realizarse mediante la alimentación de los animales de experimentación (generalmente ratas) con dietas libres de proteína, hasta que han perdido un 25% de su peso corporal inicial. Para las estimaciones del valor nutritivo generalmente son suficientes 7 días de repleción, es decir, de alimentación con la proteína test. Este principio de depleción/repleción ha sido utilizado como índice para evaluar la calidad de proteínas convencionales, pero hay pocos trabajos acerca de la evaluación de las proteínas algales basadas en el mismo.

Datos sobre regeneración de proteínas en ratas alimentadas con *Spirulina* y *Scenedesmus*, comparados con la caseína, mostraron que la magnitud de la regeneración de los enzimas hepáticos y proteínas séricas después de la depleción puede atribuirse a la calidad y nivel de las proteínas de la dieta. En los diferentes grupos animales ensayados, la regeneración de la actividad enzimática fue más pronunciada con una dieta de caseína que con las dietas microalgales, aunque los animales alimentados con *Spirulina*+Metionina alcanzaron valores próximos a los del grupo alimentado con caseína (Anusuya-Devi *et al.*, 1979; 1983b).

Estudios de digestibilidad

Las proteínas microalgales (a excepción de las de cianobacterias) dan pobres resultados si se utilizan como células intactas en la alimentación de animales monogástricos y en humanos. Para aumentar la disponibilidad nutritiva de estas proteínas se han investigado métodos mecánicos, enzimáticos y químicos para degradar las células. En estos estudios se examina la digestibilidad de la proteína mediante la simulación del sistema enzimático pepsina/pancreatina/tripsina en experimentos *in vitro*. La digestibilidad varía en función de la especie y dentro de esta dependiendo del proceso de secado. En *Scenedesmus obliquus* la mejor digestibilidad se obtiene cuando el proceso de secado es por tambor caliente, siendo el secado al sol el que proporciona menor digestibilidad (Becker y Venkataraman, 1982). La influencia del proceso de secado en la digestibilidad de la proteína es mucho menor en *Spirulina*, con valores muy próximos entre el alga secada al sol y liofilizada (Becker y Venkataraman, 1984), lo que se relaciona con el hecho de que su pared celular no es de celulosa, sino de mucopéptido. En los estudios de digestibilidad deben considerarse asimismo los carbohidratos. Dado que es muy costoso extraer y aislar proteínas algales para su utilización, normalmente se incorporan las células completas como alimento o en los piensos. Esto significa que además de la proteína otros compuestos, como los carbohidratos, fibra, etc. pueden afectar a la digestibilidad total. En las microalgas, los carbohidratos están en forma de almidón, celulosa, azúcares y otros polisacáridos. Además de los estudios sobre la digestibilidad de proteínas, Becker y Venkataraman (1982) estudiaron la digestibilidad de carbohidratos en *S. obliquus* y *Spirulina* sp. Los estudios de digestibilidad *in vitro* se basaron en la amilolisis enzimática con α -amilasa y la subsecuente estimación colorimétrica de la cantidad de maltosa liberada durante el proceso; para la simulación gástrica, antes de la amilolisis se llevan a cabo preincubaciones con HCl y pepsina-HCl. Estos tratamientos liberan el almidón que pudiese estar ligado y que no podría ser atacado por la α -amilasa. En *Scenedesmus obliquus* la digestibilidad de los carbohidratos varió en función del método de secado, siendo más baja en la biomasa sin tratar y máxima en las muestras secadas en tambor caliente. Por el contrario, en *Spirulina* no se detectó la liberación de maltosa en los ensayos de α -amilolisis, incluso tras largos periodos de incubación, lo que se ha atribuido a su bajo contenido en almidón y a que la α -amilasa no sea efectiva frente al tipo de carbohidratos que presenta esta especie.

A pesar de que parece que no existen problemas de digestibilidad utilizando las células microalgales secas enteras, debe tenerse en cuenta que los carbohidratos pueden causar otros problemas gastrointestinales como la flatulencia o estreñimiento, que sólo pueden establecerse mediante experimentos *in vivo*.

ESTUDIOS DE SUPLEMENTACIÓN

Uno de los principales objetivos de la producción de la biomasa microalgal es la obtención de una fuente alternativa de proteínas en preparación de piensos para la alimentación de varias especies animales y como posible fuente de proteína para el hombre. Por ello tras los estudios nutricionales en animales de ensayo, hay que evaluar la calidad nutritiva de las microalgas en otras especies animales y/o el hombre. Uno de estos aspectos se refiere a la utilización de la microalgas como complemento nutricional, más que como única fuente de proteínas.

Los cereales constituyen el mayor aporte de proteínas en la dieta de gran parte de la población mundial, y son generalmente deficientes en varios aminoácidos. Distintos estudios demuestran que puede mejorarse su calidad nutritiva suplementándose directamente con los aminoácidos deficientes, con proteínas convencionales o con fuentes no convencionales de proteínas. En este sentido, las microalgas constituyen fuentes apropiadas para mejorar la calidad de estos alimentos, en función de su composición de aminoácidos.

Hundley e Ing (1956) fueron probablemente los primeros en ensayar la posibilidad de suplementar alimentos convencionales con preparaciones microalgales y aminoácidos. Encontraron que la adición de *Scenedesmus* sp. mejoraba significativamente el valor nutricional de la harina y el pan, y este efecto se podía atribuir al suplemento de lisina que supone. Más recientemente, varios autores han estudiado las propiedades de la suplementación de diferentes cereales con *Scenedesmus* sp. y *Spirulina* sp., alimentando con estas mezclas a ratas y estimando los valores de PER y NPU (Bourges *et al.*, 1971; Anusuya Devi y Venkataraman, 1983a; Narasimha *et al.*, 1982; Venkataraman *et al.*, 1977b). Parte de estos resultados se recogen en la tabla 13, donde se observa como mejora la calidad nutritiva de distintos cereales suplementándolos con microalgas. Similares se obtuvieron al suplementar maiz con *Spirulina* (Bourges *et al.*, 1971).

No hay duda de que la adición de microalgas tiene un efecto positivo sobre la calidad nutricional de muchas proteínas convencionales. Sin embargo, la cuestión está en la forma en la que el consumidor puede hacer uso de estas cualidades de las algas, ya que pueden presentarse problemas de aceptabilidad. Para superar estos obstáculos y popularizar la utilización de las algas como complemento de la dieta, se ha recomendado que el material debe ser incorporado en recetas comunes y preparaciones de alimentos típicas de cada región en particular (Becker, 1994).

Una de las numerosas posibilidades de esta conexión es la incorporación de las algas al pan y otros productos de panadería, si bien los productos pueden

Tabla 13.- Datos de valores nutritivos de distintas dietas de cereales suplementadas con microalgas (parcialmente recogida de Becker, 1994).

Dieta	Proteína	PER (%)	NPU
Caseína	10.0	2.50	54.4
Maíz	7.0	1.23	30.5
Arroz	5.8	2.05	—
Trigo	10.0	1.13	—
Cebada	10.0	—	58.0
<i>Spirulina</i>	10.0	—	52.7
<i>Spirulina</i> + maíz (1:1)	10.0	1.72	34.7
<i>Spirulina</i> + maíz (3:1)	10.1	1.80	37.2
<i>Spirulina</i> + trigo (1:1)	14.5	1.96	48.4
<i>Spirulina</i> + trigo (1:3)	10.8	1.74	41.1
<i>Spirulina</i> + maíz + arroz (2:2:1)	10.0	1.95	45.1
<i>Spirulina</i> + arroz (1:1)	9.0	2.27	—
<i>Spirulina</i> + arroz (1:3)	8.0	2.21	—
<i>Spirulina</i> + trigo (1:1)	10.0	1.74	—
<i>Spirulina</i> + trigo (1:3)	10.0	1.34	—
<i>Spirulina</i> + cebada	10.0	—	61.2
<i>Scenedesmus</i>	10.0	1.99	—
<i>Scenedesmus</i> + arroz (1:1)	9.3	2.44	—
<i>Scenedesmus</i> + arroz (1:3)	8.5	2.21	—
<i>Scenedesmus</i> + trigo (1:1)	10.0	1.90	—
<i>Scenedesmus</i> + maíz (1:3)	10.3	1.52	—
<i>Scenedesmus</i> + trigo + arroz (1:1:1)	9.5	2.20	—

adquirir un color marrón-verdoso que los hace poco apetecibles (Nigam *et al.*, 1985).

Se ha observado que la utilización de algas en polvo seco a niveles del 5-15% en alimentos tradicionales no presenta problemas y se han incorporado en diferentes preparados y comidas dietéticas. El color oscuro que producen estas microalgas puede ser reducido (Nigam *et al.*, 1990).

En conclusión, las proteínas microalgales tienen un patrón de aminoácidos con deficiencias marginales en aminoácidos que contienen azufre y generalmente concentraciones supraóptimas de lisina. Las combinaciones de microalgas con cereales y otros ingredientes alimenticios básicos servirían para mejorar la calidad nutricional de varios alimentos comunes.

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

Los ensayos nutricionales no son suficientes para la evaluación de una nueva fuente de proteína, y deben completarse con análisis toxicológicos que garanticen su seguridad. Antes de que un nuevo producto se declare apto para el consumo, debe pasar una serie de tests toxicológicos detallados que prueben su inocuidad. Esto se aplica especialmente a las fuentes no convencionales de proteína, en cuyo grupo están las microalgas. Además de los análisis químicos y sanitarios, estas evaluaciones toxicológicas incluyen estudios de alimentación a corto y largo plazo con ratas y otras especies animales, estudios multi-generacionales, estudios teratogénicos y mutagénicos así como estudios preclínicos y clínicos con humanos PAG, 1972; IUPAC, 1974).

El que una biomasa algal sea utilizable como alimento o pienso está determinado por diversos factores relacionados con la calidad nutritiva y la seguridad toxicológica. La seguridad de todas las clases de proteínas no convencionales dependerán de los organismos seleccionados, la calidad de los sustratos utilizados y las condiciones de crecimiento.

Como parte de la caracterización toxicológica de la biomasa microalgal, el material tiene que ser analizado para determinar la presencia de compuestos tóxicos tanto sintetizados por las propias células microalgales como acumulados a partir del ambiente. Estas toxinas pueden dividirse en dos categorías: biogénicas y no biogénicas.

De acuerdo con esta clasificación, las toxinas biogénicas son aquellas sintetizadas por las células o formadas a través de la descomposición de productos metabólicos. El segundo grupo reúne a los contaminantes ambientales y otras sustancias, la mayoría de ellas de origen antropogénico, que pueden entrar en los cultivos de microalgas procedentes del exterior y que son absorbidos y acumulados por las células algales. Mientras que la aparición de toxinas biogénicas es una característica intrínseca del propio organismo, las contaminaciones con toxinas no biogénicas pueden evitarse en la mayoría de los casos utilizando técnicas de cultivo apropiadas, así como una manipulación correcta de la biomasa y la elección de las zonas de cultivo en áreas no contaminadas.

TOXINAS BIOGÉNICAS:

Ácidos nucleicos: el contenido en ácidos nucleicos es una de las mayores limitaciones para el uso de este tipo de biomasa, porque son una fuente importante de purinas, que al metabolizarse producen principalmente ácido úrico, con lo que elevadas cantidades de ácidos nucleicos pueden llevar a un aumento de los niveles de ácido úrico; esto puede provocar piedras en el riñón u otro tipo de

nefropatía. Debido a este posible problema, el PAG (1975) recomienda que la ingestión de ácidos nucleicos procedentes de fuentes no convencionales no supere los 2 g/persona/día, con una cantidad total de ácidos nucleicos, procedentes de todas las fuentes, que no exceda los 4 g/persona/día.

Feldheim (1972) realizó una serie de estudios en Tailandia sobre la incidencia del consumo de *Scenedesmus* en los niveles de ácido úrico de voluntarios humanos, encontrándose que el consumo de microalgas no alteraba la concentración normal de ácido úrico en plasma. Resultados similares fueron obtenidos por Kofranyi (1978), que estableció que la cantidad de ácidos nucleicos en las microalgas no representa riesgos para la salud siempre que estas se consuman en cantidades razonables.

Feofórbidos: En 1977 se observó en Japón que personas que consumían *Chlorella* desarrollaban una inflamación fotosensible de la piel. Estas irritaciones fueron provocadas por la degradación de la clorofila en productos feofórbidos y sus ésteres, a causa de la formación de peróxidos de los ácidos grasos (araquidónico) en las membranas celulares. El primer paso para la formación de los feofórbidos es la pérdida del Mg^{++} de la molécula de clorofila que lleva a la formación de la feofitina. Los feofórbidos se forman por acción de la clorofilasa, después de que se retire la cadena de fitol. La clorofila resiste en cierta medida el tratamiento térmico y puede seguir activa en células algales secadas a temperaturas moderadas. Además, la actividad de este enzima se ve incrementada con la humedad, que puede producirse a causa de un insuficiente proceso de secado o un almacenamiento inadecuado. También se ha establecido que el etanol utilizado durante el procesado de *Chlorella* estimula la actividad clorofilasa. Para inactivar este enzima se recomienda el calentamiento intensivo a 100°C durante al menos 3 minutos.

Ficotoxinas: Algunas especies de microalgas producen diferentes tipos de ficotoxinas. Estas especies no pueden utilizarse en alimentación. Para determinar la presencia de estas toxinas se realizan ensayos en laboratorio que incluyen inyecciones intravenosas e intraperitoneales y administración oral de extractos microalgales a animales de experimentación. En algunos casos se produce la muerte del animal en unos minutos y en otros al cabo de 48 horas. En función de esto, las toxinas se pueden clasificar en tres grupos: VFD ("Very Fast Death Factor"), que actúa en 3 minutos; FDF ("Fast Death Factor"), que mata en unas 2 horas, y SDF ("Slow Death Factor"), que causa la muerte en un intervalo de 4 a 48 horas. Se ha descrito numerosas veces que en los lagos, los "blooms" de microalgas pueden conducir a la muerte de peces por las toxinas liberadas al medio por las algas, o bien indirectamente por productos de degradación de las algas, como por ejemplo la hidroxilamina. Son, asimismo, bien conocidas las

toxinas producidas por los dinoflagelados marinos (toxina diarreica y toxina paralítica), que no causan daño a los peces ni a los moluscos pero se acumulan en ellos y si llegan al hombre le pueden producir graves daños e incluso la muerte. Las cianobacterias *Microcystis*, *Anabaena* y *Aphanizomenos* también producen exotoxinas.

Debido a la existencia de estas microalgas tóxicas, debe siempre determinarse en los cultivos microalgales a gran escala la presencia de ciertas toxinas, ya sean producidas por las algas en cultivo o por otros microorganismos que hayan podido contaminar el cultivo; a este respecto debe tenerse en cuenta que existen cepas tóxicas de determinadas especies de cianobacterias que morfológicamente son iguales a las no tóxicas, y pueden contaminar los cultivos. Sin embargo, en ningún caso se ha detectado presencia de toxinas en los cultivos masivos de microalgas de utilización comercial (Becker, 1994).

TOXINAS NO BIOGÉNICAS:

Metales pesados: Es bien conocido que prácticamente todos los microorganismos pueden acumular metales pesados. Además de acumularse en la célula durante el tiempo de cultivo pueden introducirse en la biomasa microalgal en el proceso de recogida. Así, en condiciones alcalinas y en presencia de iones fosfato y sulfato de los nutrientes, los iones cadmio y plomo del medio forman compuestos poco solubles que precipitan o flotan adhiriéndose a las partículas pequeñas; estas partículas serán recogidas con la biomasa algal y procesadas con ella. El riesgo de contaminación puede reducirse lavando el concentrado algal con agua acidulada o agentes complejantes.

Para minimizar el riesgo de contaminación por metales pesados deben utilizarse nutrientes de calidad adecuada, ya que muchos fertilizantes contienen impurezas con niveles inaceptables de ciertos metales pesados.

Compuestos orgánicos: Los más importantes son los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los bifenilos policlorados. La mayoría de ellos son de origen antropogénico, muy tóxicos y carcinógenos. Existen pocos datos analíticos sobre su concentración en cultivos microalgales, aunque se ha detectado la presencia de algunos de ellos en algunos cultivos de *Scenedesmus obliquus* y *Spirulina platensis* (Payer y Runkel, 1978; Durand-Chastel, 1980). La presencia de estos compuestos en las microalgas depende de factores ambientales, básicamente del grado de contaminación de la zona donde se encuentre la unidad de producción microalgal.

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS CON ANIMALES

Las condiciones de seguridad para la utilización de las microalgas en alimentación dependen del organismo seleccionado, sustrato o medio de cultivo utilizado y las condiciones de cultivo. La seguridad del producto final debe determinarse por ensayos nutricionales y toxicológicos establecidos por el PAG (1972). Las microalgas que reúnan las condiciones de seguridad y valor nutritivo pueden ser utilizadas en alimentación.

Los resultados de los estudios toxicológicos realizados con distintas especies microalgales están dentro de los límites recomendados por el PAG. Los tests toxicológicos e histopatológicos demuestran que las microalgas no presentan problemas de seguridad para utilizarlas como alimento, si los métodos de procesamiento son adecuados y se suministran en la cantidad correcta.

Entre las pruebas realizadas para estudiar su tolerancia y digestibilidad se alimentaron ratas con *Scenedesmus acutus* como única fuente de proteína, a niveles del 10-15% en la dieta, durante 12 semanas. El aumento de peso fue mayor en las algas alimentadas con *Scenedesmus* al 15%. Esta dieta no presentó ningún efecto significativo toxicológico o histopatológico. Aunque la alimentación con dieta microalgal fue sólo durante tres meses, los datos obtenidos del análisis de orina y de los tests hematológicos, toxicológicos e histopatológicos han indicado que esta nueva fuente de proteína no es dañina. Los análisis de orina no indican ninguna anormalidad. No aparecen azúcares, sales biliares, pigmentos ni cuerpos cetónicos en la orina; la reacción de ésta es alcalina y se detectaron pequeñas cantidades de albúmina en todos los grupos. En el examen microscópico se detectaron algunos cristales de fosfato cálcico y de triple fosfato en todos los grupos. Todos los órganos de las ratas alimentadas con microalgas y los controles fueron examinados histopatológicamente y más detalladamente el hígado y el riñón. No apareció vacuolización celular o distorsión de las células, ni se detectaron depósitos de cristales de colesterol. No aparecieron diferencias en el contenido en hemoglobina ni en el número de glóbulos rojos entre animales sometidos a las diferentes dietas. El número de leucocitos fue ligeramente inferior en las dietas microalgales respecto a las de caseína, aunque en el porcentaje diferencial las proporciones relativas de las distintas células fueron similares. Los niveles de colesterol en el hígado fueron menores en animales con dietas microalgales, mientras que los niveles de colesterol en suero fueron similares. Este efecto hipocolesterolémico es reproducible, con lo que podría hallarse un efecto terapéutico de las microalgas. La actividad de los enzimas hepáticos succínico-deshidrogenasa y alanina-amino-transferasa fue similar en las ratas alimentadas con dietas microalgales y en los controles. La disminución en los niveles de estos enzimas puede reflejar deficiencias dietarias o síntomas de toxicidad, pero

las dietas microalgales parecen no afectar a la actividad de estas enzimas. La electroforesis en gel no mostró ninguna diferencia entre las proteínas del suero de los animales con dieta algal y los controles. Resumiendo, la alimentación con *Scenedesmus* a niveles del 10 o el 15% en la dieta durante tres meses no causa ningún efecto toxicológico en los animales test (Venkataraman *et al.*, 1980).

Se realizaron experiencias de 12 semanas en alimentación de ratas con *Scenedesmus* secada por distintos procesos. El secado en tambor implica un mejor consumo de la dieta y da resultados similares a la caseína, mientras que secada al sol o por cocción es pobremente consumida y da poco aumento de peso, sin embargo estas últimas producen un aumento del peso relativo del hígado, corazón y riñones, aunque las observaciones histológicas de estos órganos, junto con el bazo, no muestran ninguna anomalía (Becker y Venkataraman, 1982).

Chung *et al.*, (1978) han realizado experiencias de alimentación de ratas hembra con *Spirulina* como única fuente de proteínas, desde el momento del destete hasta que tuvieron su segunda camada. Todas las hembras alimentadas con microalgas concibieron, tuvieron camadas y éstas lactaron satisfactoriamente. El tamaño de las camadas y el peso al nacer fue ligeramente superior en el grupo alimentado con microalgas respecto al control de caseína. Las tasas de crecimiento después del destete de estas camadas también fueron normales. Las observaciones histológicas del hígado, riñones, corazón, pulmones, bazo, estómago, intestino, testículos y nódulos linfáticos no mostraron anomalías en los machos de rata alimentados con *Spirulina* durante dos semanas. Los hígados de ratas hembra que fueron alimentadas con *Spirulina* desde el destete hasta que sus camadas fueron destetadas, fueron también histológicamente normales.

Se realizaron también estudios de alimentación a largo y multigeneración. Así, se alimentaron ratones machos y hembras durante 7 generaciones, cada uno hasta las 80 semanas de edad, con dos tipos de dietas: una dieta control y otra dieta en la que el 20% del contenido básico se sustituyó por *Scenedesmus*. Los parámetros que mostraron diferencias significativas fueron los siguientes: peso corporal, esto es, crecimiento (+10%); supervivencia de hembras (+50%); tamaño de la camada (-11%); peso nacimiento por cachorro (+4%). En hembras viejas el peso relativo del hígado (+15%) así como los pesos absolutos de bazo (+19%) y riñones (+13%) aumentaron con la dieta microalgal. Según los autores, la adición de casi un 20% de harina de microalgas en una dieta equilibrada implica una considerable alteración de los nutrientes individuales y en el contenido en fibra bruta. Esto puede ser la causa de las alteraciones en el peso de órganos que se caracterizan por un metabolismo intensivo. En los estudios hematológicos, la única diferencia detectable entre los grupos test y control fue una reducción del 3% en el contenido de hemoglobina y en el hematocrito en las hembras alimenta-

das con microalgas. Investigaciones histopatológicas mostraron un aumento estadísticamente significativo de la amiloidosis hepática en hembras de las dos últimas generaciones alimentadas con microalgas (Ueberschaer y Schulz, 1977), si bien los ratones tienen cierta predisposición a la amiloidosis. Todas estas diferencias entre el grupo control y el algal no se observaron cuando se repitió la experiencia con ratas hasta la quinta generación (Payer *et al.*, 1980). Los efectos sobre la amiloidosis no fueron observados en experiencias anteriores ni tampoco pudieron reproducirse en ensayos posteriores destinados específicamente al estudio de sus causas, tratándose de casos aislados que pudieron deberse a errores de ensayo o a mala calidad del preparado microalgal (Pabst *et al.*, 1978).

Otra experiencia se realizó utilizando *Spirulina* como única fuente de proteína utilizando ratas macho en etapa de maduración sexual (Contreras *et al.*, 1979). No se observaron diferencias significativas entre los pesos de testículos, pituitaria o glándula prostática ventral de las ratas alimentadas con *Spirulina* y las del grupo control. Todos los animales tuvieron un desarrollo normal del sistema reproductivo, según se dedujo de los pesos de los órganos, histología testicular y niveles de hormonas reproductoras.

Otro tipo de ensayos de toxicidad son aquellos que tratan de evaluar la posible toxicidad dérmica aguda de las microalgas. Para esto se trataron ratas hembras adultas dermalmente con 0, 0.5, 1 y 2 g de *Scenedesmus* y *Spirulina*, por kilogramo de peso corporal. Se hizo una pasta con el polvo microalgal y agua que se aplicó a la piel del lado dorsal, que había sido previamente afeitada. Después de 24 horas de exposición se lavó la zona con agua y jabón y se secó. Ninguno de los animales tratados presentó signos de eritema o edema en la piel durante las 24 horas ni en el periodo de observación de 2 semanas. La piel fue normal y el pelo comenzó a salir normalmente, siendo la tasa de crecimiento del pelo también normal. Ninguno de los animales mostró efectos patológicos o síntomas de envenenamiento (Krishnakumari *et al.*, 1981).

Posteriormente se llevaron a cabo estudios de toxicidad oral aguda con ratas y pollos. Se metieron en jaulas individuales ratas hembras adultas a las que se administró oralmente, mediante catéter, dosis de *Spirulina* y *Scenedesmus*, por separado, de 0, 200, 400 y 800 mg de microalga por kg de peso corporal. Ninguna de las ratas presentó ningún signo significativo de anormalidad. No hubo cambios en los pesos corporales o en los pesos de los órganos comparados con el control, ni se observaron cambios histológicos en los órganos vitales. Estos resultados indican que dosis de 800 mg/kg de peso corporal no ejercen ninguna toxicidad sobre ratas (Krishnakumari *et al.*, 1981).

Una experiencia similar se realizó con machos adultos de *Gallus domesticus*,

con un peso corporal inicial entre 1120 y 1480 g. Se le administraron oralmente *Scenedesmus* y *Spirulina*, por separado a dosis de 0, 10, 20 y 35 g/kg de peso corporal. Ninguno de los gallos mostró síntomas de intoxicación o anormalidad. El peso corporal y los pesos de los órganos fueron comparables a los controles, no apareciendo cambios histológicos discernibles en los animales tratados (Becker y Venkataraman, 1982). De estas experiencias se deduce que *Scenedesmus* y *Spirulina* no ejercen ningún efecto nocivo sobre ratas o gallos cuando se administran en cantidades masivas.

Experiencias similares se realizaron con la microalga verde *Micratinium* incorporándola en distintas porporciones en la alimentación de pollos, codornices y ratones (Yannai y Mokadi, 1985). Los pollos se alimentaron durante 7 semanas sin que se manifestasen diferencias en el crecimiento ni anormalidades. Las codornices se alimentaron durante 4 semans, al cabo de las cuales el número de huevos por hembra fue algo menor en aquellas que habían sido alimentadas con la dieta microalgal, aunque el peso de los huevos y de los polluelos al nacer fue similar. En el caso de los ratones alimentados con la microalga no se observaron anormalidades en el crecimiento o el comportamiento reproductor.

MICROALGAS EN ALIMENTACIÓN DE AVES DE CORRAL, CERDOS Y RUMIANTES

El objetivo preliminar de la mayoría de los proyectos de investigación es utilizar la biomasa microalgal como pienso animal. Estos estudios tienen interés comercial especialmente con respecto a la máxima cantidad de microalgas que pueden ser suministradas en sustitución de las fuentes convencionales de proteína (harinas de pescado, soja, etc.) sin causar efectos negativos en los animales. Para evaluar el potencial de las microalgas como pienso es importante distinguir entre la utilización por vertebrados monogástricos y rumiantes, ya que los primeros no son capaces de digerir el material celulósico, especialmente en las clorofíceas, impidiendo la digestión del contenido proteico celular por los enzimas proteolíticos.

Numerosos experimentos nutricionales demuestran claramente el valor de muchas microalgas como suplemento proteico para peces, rumiantes, cerdos y pollos.

Aves de corral

La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre la posible utilización de microalgas en nutrición animal se han realizado con aves de corral; dichos estudios han llevado a la conclusión de que la incorporación de microalgas en las

dietas suministradas a las aves presenta numerosas ventajas a la hora de ser utilizadas de forma comercial en los piensos. La capacidad de estas aves de excretar ácido úrico permite la adición de elevadas concentraciones de algas en la dieta sin que por ello aparezca daño alguno en los animales (Becker, 1994).

Los primeros trabajos se realizaron con *Chlorella* seca (a 21°C y vacío) estudiando su utilización como fuente nutritiva para pollos; una dieta basal de soja se suplementaba con *Chlorella* y aminoácidos. La sustitución de la soja por una cantidad igual de *Chlorella* produjo un aumento del crecimiento y mejoró la eficiencia alimenticia, lo que se atribuyó al contenido en riboflavina de la microalga, además de otras vitaminas (Combs, 1952). Trabajos posteriores concluyen que el valor nutricional de *Chlorella* como pienso para los pollos es similar al de la harina de soja (Arakawa *et al.*, 1960). Cuando se incluye *Chlorella* en el pienso de las gallinas ponedoras, la yema del huevo contiene más pigmento, especialmente β -caroteno y xantofilas, que la yema de los huevos de las ponedoras alimentadas sin esta microalga.

En otros estudios sobre el valor de la proteína de varias microalgas (*Scenedesmus*, *Chlorella* y *Spongiococcum*) para el crecimiento del pollo se observó que las dietas microalgales daban peores resultados que las dietas de soja suplementada con metionina utilizadas como control. Entre las tres especies, la mezcla de *Chlorella* y *Scenedesmus* dió mejores resultados que las dietas de cada una de ellas por separado (Leveille *et al.*, 1962).

También se han llevado a cabo estudios de alimentación de gallinas ponedoras con dietas de *Chlorella* de hasta 120 g de algas por kg de dieta. No se han encontrado diferencias en la tasa de producción de huevos, en el peso del huevo, la conversión del alimento, etc., entre los controles y las aves alimentadas con dietas algales. En las ponedoras estas dietas pueden ser utilizadas como única fuente de proteína, mientras que en los polluelos es necesario otro aporte proteico (Lipsten y Hurwitz, 1980).

Otros autores han encontrado que grandes cantidades de algas (*Scenedesmus*) en las dietas de pollos causan un descenso del crecimiento, que se corresponde con la proporción de algas de la dieta (Brune y Walz, 1978). Basándose en resultados similares, como el descenso en el crecimiento de las aves tras la adición de elevadas cantidades de *Spirulina* sp. y *Scenedesmus* sp. reemplazando la harina de pescado en los piensos, se recomendó que la proporción de algas nunca exceda el 5% del total del pienso suministrado (Becker, 1994).

En otra experiencia se utilizaron *Scenedesmus*, *Oocystis*, *Chlorella* + *Euglena* y *Micratinium* en la alimentación de polluelos, en sustitución de la proteína de soja, a niveles del 25 y 50%, durante 4 semanas. Los resultados

demonstraron que todas las especies microalgales probadas podían sustituir satisfactoriamente al 25% de la proteína de soja. Al aumentar la cantidad de microalgas en las dietas, el crecimiento de los pollos disminuía (Mokady *et al.*, 1980).

Para elucidar el valor nutritivo de la proteína algal purificada, se utilizaron fracciones libres de lípidos de *Spirulina* sp. y *Scenedesmus obliquus* como única fuente de proteína en la alimentación de pollos (Brune, 1982). Esta biomasa libre de lípidos dio resultados similares e incluso mejores que las algas enteras. En este caso fue posible utilizar los extractos microalgales como única fuente de proteínas sin producir retardo en el crecimiento de los animales. Este resultado sugiere la posibilidad de que los efectos depresivos del crecimiento que pueden aparecer con dietas en las que se suministran algas no tratadas, puede ser causados por un elevado contenido en lípidos, especialmente ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la biomasa microalgal (Becker, 1994).

Mientras que la mayoría de los autores intentan suplementar la soja con las algas, Reddy *et al.* (1978) examinaron la alimentación de pollos desde la 1ª a la 5ª semana con *Scenedesmus obliquus* (con un nivel de proteína del 5%) en lugar de la harina de pescado, con y sin suplemento de metionina, y utilizando como referencia un pienso comercial. Los resultados indicaron que estas dietas pueden ser utilizadas en sustitución de la harina de pescado.

Existe poca información disponible acerca del valor nutricional de otras microalgas diferentes a *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*. Se han realizado estudios con especies poco comunes en este campo, como *Euglena* sp. y *Synechocystis* sp. que habían crecido en aguas residuales (Lincoln y Hill, 1980). Los resultados obtenidos no muestran datos acerca de una toxicidad específica; sin embargo, los autores indicaban que *Synechocystis* podía llegar a ser tóxica bajo determinadas condiciones de cultivo. Concentraciones por encima del 10% proporcionaron buenos resultados, mientras que cuando la proporción algal llegaba al 15 o 20% se producía una reducción del crecimiento de las aves.

Cerdos

Los cerdos han sido elegidos en distintos puntos como animales que potencialmente pueden ser alimentados con microalgas. La utilización de distintos porcentajes de una mezcla de *Chlorella* y *Scenedesmus* como suplemento no tuvo ningún efecto (Hintz y Heitmann, 1967). La utilización de harina de *Spirulina* como aditivo en la alimentación de cerdos se ensayó en experiencias de larga duración (Fevrier y Sevet, 1975); cerdos de doce días fueron alimentados con una dieta con un 12% de *Spirulina* hasta los 42 días, y a las hembras se les

administró a continuación una dieta con un 5% de esta microalga hasta los tres años. No se observaron diferencias significativas en los pesos corporales, edad de la primera concepción y número y peso de las camadas en la primera y segunda lactancia, en comparación con sistemas de alimentación estándar. Se estudió el valor biológico de *Scenedesmus* en la alimentación de cerdos de 20 kg de peso, comparándolo con otro grupo alimentado con alfalfa, bajo la base de igualdad de nitrógeno en la dieta. La alimentación con una dieta con un 12% de microalgas fue aceptable, compatible y con un buen valor biológico (Brune y Walz, 1978).

Además de los experimentos con *Chlorella* y *Scenedesmus*, poco se ha investigado sobre la utilización de *Spirulina* en la alimentación a largo plazo de cerdos. Una de las pocas investigaciones llevadas a cabo con esta cianobacteria fue realizada por Fevrier y Sevet (1975). Aunque en este estudio no se observó ningún problema asociado a la utilización de *Spirulina* en la alimentación de los cerdos, los autores recomendaron que la incorporación de esta especie debe restringirse a un nivel que no exceda el 25% del total de proteína de la dieta, especialmente en los animales jóvenes, dado que cantidades más elevadas pueden conducir a un aporte insuficiente de sustancias digestibles que reducirían el crecimiento y la eficiencia del pienso.

Spirulina maxima, *Arthrospira platensis* y *Chlorella* sp. fueron suministradas a cerdos de 4 a 8 días reemplazando al 33% de la proteína de soja de la dieta basal. Después de 26 semanas no hubo diferencias significativas en la ganancia de peso entre los animales alimentados con la dieta basal y los alimentados con las dietas microalgales. No hubo signos de diarrea, pérdida de apetito, toxicidad o daños histopatológicos en el tracto gastrointestinal (Yap *et al.* 1982).

Reuniendo toda la información disponible, puede concluirse que la biomasa microalgal presenta una buena calidad nutricional para ser incorporada al pienso utilizado en la alimentación de cerdos, proporcionando el material necesario para un buen crecimiento. Puede reemplazar a las proteínas convencionales como la soja o la harina de pescado, sin que ello influya en la aceptabilidad del alimento por parte de los animales. Otra de las ventajas de la utilización de la biomasa microalgal en la alimentación de cerdos y otros animales se basa en las propiedades antibacterianas de las algas, que no se encuentran en otras dietas estándar (Becker, 1994)..

Rumiantes

La forma más simple de utilización de la biomasa microalgal en la alimentación animal es como biomasa no seca, sin necesidad de tratamientos específicos posteriores. Esta biomasa sin tratar sólo puede ser suministrada a los rumiantes

y, sin embargo, hasta ahora se han hecho pocas evaluaciones con estos animales, debido sobre todo a la gran cantidad de biomasa que se requiere.

Se estudió el valor nutritivo de microalgas en la alimentación de corderos, ovejas y ganado vacuno. En rumiantes el coeficiente de digestibilidad de las microalgas fue del 73%, mucho mayor que el 54% obtenido en cerdos. Corderos alimentados con microalgas y alfalfa presentaron una ganancia de peso mayor que con alfalfa sola (Hintz *et al.*, 1966).

En Bulgaria se han realizado estudios de alimentación de ganado vacuno con biomasa microalgal fresca, sin tratar (Ganowski *et al.*, 1975); se alimentaron becerros con cultivos concentrados ($2-3 \times 10^8$ células/ml) de *Scenedesmus obliquus* durante 3 semanas. En este estudio se observó un aumento de la digestión intestinal sobre el total del proceso digestivo, sin que ello facilitase la digestión del pienso, ya que las diferencias observadas entre el control y los animales experimentales son mínimas.

En algunas ocasiones, las microalgas se recogen por floculación con aluminio. En los rumiantes existe una secreción endógena intensiva de fósforo en el estómago que puede ser mayor que la cantidad de fósforo ingerida; sin embargo, elevadas cantidades de aluminio ingerido con el pienso podrían causar un descenso de las reservas corporales de fósforo. Este hecho debe tenerse en cuenta a la hora de utilizar algas floculadas con aluminio en la alimentación de rumiantes (Becker, 1994).

MICROALGAS MARINAS

Casi todas las experiencias sobre la utilización de microalgas en nutrición animal (a excepción de la acuicultura) se realizan con microalgas de agua dulce y hay muy pocos datos sobre la calidad nutritiva de microalgas marinas.

Se ha determinado el valor nutritivo, en función del PER, en cuatro especies de microalgas marinas: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Chlorella stigmatophora*, cuyo contenido proteico y composición de aminoácidos las hacía adecuadas para su utilización en alimentación (Fábregas y Herrero, 1986). Los mejores valores del PER se obtuvieron con *Dunaliella tertiolecta* (Tabla 14) (Herrero *et al.*, 1993). El PER de esta microalga compara favorablemente con los de otras especies de agua dulce, como *Scenedesmus* y *Spirulina*, para las que se citan diferentes valores del PER en función del método de procesado utilizado para romper la pared celular. Esta microalga carece de pared celular lo que probablemente hace su proteína más fácilmente digerible para animales monogástricos. Paralelamente se realizaron análisis de órganos,

Tabla 14.- Alimento consumido, peso ganado, coeficiente de eficiencia proteica (PER) y eficiencia de conversión de alimento (FCE) de ratas alimentadas con dietas de caseína y distintas microalgas marinas con un nivel de proteínas del 12% durante 4 semanas (n= 10) (Herrero *et al.* 1993).

Dieta	Peso ganado	Alimento consumido	PER _{corr}	FCE
Caseína	94.72±3.79	274.3±11.99	2.50	2.89
<i>T. suecica</i>	46.18±5.28	293.6±23.99	1.14	6.35
<i>I. galbana</i>	41.24±4.19	264.9±12.99	1.13	6.42
<i>D. tertiolecta</i>	82.82±4.10	289.9±11.66	2.07	3.50
<i>C. stigmatophora</i>	40.51±5.88	261.6±20.41	1.13	6.45

recuentos sanguíneos y determinaciones en plasma para determinar los efectos tóxicos, sin que aparecieran anomalías respecto a la dieta control de caseína. Sin embargo, sí se produjo un descenso de triglicéridos y en algunos casos de colesterol en las ratas alimentadas con microalgas marinas respecto al control de caseína. Los resultados obtenidos mostraron un descenso significativo de los niveles de colesterol, triglicéridos y CPK en ratas alimentadas con la microalga marina *Dunaliella tertiolecta*.

A partir de estos resultados, se elige esta especie para estudiar su potencial hipocolesterolemico en ratas adultas en las que previamente se induce una hipercolesterolemia mediante una dieta estándar rica en colesterol y sales biliares durante 14 días. Esta dieta provoca un espectacular aumento de colesterol y fosfolípidos pero sin efecto significativo sobre el contenido en triglicéridos. A continuación se hacen 3 grupos de ratas que se alimentan durante 14 días uno con una dieta a base de *D. tertiolecta* y los otros dos con dietas estándar preparadas con caseína (proteína animal) y soja (proteína vegetal). Los estudios nutricionales se completan con los correspondientes análisis de plasma y de los órganos internos de los animales con el fin de advertir posibles alteraciones secundarias producidas por la alimentación con *D. tertiolecta*. Las tres dietas producen un descenso de colesterol, pero el descenso producido por la dieta microalgal es significativamente mayor que el producido por las otras dos (Fábregas *et al.*, 1994). Este efecto parece deberse no al contenido de ácidos grasos de la dieta, sino al efecto de la composición de aminoácidos de las proteínas de la dieta sobre el metabolismo lipídico (Fábregas *et al.*, 1994).

8.- Microalgas en acuicultura

Si los elevados costes hacen prohibitivo el amplio uso de microalgas como alimento animal, actualmente la única salida comercial de las microalgas es en la acuicultura, para el cultivo de larvas de moluscos y crustáceos y ciertos peces. El desarrollo de estos cultivos implica la producción diaria de sustanciales volúmenes de determinadas especies de microalgas marinas.

La acuicultura es una de las áreas de más rápido desarrollo en el campo de la producción alimenticia y las microalgas son el punto de partida biológico para el inicio del flujo de energía en las cadenas alimenticias acuáticas más importantes. A pesar de los muchos esfuerzos realizados para reemplazar las microalgas por dietas inertes, la acuicultura depende todavía de su producción y utilización como alimento vivo para animales acuáticos comercialmente importantes. De hecho, el cultivo masivo de estas especies representa un auténtico cuello de botella para el desarrollo de los sistemas de acuicultura.

Específicamente, las microalgas son un componente esencial de la dieta de moluscos bivalvos marinos (ostras, almejas, vieiras, mejillones, etc), las larvas de algunos gasterópodos marinos (abalones), larvas de crustáceos (*Penaeus*), algunas especies de peces (ej. tilapia, carpa plateada) y finalmente zooplancton. Este último sirve como alimento vivo para alimentar los juveniles de numerosos peces de agua dulce o marina y crustáceos. El zooplancton más comúnmente utilizado son rotíferos (*Brachionus*), copépodos (*Tigriopus*), cladóceros (*Daphnia*) y *Artemia*. Las microalgas también se utilizan para alimentar larvas del crustáceo de agua dulce *Microbrachium* y juveniles de algunos peces marinos como la dorada. Aunque no son esenciales en la dieta, los suplementos algales incrementan significativamente la supervivencia de las larvas (De Pauw y Persoone, 1988).

CAPACIDAD NUTRITIVA

Los factores que inciden en la capacidad nutritiva de las microalgas en sistemas de acuicultura son:

- Tamaño adecuado en función de la especie que vayan a alimentar.
- Pared celular. La mayoría de las microalgas poseen pared celular, aunque algunas carecen de ella. Su composición, grosor y tamaño es importante en la calidad nutritiva de una especie, ya que suele estar relacionada con la digestibilidad.
- Movilidad. Las especies móviles suelen ser preferibles a las especies inmóviles, ya que estas últimas suelen sedimentar en el fondo de los tanques con lo que dejan de estar disponibles para el animal en cultivo.
- Composición química. Si una microalga es ingerible y digerible, su valor nutricional dependerá de su composición bioquímica (Webby Chu, 1983). En este contexto, no sólo la composición mayoritaria, sino también la composición y concentración de aminoácidos, así como la composición de los lípidos, son de primordial importancia en el valor nutricional de las microalgas. Esta composición bioquímica varía con las condiciones de cultivo (temperatura, iluminación, composición del medio, etc.) (Capítulo 6).

Además de estos factores, la presencia de bacterias, así como determinados productos extracelulares juegan también un papel importante en la nutrición.

SELECCIÓN DE CEPAS PARA ACUICULTURA

El principal problema asociado con el uso de microalgas en acuicultura (fundamentalmente marina) es la falta de conocimiento tanto sobre el valor nutricional de las microalgas (De Pauw y Persoone, 1988), como de los requerimientos nutricionales de los consumidores de las mismas. Las microalgas constituyen la fuente de materia, energía y factores de crecimiento para estos organismos. Su crecimiento y desarrollo están influenciados por la disponibilidad y accesibilidad microalgal (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 qué unas especies son buenas fuentes de alimento y otras no, o no tanto, no ha sido todavía bien definida, existiendo muchas explicaciones contradictorias en la literatura. No obstante, se han 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 afectada además por la calidad de la biomasa microalgal (Laing y Millican, 1986)

Se han sugerido distintos factores para explicar porqué unas especies son mejores que otras para la alimentación de moluscos, además del tamaño celular, como composición de pared, digestibilidad y composición bruta, siendo estos criterios utilizados en la selección de cepas microalgales para acuicultura.

Respecto a la composición bioquímica hay que tener en cuenta distintos constituyentes, relacionándolos siempre con los conocimientos sobre requerimientos nutritivos de las distintas especies.

En lo que se refiere a la proteína, las larvas de molusco requieren entre un 30 y un 60% (en peso seco) de proteína en su dieta microalgal para obtener buenos crecimientos (De Pauw y Persoone, 1988). En el caso de los crustáceos, las microalgas con un contenido proteico entre el 30 y el 60% del peso seco han sido utilizadas satisfactoriamente en la alimentación de estados larvarios de langostino. Las necesidades de proteínas de varios estados del desarrollo de diferentes especies de langostino han sido establecidas mediante dietas artificiales entre un 30 y un 50%. Los peces necesitan entre un 40 y un 60% de proteína en su dieta. Las necesidades específicas de proteína dependen del hábitat (agua dulce, estuario, mar) y de si el animal es omnívoro, herbívoro o carnívoro.

Sin embargo, no existe una clara correlación entre el contenido proteico (expresado como % del peso seco del microalga) y su valor nutritivo. Por ejemplo, *Dunaliella salina* presenta una proporción mayor de proteína que *Chaetoceros calcitrans*, pero presenta un valor nutritivo menor cuando se utiliza sola. Webb & Chu (1983) sugieren que la concentración celular de proteína (cantidad de proteína/unidad de volumen celular) es una medida mejor que la proteína expresada como porcentaje del peso seco celular, y que una elevada concentración de proteína en un microalga está relacionada con una satisfactoria calidad como alimento. Sin embargo, los resultados de otras investigaciones sugieren que esta correlación es pobre. *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri*, ambas consideradas como adecuadas para la alimentación de moluscos, presentan valores medios de

Tabla 15.- Aminoácidos esenciales para maricultura (Tomada de Brown *et al.* 1989).

Aminoácidos	Bivalvos	Crustáceos	Peces	Intervalos en algas
Treonina	6.9	3.8	5.0	3.6-6.2
Valina	5.0	5.6	5.9	4.2-7.1
Metionina	2.4	3.7	1.8	1.6-3.2
Isoleucina	4.0	5.9	6.3	2.9-5.1
Leucina	7.7	7.8	8.0	6.7-10.2
Fenilalanina	3.7	5.6	4.6	2.8-6.0
Lisina	4.8	8.4	7.7	5.1-12.0
Histidina	1.3	2.9	3.4	1.4-3.6
Arginina	5.9	9.1	6.5	5.7-11.3
Triptófano	0.4	4.1	n.d	0-1.7
Prolina	1.5	6.6	10.9	3.2-6.7

concentración de proteína bajos, mientras que *Dunaliella tertiolecta* (con un alto valor proteico) utilizada en dietas monoalgales da resultados pobres en gran número de moluscos (Brown *et al.*, 1989). De esto se deduce que son importantes también otros nutrientes; las dietas mixtas, además, son más adecuadas con el fin de proporcionar todos los nutrientes necesarios en la acuicultura de moluscos.

Algunos aminoácidos son esenciales para las especies cultivadas (Tabla 15). Se define como nutriente esencial aquel que no puede ser sintetizado en cantidad suficiente para cubrir las necesidades del individuo, pero que puede ser suministrado en la dieta. Puede ser importante suministrar algunos aminoácidos, aunque no son estrictamente esenciales. Por ejemplo, la cisteína puede producirse a partir de la metionina (un aminoácido esencial), pero la provisión adecuada de cisteína en la dieta reducirá la necesidad de metionina en la misma. De forma similar, la adición de tirosina en la dieta reducirá las necesidades de fenilalanina.

Generalmente, se ha encontrado que la proteína de la dieta con un patrón de aminoácidos esenciales similar al de los animales o proteínas de huevo presenta un elevado valor nutritivo para alimentación animal. Así, la fuente de proteína puede variar en términos de un índice de adecuación. Para las microalgas, se define como la composición porcentual del aminoácido esencial en el alga, dividido por la composición del mismo aminoácido en los tejidos corporales del animal que está siendo alimentado, multiplicado por 100. Se calculó este índice para una serie de microalgas potencialmente aplicables al cultivo de *Mytilus californianus*, presentando valores en orden descendente de la calidad proteica predecida (Webb y Chu, 1983). Se ha encontrado alguna correlación entre los

índices de aminoácidos limitantes y valores alimenticios calculados. *T. suecica*, *Paulova lutheri* e *I. galbana* presentaron valores altos en el índice (mantienen buenos crecimientos) mientras que *Chlorella* sp. y *P. tricornutum* presentaron valores bajos en el índice (apenas mantienen el crecimiento) (Brown *et al.*, 1989). Como conclusión, puede decirse que la importancia de la composición en aminoácidos de las microalgas utilizadas como alimento en acuicultura es, de momento, poco clara y son necesarios más estudios para evaluar su papel.

Se ha intentado correlacionar el contenido en carbohidratos de las microalgas con su valor nutritivo para los moluscos bivalvos; contenidos entre un 5 y un 30% dan buenos resultados en lo que a crecimiento se refiere. Los niveles óptimos de carbohidratos en la dieta de larvas de *Penaeus japonicus* se han establecido entre el 15 y el 25% del peso seco de la dieta. Valores similares se han establecido para la mayoría de los peces. Enright *et al.* (1986) atribuyen los buenos resultados de la microalga *Rhodomonas* sp. en la alimentación de juveniles de *Ostrea edulis*, a su elevado nivel de carbohidratos por célula. Estos y otros autores han encontrado, sin embargo, que las dietas de alta calidad también pueden deberse a altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados 22:6 ω 3 y 20:5 ω 3.

Parsons *et al.*, (1961) sugirieron que la composición en carbohidratos era un factor sustancial que determina en buena medida el valor nutritivo de un alga y postularon que el alto contenido en glucosa tanto de *Paulova lutheri* como de *Skeletonema costatum* las hace ideales como alimento de diferentes organismos. Sin embargo, esta correlación fue refutada por Webb & Chu (1983), que puntualizaron que otras dietas microalgales con niveles de glucosa similares permiten diferentes crecimientos de larvas de ostra. Por ejemplo, *Chaetoceros calcitrans* proporcionó excelentes resultados en la alimentación de larvas y semilla de *Crassostrea gigas*, y presenta un nivel bajo-intermedio de glucosa, si se compara con otras microalgas.

La importancia de los carbohidratos en la dieta se demostró en los crustáceos. Abdel-Rahman *et al.*, (1979) mostraron que los juveniles de *P. japonicus* crecían más rápido con dietas artificiales que contenían disacáridos y polisacáridos que con dietas que contenían monosacáridos. Los monosacáridos como la glucosa son absorbidos rápidamente desde el estómago y liberados en la hemolinfa, provocando niveles de glucosa en sangre anormalmente altos. Sin embargo, los di- y polisacáridos se digieren lentamente, lo que conduce a una liberación gradual de monosacáridos en la hemolinfa y una utilización más eficiente de los mismos como fuente energética.

El tipo de carbohidratos también podría ser crítico en las dietas de peces. Degani *et al.* (1986) alimentaron anguilas europeas (*Anguilla anguilla*) con

Degani *et al.* (1986) alimentaron anguilas europeas (*Anguilla anguilla*) con dietas isonitrogenadas que contenían carbohidratos de distinta naturaleza. Observaron marcadas diferencias en las tasas de crecimiento de los distintos grupos; por ejemplo, las anguilas alimentadas con una dieta suplementada con harina de trigo como fuente de carbohidratos crecieron cuatro veces más rápido que las anguilas alimentadas con una dieta suplementada con almidón de patata. Las diferencias en las tasas de crecimiento se atribuyeron al diferente grado de utilización de las fuentes de carbohidratos.

Los lípidos de la dieta constituyen las fuentes de energía metabólica y de metabolitos específicos que son esenciales para el crecimiento de los animales (ácidos grasos, fosfolípidos, esteroides, hidrocarburos y alkenonas). Waldock y Nascimento (1979) encontraron que las diferencias en la tasa de crecimiento de larvas de *Crassostrea gigas* no se correlacionaban con la cantidad total de lípidos de la dieta microalgal (que varían entre 5 y 23%), aunque las larvas más grandes (con mejor crecimiento) contenían el porcentaje más alto (en peso) de triglicéridos. Las dietas que proporcionan los mejores crecimiento de peces y crustáceos generalmente presentan entre un 10 y un 20% de lípidos. Sin embargo, altos niveles de lípidos en la dieta dan como resultado altos niveles de lípidos en el animal, que se depositan como grasa en las vísceras durante el crecimiento.

El aspecto más importante de los lípidos en nutrición animales es el contenido y proporciones entre los ácidos grasos microalgales. Para la semilla de moluscos bivalvos son esenciales los ácidos grasos poliinsaturados de la familia $\omega 3$, especialmente el 20:5 $\omega 3$ y el 22:6 $\omega 3$ (Langdon y Waldock, 1981). Las microalgas que no contienen estos ácidos grasos proporcionan crecimientos pobres y aquellas que presentan al menos uno de ellos dan mejores resultados (Tabla 16). El papel fisiológico de estos ácidos grasos poliinsaturados, después de su incorporación en los fosfolípidos, es la de mantener la integridad y permeabilidad de la membrana.

Las dietas microalgales que proporcionan los crecimientos animales más satisfactorios presentan una concentración celular (masa por unidad de volumen celular) de los ácidos grasos 20:5 $\omega 3$ y 22:6 $\omega 3$ entre 1 y 20 $\text{fg}/\mu\text{m}^3$ ($1 \text{fg}/\mu\text{m}^3 = 1 \text{mg}/\text{ml}$). Las microalgas con concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados menores a 0.5 $\text{fg}/\mu\text{m}^3$ a menudo se asocian con crecimientos animales pobres cuando se suministran como dietas unialgales (Brown *et al.*, 1989). Sin embargo, los niveles mínimos de ácidos grasos poliinsaturados necesarios para las diferentes especies y para los diferentes estados de crecimiento de la misma especie aún no se conocen.

Las necesidades de las diferentes especies de crustáceos no son uniformes, pero 18:2 $\omega 6$, 18:3 $\omega 3$, 20:5 $\omega 3$ y 22:6 $\omega 3$ son todos muy importantes. Las larvas y juveniles de langostino necesitan ácidos grasos $\omega 3$, particularmente 20:5 $\omega 3$ y

Tabla 16.- Contenido en ácidos grasos esenciales para bivalvos de distintas microalgas marinas y especies de bivalvos alimentadas con ellas.

Alga	22:6 ω 3	PUFA 20:5 ω 3	Otros	Buen crecimiento y supervivencia
<i>I. galbana</i>	+	+	18:2 ω 6 18:3 ω 3 18:4 ω 3	<i>Mytilus edulis</i> <i>Crassostrea virginica</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Mercenaria mercenaria</i>
<i>I. sp. T-ISO</i>	+	trazas	18:4 ω 3	<i>C. virginica</i> <i>O. edulis</i> <i>M. mercenaria</i> <i>Tapes semidecussata</i>
<i>P. lutheri</i>	+	+	18:4 ω 3	<i>M. edulis</i> <i>O. edulis</i> <i>C. virginica</i> <i>C. gigas</i> <i>M. mercenaria</i>
<i>C. calcitrans</i>	+	+	20:4 ω 6	<i>O. edulis</i> <i>C. gigas</i> <i>C. virginica</i> <i>M. mercenaria</i> <i>T. semidecussata</i>
<i>C. gracilis</i>	trazas	+	20:4 ω 6	<i>O. edulis</i>
<i>P. tricornutum</i>	+	trazas	+	<i>M. edulis</i> <i>O. edulis</i>
<i>Th. pseudonana</i>	+	+	+	<i>C. virginica</i> <i>O. edulis</i> <i>M. edulis</i> <i>M. mercenaria</i> <i>Tapes japonica</i>
<i>T. suecica</i>	trazas	+	16:4 ω 3 18:2 ω 6 18:3 ω 3 18:4 ω 3	<i>C. gigas</i> <i>O. edulis</i> <i>M. edulis</i>
<i>D. tertiolecta</i>	-	-	16:4 ω 3 18:3 ω 3	
<i>N. atomus</i>	trazas	+	16:4 ω 3 18:2 ω 6 18:3 ω 3	

Tabla 17.- Requerimientos cualitativos en vitaminas para el cultivo de especies utilizadas en maricultura (Tomada de Brown *et al.* 1989).

Bivalvos	Crustáceos	Peces
tiamina	tiamina	tiamina
riboflavina	riboflavina	riboflavina
piridoxina	piridoxina	piridoxina
cianocobalamina	cianocobalamina	cianocobalamina
biotina	biotina	biotina
ácido nicotínico	ácido nicotínico	ácido nicotínico
ácido pantoténico	ácido pantoténico	ácido pantoténico
colina	colina	colina
inositol	inositol	inositol
ácido ascórbico	ácido ascórbico	ácido ascórbico
n.r	β-caroteno	n.r.
vitamina A	n.r.	vitamina A
vitamina D	vitamina D	n.r.
vitamina E	vitamina E	vitamina E
vitamina K	n.r.	vitamina K

22:6ω3. Los niveles óptimos de estos ácidos grasos poliinsaturados están en torno al 1% (Castell, 1983).

Los requerimientos de ácidos grasos poliinsaturados esenciales en peces parecen estar determinados por su ambiente, sus hábitos alimenticios y su posición en la cadena alimenticia. Los peces de aguas frías generalmente necesitan más ácidos grasos poliinsaturados que los peces de aguas más cálidas, para mantener la fluidez de las membranas celulares a bajas temperaturas. Las larvas de peces marinos responden mucho mejor a los 20:5ω3 y 22:6ω3 que a los 18:3ω3 y 18:2ω6 (Dabrowski, 1984). Se ha establecido que los requerimientos de ácidos grasos poliinsaturados en los peces varían entre el 1 y el 2% del peso seco. El papel nutricional de los ω6 en peces marinos, crustáceos y moluscos bivalvos no se comprende en profundidad, aunque algunas especies de agua dulce también los necesitan.

Los esteroides son importantes como constituyentes de la membrana y como precursores de sales y ácidos biliares y hormonas esteroideas (Cowey y Sargent, 1972). Se ha determinado la biosíntesis *de novo* de esteroides en algunas especies de moluscos bivalvos (*M. edulis* y *M. californianus*). Sin embargo, los moluscos bivalvos tienen una capacidad limitada para la biosíntesis de esteroides y necesitan que sean administrados en la dieta para obtener buenos crecimientos y

supervivencia, aunque los niveles óptimos requeridos no han sido determinados. Las fases larvarias, juveniles y adultas de crustáceos necesitan un suplemento de esteroides en la dieta para el normal desarrollo, porque no los pueden sintetizar *de novo*. Algunos crustáceos, como los copépodos y camarones, también necesitan el aporte de esteroides en las dietas microalgales, y aunque las microalgas contienen diferentes proporciones de esteroides, el total de la fracción de esteroides es convertida por estos animales en colesterol y demosterol (Brown *et al.*, 1989).

El β -caroteno (pro-vitamina A) es esencial para los crustáceos. Como precursor de la vitamina A presumiblemente podría contribuir también a la nutrición de peces y bivalvos, pero hay poco trabajo realizado en este aspecto. Las xantofilas de las microalgas de la dieta se incorporan en el exoesqueleto de los camarones y langostas (como astaxantina) y en la carne de los salmónidos (como cantaxantina y astaxantina). Estos compuestos juegan un papel muy importante en la pigmentación, pero otras posibles funciones apenas han sido definidas (Goodwin, 1984).

Los requerimientos en vitaminas de moluscos bivalvos no son bien conocidos (Tabla 17) y generalmente sólo hay datos cualitativos. Los requerimientos se han determinado a partir de dietas totalmente artificiales, no microalgales, de composición química precisa, sin determinar los niveles de estas vitaminas. Se conocen más los requerimientos de crustáceos y peces (Kanazawa, 1985; Chu *et al.*, 1987). En algunos crustáceos las larvas requieren más cantidades de algunas vitaminas que los juveniles (Kanazawa, 1985). En el caso de peces, los requerimientos de vitaminas difieren marcadamente incluso entre especies muy próximas; además, es difícil demostrar deficiencias vitamínicas, ya que la flora intestinal aporta vitaminas, lo que enmascara la incapacidad del animal para sintetizarlas. En cualquier caso, los peces y crustáceos tienen requerimientos en vitaminas bastante similares (Tabla 17). Un aspecto a tener en cuenta es que una vitamina puede estar presente en una célula microalgal pero ligada y de forma no disponible para el animal a alimentar; por ejemplo, los rotíferos son incapaces de utilizar cianocobalamina ligada de *Dunaliella* sp, pero cubren sus necesidades a partir de la cianocobalamina soluble excretada por el alga (Scott, 1981).

ESPECIES MÁS UTILIZADAS EN ACUICULTURA

Existen unas 40 especies de microalgas utilizadas comúnmente como alimento en acuicultura marina (Tabla 18). Dentro de las diatomeas, las especies más utilizadas son *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros* spp. y *Phaeodactylum tricorutum*. Las dos primeras tienen un gran valor nutricional, mientras que *P. tricorutum*, aunque es más fácil de cultivar, su valor nutritivo es menor. Las

Tabla 19.- Clases y géneros de microalgas cultivadas como alimentos para especies de animales cultivadas en acuicultura (Parcialmente tomada de Pauw & Persoone, 1988).

Clase	Género	Organismos alimentados
Bacillariophyceae	<i>Skeletonema</i>	Peneidos, moluscos
	<i>Thalassiosira</i>	Peneidos, moluscos
	<i>Phaeodactylum</i>	Peneidos, moluscos, <i>Artemia</i>
	<i>Chaetoceros</i>	Peneidos, moluscos
	<i>Nitzschia</i>	<i>Artemia</i>
Haptophyceae	<i>Isochrysis</i>	Peneidos, moluscos, , <i>Artemia</i>
Chrysophyceae	<i>Monochrysis</i>	Moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>
Prasinophyceae	<i>Tetraselmis</i>	Peneidos, moluscos, <i>Artemia</i> <i>Brachionus</i>
Chlorophyceae	<i>Dunaliella</i>	Moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>
	<i>Chlamydomonas</i>	Moluscos
	<i>Chlorella</i>	Moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>
	<i>Scenedesmus</i>	<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>
	<i>Nannochloris</i>	Moluscos, <i>Brachionus</i> ,
copépodos	<i>Brachiomonas</i>	Moluscos
Cyanophyceae	<i>Spirulina</i>	Peneidos, moluscos, <i>Artemia</i> , <i>Brachionus</i>

diatomeas se utilizan tanto para cultivos de zooplancton como para moluscos; en estos últimos parece que tienen un papel importante en la maduración gametogénica y puesta.

Entre las haptofíceas y crisofíceas, las dos especies más importantes son *Isochrysis galbana* y *Monochrysis lutheri*, consideradas como básicas para la cría larvaria de moluscos bivalvos.

La prasinofíceas *Tetraselmis suecica* es una de las microalgas más utilizadas en acuicultura por sus excelentes cualidades nutritivas y su óptimo crecimiento.

Entre las clorofíceas se pueden citar a *Dunaliella* spp. y *Chlamydomonas* spp., ambas con tasas de crecimiento elevadas, pero sedimentan fácilmente y no parecen tener una alta calidad nutritiva debido a deficiencias en su composición en ácidos grasos esenciales. Con *Chlorella* spp. los resultados son contradictorios;

en Japón es ampliamente utilizada para el cultivo de rotíferos, sin embargo en moluscos se han obtenido pobres resultados debido a que no pueden digerir la pared celular compuesta de celulosa, incluso en algunos casos se han descrito fenómenos de toxicidad. Con *Nannochloris* los resultados son igualmente diversos debido también en parte a su confusa situación taxonómica, integrando hasta hace poco tiempo microalgas pertenecientes a distintas clases.

APLICACIONES

La producción de microalgas es un método indispensable para el cultivo comercial de larvas de moluscos, crustáceos y ciertos peces. Las microalgas se pueden utilizar directamente en la alimentación de una especie de importancia comercial como alimento vivo o indirectamente como alimento para especies zooplanctónicas, como *Brachionus plicatilis* o *Artemia*, que a su vez son utilizadas en la alimentación de larvas. Generalmente, una sola especie de microalga es incapaz de satisfacer todos los requerimientos nutritivos de la especie a alimentar, normalmente debido a carencias en compuestos esenciales, como aminoácidos o ácidos grasos, por lo que se utilizan mezclas de varias especies (Strömngren y Cary, 1984; Enright *et al.*, 1986a; Albentosa *et al.*, 1993).

Otro tipo de utilización es, una vez secas, incluirlas en piensos; de esta forma se han obtenido buenos resultados, por ejemplo en el cultivo de peces (Sandbank y Hepher, 1978), *Artemia* sp. (Sorgeloos, 1974) o semilla de ostra y almeja (Laing y Gil-Verdugo, 1991).

Otra aplicación indirecta de las microalgas en acuicultura es la estabilización de estanques. Se ha demostrado que la adición de microalgas a los tanques de cultivo mejora el crecimiento y supervivencia de larvas de rodaballo (Ramos, 1978), produciéndose este efecto asimismo para larvas de otras especies (Howell, 1979; Juario y Storch, 1984). El efecto positivo de la adición de microalgas a los tanques sobre el ritmo de crecimiento y supervivencia se ha atribuido al mantenimiento de la calidad del agua por la acción de las microalgas -producción de oxígeno y utilización de amonio- (Seymour, 1980), así como a la excreción de factores de crecimiento (Brown *et al.*, 1989).

CULTIVO DE MOLUSCOS

El desarrollo de la acuicultura de moluscos fue seguido de un interés creciente en la producción masiva de determinadas microalgas marinas para utilizarlas como alimento en estos sistemas, puesto que actualmente constituyen la principal fuente de alimentación que permite el desarrollo larvario. Las algas

unicelulares vivas producidas en cultivo contienen todos los elementos propios para satisfacer las necesidades alimenticias de los estados iniciales de bivalvos cultivados.

Entre las especies más efectivas en la nutrición de larvas destacan: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Monochrysis lutheri*, *Dunaliella tertiolecta*.

Son numerosos los factores aleatorios que perturban la planificación de la producción intensiva de estas microalgas. Esto ha llevado a algunos autores a intentar conseguir otros alimentos, como féculas, levaduras, anterzoides de *Fucus*, algas liofilizadas o microcápsulas enriquecidas, sin que en ningún caso se hayan obtenido resultados superiores a los de las dietas microalgales (Haven, 1965; Epifanio, 1982; Langdon, 1982; Laing, 1987).

Aunque en principio fue materia de controversia, la tendencia generalizada en acuicultura es la utilización de dietas microalgales mixtas, pues muchas especies potencialmente válidas presentan carencias importantes en determinados factores de crecimiento (Brown *et al.*, 1989; Yúfera y Lubián, 1990).. Este tipo de alimentación es de gran importancia en cultivos comerciales ya que el cultivo de larvas con dietas mixtas asegura un crecimiento rápido y un alto índice de metamorfosis (Utting, 1986; Tan Tiu *et al.*, 1989). Por otra parte, semillas alimentadas con dietas de alto valor alimenticio crecieron más deprisa y tuvieron una mortalidad menor cuando se transplantaron a mar abierto (Laing y Millican, 1986). Esto hace pensar que el alimento ingerido por las larvas puede tener influencia en la vitalidad de las semillas. La dieta microalgal puede ser sustituida parcialmente o enriquecida con materia orgánica microencapsulada (Laing, 1987) o microalgas secas (Laing y Gil-Verdugo, 1991), pero ello puede estimular un alto crecimiento bacteriano (Laing, 1987; Brown *et al.*, 1989).

Se han observado diferentes grados en el comportamiento de las larvas de bivalvos referidos al alimento. Las larvas y juveniles de ostra requieren el aporte de ácidos grasos esenciales (Langdon y Waldock, 1981; Thompson y Harrison, 1992) y el número de microalgas utilizadas en su alimentación es por ello restringido. Microalgas como la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, de bajo valor nutritivo para juveniles de ostra (Walne, 1970; Enright *et al.*, 1986b), es sin embargo un alimento aceptable para larvas de ostra (Wilson, 1978; Ferreiro *et al.*, 1990) y juveniles de almeja y mejillón (Walne, 1970). Por otra parte, la semilla de las almejas *Tapes semidecussata* y *Mercenaria mercenaria* puede cultivarse con dietas microencapsuladas enriquecidas con un 15% (en peso) de microalgas vivas, mientras las ostras *O. edulis*, *C. gigas* y *C. virginica* requieren al menor un 60% de la dieta como microalgas vivas (Laing, 1987).

En cuanto al alimento de adultos no es muy diferente del de las larvas de la misma especie, sólo que al ser de mayor tamaño son menos exigentes y menos selectivos a la hora de elegir su alimento, y suele utilizarse agua de mar no filtrada directamente o enriquecida con microalgas cultivadas (Millican y Helm, 1994).

A la hora de seleccionar las algas unicelulares utilizadas como alimento por una especie determinada de bivalvo debemos tener en cuenta tres criterios:

1.- Talla. Es un parámetro limitante que viene determinado por la especie de bivalvo considerada y por la edad de los individuos. Así, el esófago de las larvas no permite la ingestión de partículas de más de 10 μm . La toma de alimento es importante y se traduce en un crecimiento acelerado (Winter, 1978; Webby y Chu, 1982).

2.- Calidad nutricional. Depende del tipo de molusco en crecimiento y de su estado de desarrollo. Existen distintos factores que inciden en la calidad nutricional: presencia o ausencia de pared celular gruesa, la composición química global de las microalgas, la naturaleza de los lípidos, especialmente los ácidos grasos, movilidad (no sedimentan) y ausencia de toxicidad (De Pauw, 1981; Brown *et al.*, 1989). Una de las claves para el buen crecimiento de las larvas, así como de los adultos, estriba en la disponibilidad y equilibrio de ácidos grasos. Experiencias con distintas microalgas en la dieta muestran que, aún siendo difícil identificar las diferencias críticas nutricionales entre las dietas de microalgas, aquellas que presentaban mejores resultados tenían altos niveles de ácidos grasos 22:6 ω 3 y 20:5 ω 3 (Langdon y Waldoock, 1981), así como altos niveles de glúcidos (Enright *et al.*, 1986a,b) y ácidos grasos saturados (Thompson y Harrison, 1992).

3.- Facilidad de producción de cultivo. Es muy importante para la producción diaria de grandes cantidades de microalgas. Es por esto que en cultivos masivos de moluscos se utilizan especies resistentes (Laing y Ayala, 1990).

En resumen, las mejores algas unicelulares son aquellas que tienen un tamaño inferior a 10 μm y un valor nutritivo adecuado. No deben ser tóxicas y dan mejor resultado las especies móviles, debido a que no sedimentan, y las que carecen de pared celular gruesa por ser más fácilmente digeridas.

En el cultivo de larvas o semilla es necesario mantener una ración diaria (mg microalgas/individuo/día) que sostenga una tasa de crecimiento alta, y que aumentará progresivamente con el desarrollo del individuo. El número de células algales ingeridas por individuo y día aumenta con el tamaño de la larva o semilla (Walne, 1974). De esa forma, el volumen de cultivo microalgal que será necesario producir dependerá del número de individuos por litro de agua en los tanque de cultivo, tamaño de los mismos y número de células algales requerido, que es a su

vez función del tamaño de la célula (ver más adelante).

Un factor importante a tener en cuenta es la concentración del alimento, intentando establecer qué concentraciones son las adecuadas para obtener un crecimiento óptimo.

En relación a esto, dos conceptos importantes a tener en cuenta son los de tasa de filtración (volumen de agua filtrado en unidad de tiempo) y tasa de ingestión (número o biomasa de microalgas ingeridas en la unidad de tiempo) y su variación en función de la utilización de cultivos concentrados o diluidos (Winter, 1978; Yúfera y Lubián, 1990; Riisgard, 1991)..

Cultivos concentrados: al aumentar la concentración de alimento se produce un aumento de la tasa de ingestión y un descenso en la tasa de filtración. La tasa de ingestión aumenta con la concentración de partículas hasta un máximo, por encima del cual se hace independiente. Como no todo el alimento filtrado puede ser ingerido, ya que hay una limitación marcada por esa capacidad de ingestión, una cierta parte se debe expulsar, lo que se puede realizar bien por medio de los cilios o bien en forma de pseudoheces. En cultivos muy densos, sin embargo, la tasa de ingestión desciende. Existe también una relación entre la tasa de ingestión y el tamaño de las microalgas cuando se mantiene constante su densidad, de manera que la máxima ingestión calculada, número de células/día, disminuye con el incremento en el tamaño de las microalgas. La tasa de ingestión está modulada por cambios en la tasa de filtración.

Cultivos diluidos: a concentraciones más reducidas de alimento las larvas pueden responder aumentando la actividad filtradora para conseguir una mayor ingestión. Si la concentración de alimento es muy diluida se produce un crecimiento muy lento y de hecho concentraciones demasiado bajas impiden que las larvas lleguen a la etapa de fijación.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que la información relacionada con el análisis bioquímico tanto de las especies microalgales utilizadas como de las larvas a lo largo de su desarrollo, puede ser lo más determinante a la hora de correlacionar una dieta dada con la evolución del cultivo (Enright *et al.*, 1986b; Utting, 1986; Thompson y Harrison, 1992; Albentosa *et al.*, 1993).

ARTEMIA

Artemia sp. es un primitivo crustáceo braquiópodo que se caracteriza por presentar un cuerpo alargado y carecer de caparazón rígido. En estado adulto tiene aproximadamente un tamaño de 10-12 mm.

Artemia es un crustáceo filtrador y basa su alimentación en la captura de bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos y detritos finamente divididos

presentes en el medio acuático en que vive, mediante una constante actividad filtradora a través de los telopoditos de sus toracópodos. El dispositivo filtrador de *Artemia* retiene cualquier tipo de partículas en suspensión del medio, ya sean de origen inorgánico u orgánico. Se trata de un proceso continuo y no selectivo.

Existen cepas bisexuales y cepas partenogenéticas, en ambos casos las hembras pueden presentar reproducción ovípara (al alcanzar el estado de gástrula, el embrión es rodeado por una cáscara y es depositado en el medio en forma de quiste) y ovovivípara (la hembra libera nauplios al medio). El producto de la reproducción ovípara proporciona enormes ventajas ya que los quistes son embriones deshidratados e inactivos que están rodeados por una cubierta quitinosa que les confiere gran resistencia.

La capacidad de formar embriones resistentes es lo que ha hecho que *Artemia* sp. sea el animal zooplanctónico más cultivado, ya que permite mantener un alimento vivo en condiciones excepcionales de conservación, transporte y almacenamiento, que, previa inmersión en agua de mar, reinicia su actividad metabólica y a las 24 h alcanza el estado de nauplio.

El nombre de la especie, *Artemia salina* L., carece de validez taxonómica desde que se comprobó la existencia de aislamiento reproductivo entre distintas poblaciones, por lo que estas poblaciones de *Artemia* sp. procedentes de diferentes lugares se designan como cepas. Las diferentes cepas presentan distintas características y, como consecuencia, se seleccionan unas u otras según el uso que se vaya hacer de ellas. En este terreno, España presenta un gran potencial ya que se han descubierto gran variedad de poblaciones de *Artemia* sp. en diferentes localidades.

Artemia sp. es esencial para el desarrollo de la acuicultura ya que todavía no se ha encontrado un alimento adecuado que lo sustituya en la alimentación de especies marinas y dulceacuícolas en cultivo (lenguado, rodaballo, lubina, dorada, camarón, langostino, bogavante, etc.).

La demanda mundial de quistes de *Artemia* sp. en 1980 fue de 46 toneladas aproximadamente, en 1985 aumentó a 85 toneladas y se espera que en el año 2000 la demanda de quistes alcance las 170 toneladas debido al creciente desarrollo de las plantas de cultivo de peces y crustáceos.

Las características de *Artemia* sp. que la hacen tan adecuada para la alimentación en acuicultura son:

- crecimiento rápido, ya que en condiciones óptimas crece de larva a adulto en menos de 2 semanas, aumentando 20 veces en longitud y 500 veces en peso (Reeve, 1963).

- puede ser cultivada en un amplio rango de salinidades (Gamallo, 1992).
- hay cientos de cepas naturales de *Artemia* con distintas características.
- puede reproducirse de dos formas: reproducción viva o producción de quistes.
- los quistes pueden ser tratados como un material inerte y en condiciones adecuadas pueden ser almacenados durante años, manteniendo intacta su viabilidad (Verischele *et al.*, 1990).
- la manipulación necesaria para provocar la eclosión de los quistes es un proceso muy simple y económico mediante el cual, en pocas horas, se obtiene gran número de presas vivas de tamaño adecuado.
- tiene alta tasa de fecundidad (más de 100 quistes o nauplios cada 100 días) y un largo periodo de vida, que puede pasar de los seis meses.
- el cultivo de los nauplios de *Artemia* sp. hasta el estado adulto es muy sencillo y nos permite obtener con un gasto mínimo gran cantidad de biomasa con unos tamaños adecuados a la alimentación de los diferentes estados de desarrollo de la especie a cultivar
- dado que es un filtrador de partículas no selectivo, se puede considerar la posibilidad de alimentación mediante preparados económicos o fertilizantes (Verischele *et al.*, 1990).
- puede crecer en altas densidades con éxito (más de 100 000 animales por litro) en agua de mar.
- los adultos poseen un alto valor nutritivo, su exoesqueleto es muy fino (menos de 1 μm) y el 60% de su peso seco consta de proteínas ricas en aminoácidos esenciales (Claus *et al.*, 1979). Contiene además significativas cantidades de vitaminas, hormonas, carotenoides, etc. (Gallagher y Brown, 1975; Soejima *et al.*, 1980).
- *Artemia* sp. puede ser utilizada como un vector para suministrar a las larvas de especies comerciales sustancias que son fundamentales para su desarrollo; esto se consigue proporcionando a *Artemia* sp. estas sustancias disueltas en su medio de cultivo o bien microencapsuladas; al poco tiempo ya las ha asimilado y puede ser suministrada como presa a las especies en cultivo.

Cultivo

Las condiciones de cultivo influyen directamente sobre la tasa de creci-

miento que, junto con el sistema de cultivo empleado, determina los rendimientos.

Los factores a tener en cuenta para el cultivo de *Artemia* son los siguientes:

- Temperatura: tiene una incidencia importante en los procesos de eclosión de los quistes y en las distintas fases de desarrollo (Wear y Haslett, 1986). Su importancia es capital en el tiempo de gestación y de generación (Wear *et al.*, 1986). No obstante, *Artemia* puede crecer en un amplio rango de temperaturas, variable según las distintas cepas.
- Salinidad: *Artemia* es una especie eurihalina. Sin embargo, un importante efecto de la salinidad en el ciclo de vida de *Artemia* se produce sobre el metabolismo de los quistes (Wear y Haslett, 1986). Los quistes de *Artemia* inician su mecanismo de eclosión cuando la salinidad del medio decrece por debajo de un cierto valor, dependiente de la cepa. A salinidades superiores a este valor los quistes nunca eclosionan, puesto que no se hidratan suficientemente, requisito indispensable para que se inicie el metabolismo de eclosión.
- Iluminación: aunque la intensidad luminosa puede afectar negativamente la velocidad de crecimiento de larvas de *Artemia* como resultado de la mayor actividad natatoria de las mismas debido a su fototactismo positivo, su papel es mucho más destacado en los procesos desencadenantes de la eclosión de los quistes. La intensidad luminosa está en relación inversa con el número de nauplios o de quistes en cada puesta (Sorgeloos *et al.*, 1986).
- Concentración de oxígeno: afecta al modo de reproducción y puede ser deletérea para las larvas cuando es continua, pudiendo incluso reducir el grado de crecimiento (Von Henting, 1971).
- Alimentación: A pesar de que *Artemia* es un filtrador no selectivo y obligado de partículas, ciertas características son críticas en la selección de una apropiada dieta para el cultivo de la misma (Verischele *et al.*, 1990):
 - * tamaño de partícula, que debe ser menor de 50 μm ,
 - * digestibilidad y valor nutritivo,
 - * escasa solubilidad, que debe ser mínima para reducir el deterioro del agua de cultivo.

Artemia se puede cultivar con éxito dentro de un amplio rango de dietas vivas e inertes: microalgas, macroalgas, levaduras, harina de trigo, harina de

pescado, arroz, etc. (Shimaya *et al.*, 1967; Sorgeloos, 1973; Sorgeloos *et al.*, 1980; Gamallo, 1992).

Las microalgas constituyen la mejor dieta viva para *Artemia* aunque no la más económica. A pesar de que su valor nutritivo está relacionado con la cepa y origen geográfico de la *Artemia* a la que sirven de alimento, sus características en cuanto a tamaño, facilidad de cultivo y obtención de altas densidades celulares en cultivo las hacen insustituibles en los propósitos de cultivo de *Artemia*. Se ha ensayado el valor nutritivo de distintas especies de microalgas bien en dietas monoalgales o en combinaciones de varias especies (Gamallo, 1992).. Las mayores tasas de crecimiento de *Artemia* se presentan cuando se alimentan con microalgas de gran reserva energética y proteica. Por el contrario, las microalgas con alto contenido en cenizas y escasas reservas proteicas y lipídicas causan una tasa de crecimiento menor.

Sin embargo, la producción masiva de microalgas constituye un punto crítico en los sistemas de acuicultura, lo que ha replanteado su utilización en forma de suspensiones homogeneizadas por ultrasonidos, congeladas o liofilizadas, o la utilización de dietas inertes (De Pauw y Persoone, 1988).

Para la producción a gran escala de adultos las materias primas naturales secas resultan menos costosas que las microalgas vivas y, a diferencia de éstas, pueden almacenarse largos periodos de tiempo. Varios productos de desecho agrícola, como salvado de arroz, soja o maiz, o de bioindustrias, como suero en polvo, se han revelado como una fuente adecuada de alimentación para cultivos de *Artemia*, aunque todas estas materias primas necesitan de un tratamiento apropiado para ajustar el tamaño de partícula (Dobbeleir *et al.*, 1980; Sorgeloos *et al.*, 1980; James *et al.*, 1981). El objetivo de la utilización de dietas inertes de bajo coste es rentabilizar la producción de grandes biomásas de *Artemia* de cara a su comercialización o utilización.

Como *Artemia* es un filtrador continuo el crecimiento más rápido y la conversión más eficiente de alimento se obtienen con densidades de alimento constantes. La transparencia del medio es un parámetro útil para determinar la dosis óptima de alimento.

En general, las técnicas de cultivo implican los siguientes requisitos:

- * agitación del cultivo para asegurar la distribución homogénea del alimento.
- * oxigenación del medio para permitir el desarrollo del cultivo a elevadas densidades. Las partículas alimenticias deben ser mantenidas en suspensión para que puedan ser filtradas, para ello se recurre a la agitación del medio por aireación con lo cual también se mantienen niveles de oxígeno adecuados.

- * posibilidad de automatización para impedir cambios drásticos de las condiciones de cultivo.

En general, para el cultivo de *Artemia* sp. se parte de lotes homogéneos de quistes que se hidratan manteniéndolos durante 24 horas en agua a una salinidad de 15-30 g/l, con aireación por burbujeo e iluminación inicial, necesaria para activar el mecanismo de eclosión. El proceso se desarrollará a la máxima velocidad con una temperatura del agua entre 20 y 25 °C.

En estas condiciones, en 24 horas aproximadamente, los quistes viables han eclosionado y los nauplios han de separarse de las cubiertas vacías, quistes no viables y otros residuos transfiriéndolos a un medio limpio. Durante las siguientes 24 horas no es necesario proporcionar alimento a los nauplios porque su sistema digestivo todavía no es funcional (boca y ano permanecen cerrados), mientras consumen su reserva de vitelo.

En muchas ocasiones es conveniente utilizar los nauplios recién eclosionados, pues su contenido energético es superior debido a la presencia del vitelo. Aunque no se les proporcione alimento, sí es posible aumentar su valor nutritivo adicionando al medio sustancias que pueden ser incorporadas a través de los tejidos corporales (ácidos grasos poliinsaturados, antibióticos, aminoácidos, etc.).

ROTÍFEROS

Los rotíferos son animales acuáticos de menos de 2 mm de longitud. Son filtradores y su extremo anterior está modificado en un aparato rotatorio ciliado, cuyo movimiento origina corrientes que atraen a los microorganismos de que se nutren. La especie más cultivada es *Brachionus plicatilis*, que se encuentra tanto en aguas salobres como en el mar y es fundamental para la alimentación de fases larvarias de crustáceos y peces.

Las principales ventajas que ofrece *Brachionus plicatilis* para su cultivo son (Pourriot, 1990):

- * su pequeño tamaño (100-300 µm), lo que permite a las larvas de peces y crustáceos ingerirlos cuando todavía no pueden ingerir nauplios de *Artemia*.
- * su alimentación fácil y económica a base de microalgas y/o levadura o dietas inertes.
- * su alta velocidad de reproducción bajo determinadas condiciones de cultivo, pudiendo duplicarse la población en menos de un día.
- * su resistencia a amplias variaciones de salinidad y a temperatura y densidades de cultivo muy elevadas.

Brachionus plicatilis es un filtrador y puede ser alimentado con una variedad de alimentos tales como microalgas, levaduras, bacterias, dietas inertes, microcápsulas, etc. (Coves *et al.*, 1990; Yúfera y Lubián, 1990). El tamaño de la abertura de la boca del rotífero determina el tamaño máximo de las partículas ingeridas, siendo éste de 30 μm para *B. plicatilis* (Pourriot, 1990).

Brachionus plicatilis exhibe una selectividad en la filtración (Chotiyaputta y Hirayama, 1987). Esta selectividad llega a preferir microalgas en la fase exponencial que las de decrecimiento; esto es de gran importancia por las implicaciones dietéticas que lleva consigo en cultivos de larvas. La elección de microalgas en fase exponencial se supone debida a una mayor facilidad de digestión con respecto a las células en decrecimiento, además de aportar una mayor calidad nutricional al rotífero.

La tasa de ingestión en rotíferos cambia con la temperatura, salinidad y concentración de comida (Pourriot, 1990; Yúfera y Lubián, 1990). En este último caso, a medida que se va aumentando la concentración de alimento, se aumenta la tasa de ingestión de *B. plicatilis*, pero llega un momento que aunque se aumente la concentración el rotífero no ingiere más comida por unidad de tiempo, llegándose al estado de saciedad, por lo que se debe tener en cuenta en cultivos masivos para que no se produzca desperdicio del alimento. El alimento debe suministrarse, en cultivos industriales, a una alta concentración inicial o bien varias veces al día, para mantener una alimentación continua en orden a mantener el metabolismo y reproducción del rotífero.

La densidad de microalgas tiene un marcado efecto en el crecimiento, existiendo para las distintas especies microalgales una mínima densidad para obtener el máximo rendimiento en rotíferos, aún cuando algunos autores señalan que aunque se sobrepasen mucho las densidades estándar esto no parece afectar al rotífero. Lo cierto es que a altas densidades de microalgas pueden producir una inhibición del crecimiento (Hirayama *et al.*, 1979; Yúfera *et al.*, 1983). Asimismo, se pueden originar variaciones importantes de pH y concentración de O_2 que inciden negativamente sobre el rotífero. Se han obtenido distintas respuestas respecto a supervivencia, tasa de crecimiento y fecundidad con distintas densidades de microalgas (revisado en detalle por Yúfera y Lubián, 1990).

COPÉPODOS

Los copépodos son crustáceos de unos pocos mm de longitud, de cuerpo generalmente corto y cilíndrico. El cultivo masivo de copépodos para alimento aún no dispone de una técnica adecuada. La especie más cultivada es *Tigriopus japonicus*, que algunos autores consideran como posible sustituto de la *Artemia*. Los copépodos se alimentan fundamentalmente con microalgas aunque se han

ensayado otros sistemas alternativos (macroalgas, soja, etc.). El inconveniente de los copépodos es que viven próximos al fondo y las paredes del recipiente de cultivo, y se desplazan con movimientos muy rápidos, lo que los hace inaccesibles para las larvas. Los nauplios de copépodos son pelágicos y presa fácil para las larvas. Sin embargo, es muy difícil mantener en condiciones controladas un cultivo de copépodos.

9.- Otras aplicaciones

En contraste con las macroalgas, las algas microscópicas apenas han sido explotadas comercialmente. Las más de 30000 especies de microalgas representan por tanto un recurso natural prácticamente inexplorado. Hay muchas ventajas en la producción de microalgas con propósitos económicos, que se pueden resumir en (Cohen, 1986; Richmond, 1990):

1. El cultivo de microalgas es un sistema biológico eficiente de utilización de la energía solar para producir materia orgánica. Muchas microalgas crecen más rápido que las plantas terrestres y es posible obtener mayores rendimientos anuales de biomasa.

2. Bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular en altas concentraciones compuestos de interés comercial, como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o bioplímeros (Burlew, 1953; Richmond, 1983; Cohen, 1986).

3. El ciclo vital de la mayoría de las microalgas se completa en unas horas, lo que hace que la mejora y selección genética de las especies sea relativamente fácil y rápida. Este hecho es particularmente cierto para las cianobacterias y será un punto de especial importancia en la biotecnología microalgal.

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. Entre estas aplicaciones se incluyen:

- **Biomedicina y farmacología:** además de su utilización en dietética o el tratamiento de heridas, algunas microalgas presentan efectos hipocolesterolémicos, actividades antibacterianas y antifúngicas y acti-

vidades antitumorales (Cohen, 1986; Borowitzka 1988a,b; Pesando, 1990; Güven *et al.*, 1990)

- 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 fueles líquidos (Borowitzka 1988a,b; Cohen, 1986; Richmond, 1990).
- Tratamiento de aguas: tratamiento de aguas residuales; detoxificación biológica y control de metales pesados en aguas naturales o en aguas industrialmente contaminadas (Oswald, 1988; Lincoln y Earle, 1990; Maeda y Sakaguchi, 1990; Greene y Bedell, 1990).
- Agricultura: utilización de la biomasa microalgal como biofertilizador (Becker y Venkataraman, 1982; Venkataraman, 1986).

Algunas de estas aplicaciones se resumen a continuación.

POSIBLES USOS TERAPEUTICOS DE LAS MICROALGAS

EFECTO DE HIPOCOLESTEROLEMIA

En el curso de distintos experimentos con ratas utilizando microalgas como fuente de proteína, se observó que las ratas alimentadas con dietas microalgales siempre mostraban niveles más bajos de colesterol. Esta observación preliminar condujo al diseño de experimentos para establecer el efecto hipocolesterolémico de las dietas con microalgas (Anusuya Devi *et al.*, 1979). Se utilizaron ratas macho adultas a las que se indujo una hipercolesterolemia adicionando colesterol y sales biliares a la dieta. Se utilizaron 3 dietas: una control de caseína al 10% y dos con microalgas al 10 y 15% del nivel proteico. Las ratas alimentadas con caseína presentaron un nivel de colesterol en suero más alto que las alimentadas con dietas microalgales. La reducción de colesterol fue ya significativa con la dieta microalgal al 10% y la dieta al 15% redujo aún más este nivel. Los niveles de colesterol en hígado fueron, asimismo, menores en las ratas alimentadas con dieta microalgal.

Rolley Pabst (1980) estudiaron el efecto hipocolesterolémico de *Scenedesmus* en ratas, encontrando que el nivel de triglicéridos en plasma de animales alimentados con la microalga fue menor que en los controles. La dieta enriquecida

con microalgas impide, asimismo, una excesiva deposición de colesterol en el hígado.

COMIDAS NATURALES O DIETÉTICAS A BASE DE MICROALGAS

En los últimos 40 años se ha investigado el uso potencial de microalgas en la dieta humana. En un ensayo realizado en Perú (Gross *et al.*, 1982) niños y adultos sanos recibieron diariamente 5 y 10 g respectivamente de harina de microalgas (*Scenedesmus acutus*) en su ración diaria; los análisis de sangre, orina y heces, así como las pruebas de alergia, al principio y al final del estudio, demostraron la buena aceptación de las microalgas sin ningún daño detectable. *Scenedesmus* fue también bien aceptada por niños ligeramente malnutridos, cuya ganancia de peso fue significativamente mayor que la de un grupo control. En otro ensayo, bebés hospitalizados con una severa malnutrición recibieron acompañando a su dieta terapéutica convencional una ración diaria de 0.49 g de proteína algal por kg de peso; los datos psicomotrices y antropométricos así como los análisis de sangre demostraron mejoría en el estado de los niños, y el aumento de peso fue significativamente superior en los niños alimentados con el alga.

Spirulina se ha administrado a niños desnutridos (Ramos, 1973) y adultos (Sautier y Temolieres, 1975) con resultados satisfactorios. Similares resultados fueron descritos por Fox (1986) y Miao (1987). *Spirulina* se utiliza también para corregir la malnutrición en vitamina A y para mantener bajos niveles de azúcar en sangre. *Spirulina* en polvo tienen el contenido proteico mayor de cualquier alimento natural (60-70%), mucho mayor que el pescado (15-20%), judías (35%), leche seca (35%), cacahuets (25%), huevos frescos (12%) o cereales (8-14%) (Henrickson, 1989). Además de la proteína, la composición de *Spirulina* en polvo contiene un 20% de carbohidratos, 5% de grasa, 7% de minerales y 3-6% de humedad (Henrickson, 1989). *Spirulina* es, por tanto, una fuente de proteína libre de colesterol, con bajo contenido en grasa y bajo contenido calórico, a diferencia de la carne (rica en grasa). Su contenido en vitaminas y ácidos grasos de *Spirulina* refleja otro importante ventaja como alimento humano. Esto hace que después del uso inicial de *Spirulina* como depresor del apetito, actualmente reciba atención por sus características nutricionales únicas; se vende principalmente como comida dietética en forma de polvo, gránulos o "flakes" así como en tabletas y cápsulas.

Lo mismo puede decirse para *Chlorella* que se vende comercialmente como "healthy food" en Japón y Taiwan. Las microalgas en tabletas se utilizan mucho en Japón y otros países occidentales como alimentos dietéticos. En Japón se consumen tabletas de *Chlorella* como preparados multivitamínicos; también se

consume una hierba medicinal, compuesta de *Chlorella* liofilizada en un 55%, que se utiliza como remedio contra numerosas enfermedades.

Fuente de β -caroteno

Un caso especial de algas en dietas animales es el de satisfacer los requerimientos de retinol en ratas con *Dunaliella bardawil* ya sea seca o en extracto graso (Nagasawa *et al.*, 1989). Los efectos de *Dunaliella* como fuente de β -caroteno sobre la reproducción y crecimiento corporal fueron estudiados por Nagasawa *et al.*, (1989) en ratones, concluyendo que la reproducción y el crecimiento corporal mejoraban por el β -caroteno de *Dunaliella*. Anteriormente, Ben-Amotz *et al.* (1986) demostraron que *D. bardawil* seca reemplaza con éxito al retinol sintético en una dieta de pollos. Ratas alimentadas con *D. bardawil* acumulaban en el hígado 9-*cis*- β -caroteno y todo-*trans*- β -caroteno en una ratio similar a la del alga.

TRATAMIENTO DE HERIDAS

Compuestos farmacéuticos con *Spirulina* como ingrediente activo producen una cicatrización acelerada de heridas (Clement *et al.*, 1967b). El tratamiento se realizó con cremas, ungüentos, soluciones y suspensiones. Por otra parte, se demostró que *Spirulina* y sus hidrolizados enzimáticos promueven el metabolismo de la piel e impiden la queratinización (Yoshida 1977).

TRATAMIENTO DEL CÁNCER CON FICOCIANINA

El pigmento azul ficocianina, que puede constituir aproximadamente el 20% del peso seco de *Spirulina*, se extrajo y se suministró oralmente a ratones inyectados con células tumorales de hígado (Iijima *et al.*, 1982). La tasa de supervivencia del grupo tratado fue significativamente mayor que la del control. Después de 5 semanas la supervivencia del grupo control fue del 25%, frente al 90% en el grupo tratado. Después de 8 semanas no quedaba ningún ratón vivo de los 20 del grupo control, mientras que el 25% del grupo tratado permanecía vivo. Estudios adicionales mostraron que la actividad linfocitaria del grupo tratado fue mayor que la del grupo control y la de un grupo normal de ratones. Según Iijima *et al.* (1982) la ficocianina puede estimular de forma generalizada el sistema inmunitario, proporcionando protección frente a distintas enfermedades. Estos resultados dieron lugar a dos patentes respecto al uso de ficobilinas como agente antitumorales, así como para el tratamiento de úlceras y hemorroides (Dainippon Ink & Chemicals and Tokyo Kenkyukai, 1983).

EXPERIENCIAS CON EL VIRUS DEL SIDA

Varios productos derivados de cianobacterias son activos *in vitro* contra el virus del SIDA. Los productos activos se identificaron como glucolípidos pero no se ha deescrito, hasta ahora, ni su modo de acción, ni el componente activo.

PROTECCIÓN ANTICANCERÍGENA POR β -CAROTENO

Se ha demostrado que un elevado consumo de vitamina disminuye el riesgo de cáncer (Peto *et al.*, 1981), pero no es la vitamina A procedente de fuentes animales sino el β -caroteno lo que se correlaciona con una tasa menor de cáncer (Shekelle *et al.*, 1981). Se han estudiado los efectos de la microalga *Dunaliella* rica en β -caroteno en la tumorigénesis mamaria de ratones. La suplementación de la dieta con *D. bardawil* inhibió significativamente la tumorigénesis (Nagasawa *et al.*, 1989). Asimismo se ha sugerido que cepas de *Spirulina* con alto contenido en β -caroteno podrían reducir los riesgos de cáncer si se consumen en cantidades apropiadas; demostrándose que extractos algales con este pigmento inhiben la carcinogénesis oral experimental (Schwartz *et al.*, 1988).

ACIDO γ -LINOLÉNICO (GLA) Y ESTIMULACIÓN DE PROTAGLANDINAS

Spirulina es una fuente natural concentrada de ácido γ -linolénico, que constituye aproximadamente el 1% de su peso seco. El ácido γ -linolénico está implicado en la síntesis y metabolismo de las prostaglandinas, estando la prostaglandina PGE₁ asociada con muchos aspectos fundamentales del organismo, como la regulación de la presión sanguínea, síntesis de colesterol, inflamación y proliferación celular. Generalmente la PGE₁ se forma a partir del ácido linoleico de la dieta, que es primeramente convertido a γ -linolénico, éste a dihomo- γ -linolénico y éste finalmente da PGE₁ (Cohen 1986). Las grasas saturadas y el alcohol inhiben la síntesis de prostaglandinas. La deficiencia en ácido γ -linolénico, y subsecuentemente de PGE₁, puede estar relacionada con muchas enfermedades degenerativas.

PRODUCTOS DE INTERÉS

PIGMENTOS

Bajo determinadas condiciones las microalgas pueden acumular pigmentos en la célula alcanzando concentraciones considerables. Los pigmentos más importantes son las ficobiliproteínas (ficocianina y ficoeritrina) así como una gran variedad de carotenoides. Entre los carotenoides están el β -caroteno, zeaxantina, astaxantina y luteína, con numerosas aplicaciones industriales, por

ejemplo, colorantes alimentarios, potenciadores del color en salmónidos, en la yema de huevo, etc. Estas aplicaciones se potenciarían si se pudiera reducir significativamente el precio de estos productos.

Otro pigmento de valor comercial es la clorofila. Se ha patentado un producto que utiliza clorofila de *Spirulina* como potente desodorante (Yamaguchi, 1981).

En cuanto a las ficobiliproteínas, se ha patentado la extracción de la C-ficocianina de *Spirulina* para obtener un pigmento azul que se utiliza en la industria cosmética (Dainippon Ink. and Chemicals Inc., 1981); como no es soluble en agua no se extiende por efecto de la humedad.

ACIDOS GRASOS

Los ácidos grasos más importantes son los poliinsaturados y de éstos los esenciales. Para el hombre éstos son linoleico, araquidónico, linolénico y eicosapentaenoico. A excepción del linoleico, los otros son raros tanto en alimentos de origen animal como vegetal, sin embargo están presentes en cantidades relativamente grandes en algunas microalgas. Un ejemplo, es *Porphyridium cruentum* que, como se ha citado (capítulo 4), es particularmente rica en ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas (Ahern *et al.*, 1983). Otro ácido graso importante es el γ -linolénico.

HIDROCARBUROS, CERAS Y ESTEROLES

Otros productos que se pueden obtener de microalgas son los hidrocarburos. En *Dunaliella salina* más del 30% de los lípidos totales son hidrocarburos cíclicos y *Botryococcus braunii* tiene un contenido en hidrocarburos de aproximadamente el 20% durante el crecimiento exponencial, aumentando hasta el 80% del peso seco en condiciones desfavorables de crecimiento (Bachofen, 1982)

Muchas especies de microalgas verdes contienen mezclas complejas de esteroides; el chondristerol de *Scenedesmus obliquus* o de *Navicula pelliculosa* puede utilizarse como materia prima para la síntesis de hormonas como la cortisona (Hoppe, 1979).

POLISACÁRIDOS

La mayoría de las microalgas producen polisacáridos, algunos de los cuales tienen aplicaciones industriales. Dos especies de *Porphyridium*, *P. cruentum* y *P. aeruginum*, se utilizan comercialmente para la producción de polisacáridos, debido a que producen grandes cantidades de polisacáridos extracelulares bajo condiciones definidas. Estos polisacáridos son de elevado peso molecular y con

una viscosidad bastante alta y pueden competir con otros gelificantes (Percival y Foyle, 1979; Savins, 1978). Pueden competir comercialmente con las carraginas, alginatos y agarosa de las macroalgas, así como con otros productos de bacterias heterotrofas u hongos (Arad, 1988; Gudin, 1988).

Otro polisacárido de importancia comercial es el almidón, que puede llegar a suponer el 50% del peso seco en una cepa termofílica de *Chlorella* (Pirt y Pirt, 1977).

ENZIMAS

La fosfofructoquinasa de *Spirulina platensis* es específica para el ATP y puede utilizarse para determinaciones de ATP. Asimismo varias especies contienen endonucleasas de restricción (Richmond, 1990). Células libres e inmovilizadas de *Chlorella vulgaris* y *Anacystis nidulans* tienen actividad aminoácido-oxidasa (Wikstrom *et al.*, 1982), que aumenta con luz roja. La superóxido dismutasa se ha purificado de *Spirulina* y *Porphyridium* y estas microalgas pueden ser una fuente de este enzima (Cohen, 1986).

AMONIO Y AMINOÁCIDOS

Ramos *et al.* (1987) y Guerrero *et al.* (1982) introdujeron el concepto de producción fotosintética de amonio por las cianobacterias. Alterando químicamente la vía de asimilación de amonio puede conseguirse una fotoproducción efectiva de amonio a partir de nitrato o de nitrógeno atmosférico, lo que hace posible la generación industrial de amonio mediante este sistema fotobiológico.

Determinados aminoácidos, como metionina, lisina, triptófano, ácido aspártico y ácido glutámico, son de gran demanda como componentes nutritivos en alimentación animal y/o humana. Se ha citado que algunas microalgas, como *Chaetoceros debile*, libera al medio aminoácidos libres hasta una concentración de 900 nM (Hammer y Eberlein, 1981). Con manipulación genética apropiada sería posible obtener especies microalgales que acumulen aminoácidos en su célula o los excreten al medio (Borowitzka, 1988).

BIOFLOCULANTES

Las cianobacterias bénticas, fijas al sustrato, no pueden escapar de las condiciones ambientales desfavorables, por lo que su supervivencia y crecimiento depende de un complejo conjunto de adaptaciones a las condiciones cambiantes que prevalecen en el punto en donde se encuentran. Estas adaptaciones incluyen la producción de floculantes extracelulares capaces de sedimentar o flocular partículas de arcilla en suspensión, permitiendo así que la luz llegue a la interfase

del bentos en aguas turbias. Se ha descrito la producción de floculante por una cepa de *Phormidium* en la fase estacionaria de crecimiento (Fattomm y Shilo, 1984), así como por *Anabaenopsis circularis* (Bar-Or y Shilo, 1988). Las cianobacterias producen diferentes tipos de floculantes, que pueden tener importantes aplicaciones industriales, en el tratamiento de aguas así como en la clarificación y sedimentación de coloides en industrias químicas y de alimentación.

ANTIBIÓTICOS Y VITAMINAS

Muchas especies microalgales producen sustancias con actividad antibiótica (Cohen, 1986; Borowitzka, 1988). *S. obliquus* se ha utilizado en el tratamiento postoperatorio de la superficie de coagulación; se han descrito actividades antivíricas y antifúngicas en la diatomea *Asterionella notata*; esta microalga, junto con cuatro diatomeas más, *Chaetoceros lauderi*, *C. pseudocurvisteus*, *C. socialis* y *Fragilaria pinnata*, tienen una significativa actividad antifúngica (Pesando *et al.*, 1979).

Se ha atribuido actividad antibiótica a extractos de numerosas microalgas: *Chlorella*, *O. danica*, *Stichococcus mirabilis*, *Protosiphon botryoides*, *C. reinhardii* y *Asterionella japonica*. Se considera que la búsqueda de actividad antibacteriana, antifúngica y antivírica en microalgas no ha hecho más que comenzar, pero los resultados obtenidos presentan un prometedor futuro.

La mayoría de las especies microalgales producen y requieren vitaminas, algunas de interés comercial. En general, las microalgas pueden sintetizar la mayoría de las vitaminas (Borowitzka, 1988), algunas de las cuales alcanzan precios elevados como suplementos dietéticos. Algunas microalgas producen significativas cantidades de vitamina E, que tiene un importante mercado como antioxidante.

MICROALGAS COMO FUENTE DE ENERGÍA

El mejor sistema de biofotólisis que produce hidrógeno libre se basa en cultivos en condiciones limitantes de nitrógeno de cianobacterias con heterocistos (Benemann y Weare, 1974). Aunque los rendimientos obtenidos no permiten de momento una aplicación práctica, existe ya una patente para la producción de hidrógeno de *C. reinhardii* (Yoshiharu *et al.*, 1983). Otro aspecto desarrollado ha sido la producción de metano a partir de biomasa de microalgas por digestión anaerobia (Cohen, 1988). Sin embargo, el desarrollo de métodos eficientes de utilización no biológica de la energía solar, ha hecho que pierda interés la utilización de microalgas en la producción de energía.

BIOFERTILIZANTES

Según Venkataraman (1986), el concepto de utilizar cianobacterias como fertilizantes para fijar nitrógeno en campos de arroz fue desarrollado en la India en 1939 por De, quien se dió cuenta de que el crecimiento de cianobacterias en el suelo lo fertilizaba. Esta observación fue posteriormente confirmada por Singh (1942) y Watanabe *et al.*, (1951). A partir de estos conocimientos se desarrollan trabajos para potenciar el desarrollo de las cianobacterias fijadoras endógenas de un suelo, así como ensayos de inoculación de cepas seleccionadas en un suelo.

Un "bloom" de cianobacterias puede tener el efecto de 15-25 kg de nitrógeno por hectárea (Watanabe, 1984). El potencial, sin embargo, es mucho mayor, y se cree que la tasa de fijación de nitrógeno en cultivos exteriores de *Anabaena* puede dar un rendimiento de más de 3 Tm de nitrógeno por hectárea y año (Fontes *et al.*, 1987).

No obstante, la utilización de cianobacterias como biofertilizantes presenta también importantes problemas, derivados sobre todo de la incapacidad de industrializar el proceso para producir buenos inóculos a un precio competitivo. A esto se suma, en ocasiones, el desconocimiento de las condiciones ambientales en los ecosistemas dónde se aplican (fundamentalmente en arrozales), lo que puede conducir a una fuerte inhibición de las cianobacterias inoculadas.

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Muchos tipos de aguas residuales, de origen doméstico, animal o industrial, constituyen un medio apropiado para el crecimiento de microalgas, que crecen rápidamente en esos medios, convirtiendo la energía solar en materia orgánica celular y produciendo calor. Este calor es beneficioso ya que acelera el tratamiento microbiológico aerobio y anaerobio de los residuos y al mismo tiempo acelera la muerte de especies patógenas que puedan estar presentes en el agua. La actividad fotosintética proporciona oxígeno para la oxidación microbiológica de los residuos, y la incorporación fotosintética de CO₂ sube el pH del agua residual hasta un valor letal para muchas bacterias y virus patógenos (Richmond, 1980). Estos hechos determinaron la utilización de microalgas en el tratamiento de aguas residuales, iniciada por Oswald (1975). El proceso esencialmente consiste en que los productos finales de la oxidación bacteriana del residuo se incorporan en las microalgas y éstas pueden retirarse del agua y utilizarse con distintos fines, mientras que el oxígeno producido es utilizado por las bacterias para la oxidación de más materia orgánica. Estos sistemas que combinan microalgas y bacterias

para un tratamiento controlado e intensivo se denominan estanques de alta tasa de oxidación (HROP) (Stengel, 1979).

Un problema de operatividad de estos sistemas de tratamiento se debe a la dificultad de establecer criterios estándar, ya que hay grandes variaciones en el tipo de efluente, calidad del agua, clima, etc., que inciden en el régimen de funcionamiento de una unidad de este tipo (Abeliovich, 1986). Debido a ello, estos sistemas sólo se están utilizando a nivel experimental, sin que se hayan producido desarrollos a nivel industrial.

10.- Bibliografía

- Aaronson, S. 1993. The ultrastructure and function of the contractile vacuole. En: **Ultrastructure of Microalgae**. Berner, T. (ed.), pp: 205-220. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Abalde, J., Fábregas, J. & Herrero, C. 1992. Beta-Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Biores. Technol.* 38: 121-125.
- Abdel-Rahman, S.H., Kanazawa, A. & Teshima, S. 1979. Effects of dietary carbohydrate on the growth and the levels of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45: 1491-1494.
- Abeliovich, A. 1986. Algae in wastewater oxidation ponds. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 331-338. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Ahern, T.J., Katoh, S. & Sada, E. 1983. Arachidonic acid production by the red algae *Porphyridium cruentum*. *Biotech. Bioeng.* 25: 1057.
- Ahmed, I. & Hellebust, J.A. 1986. The role of glycerol in osmoregulatory responses of the euryhaline flagellate *Chlamydomonas pulsatilla* Wollenweber. *Plant Physiol.* 82: 406.
- Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, V., Beiras, R. & Fernández-Reiriz, M.J. 1993. Nutritional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97: 261-269.
- Aldave-Pajares, A. 1969. Cushuro, algas azul-verdes como alimento en la región alta andina peruana. *Bol. Soc. Bot. Libertad, Trujillo (Perú).* 1: 5-43.
- Al-Hasan, R.H., Ali, A.M., Ka´wash, H.H. & Radwan, S. 1990. Effects of salinity on the lipid and fatty acid composition of the halophyte *Navicula* sp.: potential in mariculture. *J. Appl. Phycol.* 2: 215-222.

- Andersson, B. 1992. Thylakoid membrane dynamics in relation to light stress and photoinhibition. En: **Trends in Photosynthesis Research**. Barber, J., Guerrero, M.G. & Medrano, H. (eds.), pp: 71-86. Intercept. Andover, Hampshire.
- Andersson, B. & Styring, S. 1991. Photosystem II-molecular organization, function and acclimation. En: **Current Topics in Bioenergetics**. Lee, C.P. (ed.), vol. 16, pp: 1-81. Academic Press. Orlando, California.
- Antia, N.J., Berland, B.R., Bonin, D.J. & Maestrini, S.Y. 1975. Comparative evaluation of certain organic and inorganic nitrogen sources for phototrophic growth of marine microalgae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 55: 519-539.
- Antia, N.J., Berland, B.R., Bonin, D.J. & Maestrini, S.Y. 1980. Allantoin as nitrogen source for growth of marine benthic microalgae. *Phycologia* 19: 103-109.
- Anusuya Devi, M., Rajasekaran, T., Becker, E.W. & Venkataraman, L.V. 1979. Serum protein regeneration studies on rats fed on algae diets. *Nutr. Rep. Int.* 19: 785-793.
- Anusuya Devi, M. & Venkataraman, L.V. 1983a. Hypocholesterolic effect of the blue-green alga *Spirulina platensis* in albino rats. *Nutr. Rep. Int.* 28: 519-530.
- Arad, S. 1988. Production of sulfated polysaccharides from red unicellular algae. En: **Algal Biotechnology**. Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. & Cristiaen, D. (eds.), pp: 65-87. Elsevier Applied Science Pub., Amsterdam.
- Arakawa, S., Tsurumi, N., Murakami, K., Muto, S., Hoshino, J. & Yagi, T. 1960. Experimental breeding of white leghorn with the *Chlorella* added combined feed. *Jpn. J. Exp. Med.* 30: 185-192.
- Avron, M. 1992. Osmoregulation. En: **Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology**. Avron, M. & Ben-Amotz, A. (eds.), pp: 135-164. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Azuara, M.P. & Aparicio, P.J. 1983. *In vivo* blue-light activation of *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase. *Plant Physiol.* 71: 286-290.
- Bachofen, R. 1982. The production of hydrocarbons by *Botryococcus braunii*. *Experientia*. 38: 47.
- Ballantine, J. A., Lavis, A. & Morris, R.J. 1979. Sterols of the phytoplankton-effects of illumination and growth stage. *Phytochemistry*. 8: 1459-1466.
- Ballard, K. & Taub, F.B. 1972. Algal production for shellfish feeds. *Proc. Nat. Shellfish Ass.* 62: 1-2.
- Bar-Or, Y. & Shilo, M. 1988. Cyanobacterial flocculants. En: **Methods in Enzymology**, Vol. 167. Packer, L. & Glazer, A.N. (eds.), pp: 616-622. Academic Press Inc. Orlando, California

- Bassham, J.A., Larsen, P.O., Lawyer, A.L. & Cornwell, K.L. 1981. Relationship between nitrogen metabolism and photosynthesis. En: **Nitrogen and Carbon Metabolism**. Bewley, J.D. (ed.). pp: 135-163. Nijhoff/Junk. The Hague.
- Becker, E.W. 1977. Major results of the Indo-German algal project. Proceedings of the German-Israeli Workshop: Microalgae for Food and Feed. Munich, West Germany.
- Becker, E.W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.). pp: 339-419. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Becker, E.W. (ed.) 1994. **Biotechnology and Microbiology**. 293 pp. Cambridge University Press, Cambridge .
- Becker, E.W. & Venkataraman, L.V. 1982. **Biotechnology and Exploitation of Algae -The Indian Approach**. 216 pp. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit GmbH, Eschborn, Germany.
- Becker, E.W. & Venkataraman, L.V. 1984. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass*, 4: 105-125.
- Bedell, G.W. 1985. Stimulation of commercial algal biomass production by the use of geothermal water for temperature control. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1063-1066.
- Beevers, L. & Hageman, R.H. 1983. Uptake and reduction of nitrate: Bacteria and higher plants. En: **Inorganic Plant Nutrition, Encyclopedia of Plant Physiology**, NS, vol. 15A. Läuchi, A. & Bielecki, R.L. (eds.), pp: 351-375. Springer-Verlag, Berlin.
- Behr, W. & Soeder, C.J. 1981. Commercial aspects of utilizing microalgae with special reference to animal feeds. U.O.F.S. Publ. Ser. C. N°3, Univ. Orange Free State, Bloemfontein, Republic of South Africa, 63.
- Beijerinck, M.W. 1890. Kulturversuche mit Zoochlorenellen, Lichenengoniden und anderen niederen Algen. *Bot. Zeitung*. 48: 725.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1989. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En: **Algal and Cyanobacterial Biotechnology**. Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. & Shah, N. (eds.). Longman Scientific & Technical Press. London.
- Ben-Amotz, A., Edelstein, S. & Avron, M. 1986. Use of the beta-carotene rich algae *Dunaliella bardawil* as a source of retinol. *Br. Poultry Sci.* 27: 613-619.
- Ben-Amotz, A., Mokady, S., & Avron, M. 1988. The beta-carotene-rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol in rat diet. *Br. J. Nutr.* 59: 443.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G. & Thomas, W. H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21: 72-81.
- Benemann, J.R. & Weare, N.M. 1974. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science* 184: 174-175.

- Benemann, J.R., Weissman, J.C., Koophan, B.L. & Oswald, W.J. 1977. Energy production by microbial photosynthesis. *Nature* 268: 19-23.
- Berner, T. (ed.). 1993. **Ultrastructure of Microalgae**. 314 pp. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Bertl, A., Felle, H. & Bentrup, F.W. 1984. Amine transport in *Riccia fluitans*. *Plant Physiol.* 76: 75-78.
- Boney, A.D. 1989. **Phytoplankton**. 118 pp. Edward Arnold. London.
- Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. 1988. *Dunaliella*. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 27-58. Cambridge University Press. Cambridge.
- Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. 1988a. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 153-196. Cambridge University Press. Cambridge.
- Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. 1988b. Fats, oils and hydrocarbons. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 257-287. Cambridge University Press. Cambridge.
- Bourges, H., Sotomayor, A., Mendoza, E. & Chavez, A. 1971. Utilization of alga *Spirulina* as a protein source. *Nutr. Rep. Int.* 4: 31-43.
- Boussiba, S. 1988. N₂-fixing cyanobacteria as nitrogen biofertilizer, a study with the isolate *Anabaena azollae*. *Symbiosis* 6: 129-138.
- Boussiba, S. & 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.
- Brewer, P.C. & Goldman, J. C. 1976. Alkalinity changes generated by phytoplankton growth. *Limnol. Oceanogr.* 21: 108-117.
- Brown, M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145: 79-99.
- Brown, A.D. & Borowitzka, L.J. 1979. Halotolerance of *Dunaliella*. En: **Biochemistry and Physiology of Protozoa**, 2nd ed., vol: 1. Levandowsky, M. & Hutner, S.H. (eds.), pp: 139-190. Academic Press. New York.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. & Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Marine Reports*, n° 205.
- Brune, H. 1982. Zur verträglichkeit der einzelleralgen *Spirulina maxima* und *Scenedesmus acutus* als alleinige eiwessquelle für broiler. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde.* 35: 55-75.

- Brune, H. & Walz, O.P. 1978. Studies on some nutritive effects of the green alga *Scenedesmus acutus* with pigs and broilers. *Archiv für Hydrobiologie, Beihefte Ergebnisse der Limnologie*. 11: 79-88.
- Burlew, J.S. 1953. Current status of the large-scale culture of algae. En: **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**. Burlew, J.S., (ed.), No. 600, pp: 3-23, Carnegie Institution of Washington, Washington D.C.
- Castell, J.D. 1983. Fatty acid metabolism in crustaceans. En: **Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition, October 27-29, 1981. Lewes/Rehoboth Beach, Delaware**. Pruder, G.D., Langdon, C.J. & Conklin, D.E. (eds.), pp: 124-145. Louisiana State University, Division of Continuing Education.
- Castillo, J.S., Merino, F.M. & Heussler, P. 1980. Production and ecological implications of algae mass cultures under Peruvian conditions. En: **Algae Biomass: Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 123-134. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Chotiyaputta, C. & Hirayama, K. 1978. Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. *Mar. Biol.* 45: 105-111.
- Chu, F.E., Webb, K.L., Hepworth, D.A. & Casey, B.B. 1987. Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microencapsulated diets. *Aquaculture* 64: 185-197.
- Chung, P., Pond, W., Kingsbury, J.M., Walker, E.F. & Krook, L. 1978. Production and nutritive value of *Arthrospira platensis*, a spiral blue-green alga grown on swine wastes. *J. Animal Sci.* 47: 319-330.
- Christie, W.W. (ed.). 1987. **HPLC and lipids. A practical guide**. Pergamon Press. Oxford.
- Cid, A., Abalde, J. & Herrero, C. 1992a. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (*Prasinophyceae*). *J. Appl. Phycol.* 4: 31-37.
- Cid, A., Abalde, J. & 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.
- Ciferri, O. 1981. Let them eat algae. *New Scientist*: 810-812.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47: 551-578.
- Ciferri, O., Tiboni, O. & Sanangelantoni, A.M. 1989. The genetic manipulation of cyanobacteria and its potential uses. En: **Algal and Cyanobacterial Biotechnology**. Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. & Shah, N. (eds.), pp: 239-263. Longman. London.
- Clement, G., Giddey, C. & Menzi, R. 1967a. Amino acid composition and nutritive value of the algae *Spirulina maxima*. *J. Sci. Food Agric.* 18: 497.

- Clement, G., Rebeller, M. & Zarrouk, C. 1967b. Wound treating medicaments containing algae. *Fr. M (Ed.)* 5279.
- Claus, C., Benijts, F., Vandepute, G. & Gardner, W. 1979. The biochemical composition of the larvae of two strains of *Artemia salina* L. reared on two different algal foods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 36: 171-183.
- Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 421-454. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Collins, C.D. & 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.
- Combs, G.F. 1952. Alga (*Chlorella*) as a source of nutrients for the chick. *Science* 116: 453-454.
- Contreras, A., Herbert, D.C., Grubbs, B.G. & Cameron, I.L. 1979. Blue-green alga, *Spirulina*, as the sole dietary protein in sexually maturing rats. *Nutr. Rep. Int.* 19: 749-763.
- Coves, D., Audineau, P. & Nicolas, J.-L. 1990. En: **Aquaculture**. vol I. Barnabé, G. (ed.), pp: 232-245. Ellis Horwood. Chichester, England.
- Cowey, C.B. & Sargent, J.R. 1972. Fish nutrition. *Adv. Mar. Biol.* 10: 383-492.
- Craig, R., Riechelt, B.Y. & Reichelt, J.L. 1988. Genetic engineering of micro-algae. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 415-455. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cresswell, R.C. & Syrett, P.J. 1981. Uptake of nitrate by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Exp. Bot.* 32: 19-25.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present (state of the art) and perspectives. *Reprod. Nutr. Develop.* 24: 807-833.
- Dainippon Ink and Chemicals Inc. 1981. Cosmetics containing water soluble phycocyanin. *Japanese Patent*, 79-138755.
- Dainippon Ink and Chemicals and Tokyo Kenkyukai (inventors and assignee). 1983. Antitumoral agents containing phycobilin also used to treat ulcers and hemorrhoidal bleeding. *JP 58065216 A 830418*.
- Dam, R., Lee, L., Fry, P.L. & Fox, H. 1965. Utilization of algae as protein source for humans. *J. Nutr.* 86: 376-382.
- Darley, W.M. 1982. **Algal Biology: A Physiological Approach**. Wilkinson, J.W. (ed.), 168 pp. Blackwell Scientific Pub. Oxford.
- Darley, W.M. 1987. **Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico**. 236 pp. Limusa S.A., México.
- Degani, G., Viola, S. & Levanon, D. 1986. Effects of dietary carbohydrate source on growth

- and body composition of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquaculture* 52: 97-104.
- De la Noue, J. & De Pauw, N. 1988. The potencial of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotech. Adv.* 6: 725-770.
- De Pauw, N. & Persoone, G. 1988. Microalgae for aquaculture. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 197-221. Cambridge University Press, Cambridge.
- De Pauw, N., Verboven, J. & Claus, C. 1983. Large-scale microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. *Aquacult. Eng.* 2: 27-47.
- Dickson, M.W. 1987. Pilot-scale cultivation of microalgae as an ingredient for fish feed in Zambia. *Aquacult. Fish. Manag.* 18: 109-120.
- Dionisio, M.L., Tsuzuki, K. & Miyachi, S. 1989. Light requirement for carbonic anhydrase induction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 30: 188-200.
- Dobbeleir, J., Adam, N., Bossuyt, E., Bruggeman, E. & Sorgeloos, P. 1980. New aspects of inert diets for high density culturing of brine shrimp. En: **The brine shrimp *Artemia*. vol 3: Ecology, culturing, use in aquaculture**. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. & Jaspers, E. (eds.). Universa Press, Wetteren (Belgium).
- Dodd, J.C. 1986. Elements of pond design and construction. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 265-283. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Dodge, J.D. 1973. **The Fine Structure of Algal Cells**. 261 pp. Academic Press, NY.
- Dortch, Q., Clayton, J.R., Thorensen, S.S. & Ahmed, S.I. 1984. Species differences in the accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.* 81: 237-250.
- Droop, M.R. 1967. A procedure for routine purification of algae cultures with antibiotics. *Br. Phycol. Bull.* 3: 295-297.
- Dubinsky, Z., Falkowski, P.G. & Wyman, K. 1986. Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiol.* 27: 1335-1349.
- Dunstan, W.M. & Tenore, K.R. 1972. Intensive outdoor culture of marine phytoplankton enriched with treated sewage effluent. *Aquaculture* 1: 181-192.
- Durand-Chastel, H. 1980. Production and use of *Spirulina* in Mexico. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 51-64. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Dutrieu, J. 1960. Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'*Artemia salina* Leach. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 99: 1-133.
- Ehrenfeld, J., & Cousin, J.L. 1982. Ionic regulation of the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. Membrane Biol.* 70: 47.
- Eisenberg, D.G., Oswald, W.J., Benemann, J.R., Goebel, R.D. & Tiburzi, T.T. 1979. Methane

- fermentation of microalgae. En: **Proceedings of the 1st International Symposium on Anaerobic Digestion**. pp: 123-135. Cardiff: University Colleges.
- Emdadi, D. & Berland, B. 1989. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. *Mar. Chem.* 26: 215-225.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. & 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. & 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. 1982. Phytoplankton and yeast as foods for juveniles bivalves: A review of research at the University of Delaware. En: **Proceedings of International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition**. Pruder, G.D., Langdon & Conklin, D. (eds.), pp: 292-304. Louisiana State Univ. Baton Rouge, LA.
- Eyster, C.H. 1967. (ed.). **Mineral nutrient requirements of *Chlorella sorokiniana* in continuous pure culture**. 53 pp. PhD Thesis, USAF, School of Aerospace Medicine (AFSC), Texas.
- Fábregas, J. 1982. **Las microalgas como eslabón de infraestructura en la Microbiología Marina: aislamiento, caracterización, ciclo celular, interacciones y aprovechamiento tecnológico**. 468 pp. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago.
- Fábregas, J., Abalde, J., Cabezas, B. & 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. & Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-245.
- Fábregas, J., Ferrón, L., Gamallo, Y., Vecino, E., Otero, A. & Herrero, C. 1994b. Improvement of growth rate and cell productivity by aeration rate in cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Biores. Technol.* 48: 107-111.
- Fábregas, J. & Herrero, C. 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture* 51: 237-243.

- Fábregas, J. & Herrero, C. 1990. Vitamin content of four marine microalgae. Potencial use of vitamins in nutrition. *J. Ind. Microbiol.* 5: 259-264.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J. & Cabezas, B. 1985. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture* 50: 1-11.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J. Liaño, R. & 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. & Abalde, J. 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., Herrero, C., Cabezas, Liaño, R. & Abalde, J. 1986. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch cultures. *Plant Physiol.* 125: 475-484.
- Fábregas, J., Herrero, C., Gamallo, Y., Otero, A., Paz, J.M. & Vecino, E. 1994. Decrease of plasmacholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 533-540.
- Fábregas, J., Toribio, L., Abalde, J., Cabezas, B. & Herrero, C. 1987. Approach to biomass production of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kytin) Butch using common gardener fertilizers and soil extract as cheap nutrient supply in batch cultures. *Aquacult. Eng.* 6: 141-150.
- Fábregas, J., Vázquez, V., Cabezas, B. & 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. 1980. (ed.). Light-shade adaptation in marine phytoplankton. En: **Primary Productivity in the Sea**. 99 pp. Plenum Press. New York.
- Falkowski, P.G. & Owens, T.G. 1978. Effects of light intensity on photosynthesis and dark respiration in six species of marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 45: 289-295.
- Falkowski, P.G. & Owens, T.G. 1980. Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.* 66: 592.
- Fattom, A. & Shilo, M. 1984. *Phormidium* J-1 biofloculant: production and activity. *Archives of Microbiology* 139: 421-426.
- Feldheim, W. 1972. Untersuchungen über die Verwendung von Mikroalgen in der menschlichen Ernährung. I. Ernährungsversuche mit algenhaltigen Kostformen in Thailand. *Int. J. Vitamin Nutr. Res.* 42: 600-606.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J. & Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83: 17-37.

- Ferreiro, M.J., Pérez-Camacho, A., Labarta, V., Beiras, R., Planas, M. & Fernández-Reiriz, M.J. 1990. Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimes. *Mar. Biol.* 106: 395-401.
- Fevrier, C. & Sevet, B. 1975. *Spirulina maxima* in pig feeds. *Ann. Nutr. Alim.* 29: 625-650.
- Fidalgo, J.P., López-Muñoz, I., Cid, A., Herrero, C. & Abalde, J. 1990. Incidencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de biomasa y composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos masivos. *Actas III Congr. Nac. Acuicult.* 651-656.
- Fidalgo, P., López-Muñoz, I., Reiriz, S. & Herrero, C. 1992. La microalga marina *Isochrysis galbana* como potencial fuente de obtención de lípidos: Efecto de la edad del cultivo y fuente de nitrógeno. *Biotec-92*. Santiago de Compostela.
- Fisher, N.S. & Cowdell, R.A. 1982. Growth of marine planktonic diatoms on inorganic and organic nitrogen. *Mar. Biol.* 72: 147-155.
- Flynn, K.J. & Syrett, P.J. 1986. Utilization of L-lysine and L-arginine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.* 90: 159-163.
- Fontes, A.G., Vargas, M.A., Moreno, J., Guerrero, M.G. & Losada, M. 1987. Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. *Biomass* 13: 33-43.
- Fox, R.D. 1986. Integrated village health and energy system, Farende, Tongo. April 4, 1986 letter. Fox, R.D. Algoculture: *Spirulina*, hope for a hungry world. Edisud, Aix-en Provence, France.
- Fried, A., Tietz, A., Ben-Amotz, A. & Eichenberger, W. 1982. Lipid composition of the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil*. *Biochim. Biophys. Acta.* 713: 419-426.
- Gallagher, M. & Brown, W.D. 1975. Composition of San Francisco Bay brine shrimp (*Artemia salina*). *J. Agr. Food Chem.* 23: 630-632.
- Gamallo, Y. 1992. **Cultivo de *Artemia* sp. con microalgas marinas: crecimiento, supervivencia, reproducción y composición bioquímica.** 189 pp. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ganowski, H., Usunova, K. & Karabashev, G. 1975. Effect of the microalga *Scenedesmus acutus* on the digestibility of the mast of calves and on some blood parameters. *Animal Sci.* 12: 74-83.
- Geider, R.J. & Osborne, B.A. 1992. **Algal photo-synthesis. The measurement of algal gas exchange.** 256 pp. Chapman & Hall, Inc. New York.
- Goldenhays, D.J., Walmsley, R.D. & Toerient, D.F. 1985. Laboratory studies on the suitability of a fertiliser-tap water medium for mass culture of algae. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1572-1576.

- Gimmler, H., Wiedemann, C., & Moller, E.M. 1981. The metabolic response of the halotolerant green alga *Dunaliella parva* to hypertonic shocks. *Ber. Deutsh. Bot. Ges.* 94: 613.
- Gnaiger, E. & 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. 1977. Biomass production of marine phytoplankton at varying temperatures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 27: 161.
- Goldman, J.C. 1979a. Outdoor alga-mass cultures. I. Applications. *Water Res.* 13: 1.
- Goldman, J.C. 1979b. Outdoor alga-mass cultures. II. Photosynthetic yield limitations. *Water. Res.* 13: 119-160.
- Goldman, J.C., Yosset, A., Riley, C.B. & Dennett, M.R. 1982. The effect of pH on intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57: 1-13.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J. & McGauhey, P.H. 1959. The biological control of enclosed environment. *Sewage Ind. Wastes*, 31: 1125.
- Goodwin, W.T. 1984. **The Biochemistry of the Carotenoids. vol 2. Animals**, 2nd edn, pp: 224. Chapman and Hall, Inc. New York.
- Grant, B.R. 1968. Effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite assimilation in *Dunaliella tertiolecta*. *J. Gen. Microbiol.* 54: 444-455.
- Greene, B. & Bedell, G.W. 1990. Algal gels or immobilized algae for metal recovery. En: **Introduction to Applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed.), pp: 137-150. SPB Academic Publishing by, The Hague.
- Greenway, H. & 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.
- Grobbelaar, J.U. 1989. Do light/dark cycles of medium frequency enhance phytoplankton productivity?. *J. Appl. Phycol.* 1: 333-340.
- Gross, R., Schöneberger, H., Gross, U. & Lorenzen, H. 1982. The nutritional quality of *Scenedesmus acutus* produced in a semi-industrial plant in Perú. *Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft* 95: 323-327.
- Grotjohann, N. & Kowallik, W. 1989. Influence of blue light on the activity of phosphofructokinase in *Chlorella kessleri*. *Physiol. Plant* 75: 43-46.
- Gudin, C. 1988. Why bother with microalgae?. En: **Algal Biotechnology**. Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. & Christiaen, D. (eds.), pp: 33-40. Elsevier Applied Science Publ. Amsterdam.

- Guerrero, M., Ramos, J.L. & Losada, M. 1982. Photosynthetic production of ammonia. *Experientia* 38: 53.
- Guillard, R.R.L. & Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Gummert, F., Meffert, M.E. & Stratmann, H. 1953. Nonsterile large-scale culture of *Chlorella* in green-house and open air. En: **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**. Burlew, J.S. (ed.), No. 600, p: 160. Carnegie Institution, Washington.
- Güven, K.C., Güvener, B. y Güler, E. 1990. Pharmacological activities of marine algae. En: **Introduction to Applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed.), pp: 67-92. SPB Academic Publishing bv, The Hague.
- Hall, D.O. 1986. The production of biomass: a challenge to our society. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 1-23. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Hammer, K.D. & Eberlein, K. 1981. Parallel experiments with *Thalassiosira rotula* in outdoor plastic tanks; developments of dissolved free amino acids during an algal bloom. *Mar. Chem.* 10: 533-544.
- Harder, R. & Von Witsch, H. 1942. Über Massenkultur von diatomeen. *Ber. Bot. Ges.* 60: 142.
- Haven, D.S. 1965. Supplemental feeding of oysters with starch. *Chesapeake Sci.* 6: 43-51.
- Henderson, R.J. & Sargent, J.R. 1989. Lipid composition and biosynthesis in ageing cultures of the marine cryptomonad, *Chroomonas salina*. *Phytochemistry* 28: 1355-1361.
- Henrickson, R. 1989. (ed.). **Earth Food Spirulina**. 180 pp. Ronore Enterprises, Inc. Laguna Beach, California.
- Hernández, I.T. & Shimada, A.S. 1978. Estudios sobre el valor nutritivo del alga espirulina (*Spirulina maxima*). *Arch. Latinoam. Nutr.* 28: 196-207.
- Herrero, C., Abalde, J. & Fábregas, J. 1993. Nutritional properties of four marine microalgae for albino rats. *J. Appl. Phycol.* 5: 573-580.
- Herrero, C., Cid, A., Fábregas, J. & 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., López-Muñoz, I., Fidalgo, J.P. & Cid, A. 1991. Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Tetraselmis suecica* cultivada con diferentes intensidades de luz. XIII Congr. Nac. Microbiol. Salamanca 1991.
- Hintz, H.F. & Heitmann, H. 1967. Sewage-grown algae as a protein supplement for swine. *Animal Prod.* 0: 135-141.
- Hintz, H.F., Heitmann, H., Weir, W.C., Torell, D.T. & Meyer, J.H. 1966. Nutritive value of algae grown on sewage. *J. Animal Sci.* 25: 675-681.

- Hirayama, K., Takagi, K. & Kimura, H. 1979. Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 45: 11-16.
- Hollibaugh, J.T., Seibert, D.L.R. & Thomas, W.H. 1981. Observations on the survival and germination of resting spores of three *Chaetoceros* (*Bacillariophyceae*) species. *F. Phycol.* 17: 1-9.
- Hoppe, H.A. 1979. Marine algae and their products and constituents in pharmacy. En: **Marine Algae in Pharmaceutical Science**. Hoppe, H.A., Levring, T. and Tanaka, Y. (eds.), pp: 25. Walter de Gruyter, Berlín.
- Howell, B.R. 1979. Experiments on the rearing of larval trout, *Scophthalmus maximum*. *Aquaculture* 18: 215-225.
- Hundley, J.M. & Ing, R.B. 1956. Algae as sources of lysine and threonine in supplementing wheat and bread diets. *Science* 124: 536-537.
- Iijima, N., Fujii, I., Shimamatsu, H. & Katoh, S. 1982. Antitumor agent and method of treatment therewith. *US patent, n° P1150-726-A82679*.
- Inouye, I. 1993. Flagella and flagellar apparatuses of algae. En: **Ultrastructure of Microalgae**. Berner, T. (ed.), pp: 99-134. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Proposed Guidelines for Testing of Single Cell Protein Destined as Major Protein Source For Animal Feed, Tech. Rep. N° 12, IUPAC Secretariat, Oxford, 1974.
- James, C.M., Suhair, A.H. & Makkeya, B.A. 1981. Use of chitin derived microbial detritus for the mass culture of *Artemia*. World Conference in Aquaculture (Venice, Italy), September, 21-25.
- Jegerschöld, C. & Styring, S. 1992. Photoinhibition of Cl⁻-depleted Thylakoid Membranes: Effects of Illumination under Anaerobic Conditions. En: **Trends in Photosynthesis Research**. Barber, J., Guerrero, M.G. & Medrano, H. (eds.), pp: 59-70. Intercept, Andover, Hampshire.
- Jensen, T.E. 1993. Cyanobacterial ultrastructure. En: **Ultrastructure of Microalgae**. Berner, T. (ed.), pp: 7-52. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Johnston, H.W. 1970. The biological and economic importance of algae. 3. Edible algae of fresh and brackish waters. *Tuatora* 18: 19-35.
- Jorgensen, J. & Convit, J. 1957. Cultivation of complexes with other freshwater microorganisms in the tropics. En: **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**. Burlow, J.S. (ed.), No. 600, pp. 190-196. Cornege Inst., Washington D.C.
- Juario, J.V. & Storch, V. 1984. Biological evaluation of phytoplankton (*Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp. and *Isochrysis galbana*) as food for milkfish. *Aquaculture* 40: 193-198.

- Kaiser, W.M. & Forster, J. 1989. Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiol.* 91: 970-974.
- Kanazawa, A. 1985. Nutrition of penaeid prawns and shrimps. En: **Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps**. pp: 123-130. Iloilo City, Philippines, 1984.
- Kanazawa, T., Distefano, M. & Bassham, J.A. 1983. Ammonia regulation of intermediary metabolism in photosynthesizing and respiring *Chlorella pyrenoidosa*: comparative effects of methylamine. *Plant Cell Physiol.* 24: 979-986.
- Kaplan, D., Cohen, Z. & Abeliovich, A. 1986a. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* 9: 37-48.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. & Aaronson, S. 1986b. Algal nutrition. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 43-67. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Kawaguchi, K. 1980. Microalgae production system in Asia. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 25-34. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Kofranyi, E. 1978. The nutritional value of green algae *Scenedesmus acutus* for humans. *Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.* 11: 150-160.
- Kofranyi, E. & Jekat, F. 1967. Zur Bestimmung der biologischen Wertigkeit von Nahrungsproteinen. XII. Die Mischung von Ei mit Reis, Mais, Soja, Algen, Hoppe-Seylers. *Z. Physiol. Chem.* 348: 84-88.
- Konopka, A. & 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. En: **Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms**. Senger, H. (ed.), Vol. I, pp: 7-16. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Krishnakumari, M.K., Ramesh, H.P. & Venkataraman, L.V. 1981. Food safety evaluation: acute oral and dermal effects of algae *Scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* on albino rats. *J. Food Prot.* 44: 934-956.
- Ladha, J.K. & Kumar, H.D. 1978. Genetics of blue-green algae. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 53: 355-386.
- Laing, I. 1985. Factors affecting the large-scale production of four species of commercially important marine algae. *Aquaculture* 44: 161-166.
- Laing, I. 1987. The use of artificial diets in rearing bivalve spat. *Aquaculture* 65: 243-249.
- Laing, I. & Ayala, F. 1990. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. En: **Introduction to Applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed.), pp: 447-477. SPB Academic Publishing Bv, The Hague.

- Laing, I. & Gil-Verdugo, C. 1991. Nutritional value of spray-dried *Tetraselmis suecica* for juvenile bivalves. *Aquaculture* 92: 207-218.
- Laing, I. & Jones, E. 1983. Large-scale turbidostat culture of marine microalgae. *Aquacult. Eng.* 2: 203-212.
- Laing, I. & Millican, P.F. 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture* 54: 245-262.
- Langdon, C.J. 1982. New techniques and their application to studies of bivalve nutrition. En: **Proceedings of International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition**. Pruder, G.D., Langdon & Conklin, D. (eds.), pp: 305-320. Louisiana State Univ. Baton Rouge, LA.
- Langdon, C.J. & Waldock, M.J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 61: 431-448.
- Lara, C., Romero, J.M. & Guerrero, M.G. 1987. Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 169: 4376-4378.
- Laws, E.A., Taguchi, S., Hirata, J. & Pang, L. 1986. Continued studies of high algal productivities in a shallow flume. *Biomass* 11: 39-50.
- Laws, E.A., Taguchi, S., Hirata, J. & Pang, L. 1988. Optimization of microalgal production in a shallow flume. *Biotechnol. Bioeng.* B32: 140-147.
- Laws, E.A., Terry, K.L., Wickman, J. & Chalup, M.S. 1983. A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2319-2335.
- Leadbeater, B.S.C. & Green, J. 1993. Cell Coverings of Microalgae. En: **Ultrastructure of Microalgae**. Berner, T. (ed.) pp: 71-90. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Lee, Y.K. 1986. Enclosed bioreactors for the mass cultivation of photosynthetic microorganisms: the future trend. *Trends Biotechnol.* 4: 186-189.
- Lee, S.K., Fox, H.M., Kies, C. & Dam, R. 1967. The supplementary value of algae in human diets. *J. Nutr.* 92: 281-285.
- Lee, Y.K., Tan, H.M. & Hew, C.S. 1985. The effect of growth temperature on the bioenergetics of photosynthetic algal cultures. *Biotech. Bioeng.* 27: 555-561.
- Leftley, J.W. & Syrett, P.J. 1973. Urea and ATP: ure amydolase activity in unicellular algae. *J. Gen. Microbiol.* 77: 109-115.
- Leveille, G.A., Sauberlich, J.W. & Shockley, J.W. 1962. Protein value and the amino acid deficiencies of various algae for growth of rats and chicks. *J. Nutr.* 76: 423-428.
- Lewin, R.A. (ed.). 1976. **The Genetics of Algae**. Blackwell Scientific Pub. Oxford
- Lincoln, E.P. & Earle, J.F.K. 1990. Wastewater treatment with microalgae. En: **Introduction to Applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed.), pp: 429-446. SPB Academic Publishing. The Hague.

- Lincoln, P. & Hill, D.T. 1980. An integrated microalgae system. En: **Algae Biomass**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 229-244. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Lips, S.H. & Avisar, Y.J. 1986. Photosynthesis and ultrastructure in microalgae. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 43-67. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Lipstein, B. & Hurwitz, S. 1980. The nutritional value of algae for poultry. Dried Chlorella in broiler diets. *Br. Poultry Sci.* 21: 9-21.
- Litchfield, J.H. 1983. Single-cell proteins. *Science* 219: 740.
- López-Muñoz, I., Abalde, J. & Herrero, C. 1992a. Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *NACC (Biología)*. 3: 59-65.
- López-Muñoz, I., Cid, A., Fidalgo, J.P. & Herrero, C. 1990. Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes intensidades de luz. *Actas III Congr. Nac. Acuicult.* 657-662.
- López-Muñoz, I., Fidalgo, P., Cid, A. & Herrero, C. 1992b. Tasas de fotosíntesis de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* bajo diferentes condiciones de intensidades de luz y temperatura. *Biotec-92*. Santiago de Compostela.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maeda, S. y Sakaguchi, T. 1990. Accumulation and detoxification of toxic metal elements by algae. En: **Introduction to Applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed.). pp: 109-136. SPB Academic Publishing by, The Hague.
- Maerkl, H. & Mather, M. 1985. Mixing and aeration of shallow open ponds. En: **Production and Use of Microalgae**. Becker, E.W. (ed.), pp: 85-93. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Maldonado, J.M. & Aparicio, P.J. 1987. Phoregulation of nitrate assimilation in eukariotic organisms. En: **Inorganic Nitrogen Metabolism**. Ullrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. & Castillo, F. (eds.), pp: 76-81. Springer-Verlag. Berlin.
- Materassi, R., Paoletti, C., Balloni, W. & Florenzano, G. 1980. Some considerations on the production of lipids substances by microalgae and cyanobacteria. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.) pp: 265. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Mattoo, A.K., Hoffman-Falk, H., Marder, J.B. & Edelman, M. 1984. Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 1380-1384.

- Mattoo, A.K., Marder, J.B. & Edelman, M. 1989. Dynamics of the photosystem II reaction center. *Cell* 56: 241-246.
- McLachlan, J. 1973. Growth media-marine. En: **Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements**. Stein, J.R. (ed.), pp: 25-52. Cambridge University Press, Cambridge.
- Meeting, B. & Rayburn, W.R. 1983. The influence of a microalgal conditioner on selected Washington soils: an empirical study. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47.
- Miao, J.R. 1987. *Spirulina* in Jiangxi China. Academy of Agricultural Science,, Jiangxi province, China. Presented at Soc. Appl. Algology, Lille, France.
- Mihnea, P.E. & Voinescu, I. 1977. Mass production of unicellular algae in outdoor cultures by utilised waste water as a trophic source. *Rech. Mar.* 10: 155-168.
- Millican, P.F. & Helm, M.M. 1994. Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 123: 83-94.
- Mohn, F.H. 1988. Harvesting of microalgal biomass. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp. 395-414. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mokady, S. & Cogan, U. 1988. Nutritional evaluation of a protein concentrate and of carotenes derived from *Dunaliella bardawil*. *J. Sci. Food Agric.* 42: 249-254.
- Mokady, S., Yannai, S., Einav, P. & Berk, Z. 1980. Protein nutritive value of several microalga species for young chickens and rats. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.) pp: 655-660. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Momose, H. & Furuya, A. 1980. New genetic approaches to industrial microorganisms. En: **Molecular Breeding and Genetic of Applied Microorganisms**. Sakaguchi, K. & Okaniski, M. (eds.) pp: 139-153. Academic Press. New York.
- Mortain-Bertrand, A., Descolas-Gros, C. & Jupin, H. 1987. Stimulating effect of light-to-dark transitions on carbon assimilation by a marine diatom. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 112: 11-26.
- Morris, I. 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. En: **Algal Physiology and Biochemistry**. Steward, W.D.P. (ed.), pp: 583-609. Blackwell Scientific Pub. Oxford.
- Muller-Wecker, H. & Kofranyi, E. 1973. Zur Bestimmung der biologischen Wertigkeit von Nahrungsproteinen 18: Einzeller als zusätzliche Nahrungsquelle; Hoppe-Seyler's. *Z. Physiol. Chem.* 354: 1034-1042.
- Muñoz, A. & López Cruz, A. 1992. **Drogas del mar. Sustancias biomédicas de algas marinas**. 171 pp. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela.

- Myklestad, S. & 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.
- Nagasawa, H., Konishi, R., Yamamoto, K. & Ben-Amotz, A. 1989. Effects of beta-carotene-rich algae *Dunaliella* on reproduction and body growth in mice. *In Vivo*, 3: 79-82.
- Narasimha, D.L.O.R., Venkataraman, G.S., Duggal, S.K. & Eggum, O. 1982. Nutritional quality of the blue green alga *Spirulina platensis* Geitler. *J. Sci. Food Agric.* 33: 456-460.
- Nedbal, L., Masojidek, J., Komenda, J., Prásil, O. & Setlik, I. 1990. Three types of Photosystem II photoinactivation. 2. Slow processes. *Photosynthesis Res.* 24: 89-97.
- Neilson, A.H. & Larson, T. 1980. The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiol. Plant.* 48: 542.
- Nesaratnam, S.T., Saleem, B. & Al-Dahar, R. 1986. Indoor cultivation of a marine algae species in a thin layer unit. *Biotechnol. Lett.* 8: 271-276.
- Nichiporovich, A.A., Semenenko, V.E., Vladimirova, M.G. & Spektorov, K.S. 1962. Some principles of intensification of photosynthetic productivity in unicellular algae. *Istvesia Acad. Sci. USSR Ser. Biol.* 2: 163.
- Nigam, B.P., Venkataraman, L.V., Hoffman, N.Q. & Grunewald, T. 1990. Color reductions in food containing microalgae. *J. Food Sci. Technol.* 3: 136-139.
- Nigam, B.P., Venkataraman, L.V., Seibel, L.V., Brummer, W., Seiler, J. M. & Stephan, H. 1985. Addition of algae to wheat bread and wheat extrudates. *Getreide, Mehl und Brot*, 39: 53-56.
- Oh-Hama, T. & Miyachi, S. 1988. *Chlorella*. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 3-26. Cambridge University Press. Cambridge.
- Oswald, W.L. 1963. The high rate pond in waste disposal. *Dev. Ind. Microbiol.* 4: 112-119.
- Oswald, W.J. 1969. Growth characteristic of microalgae in domestic sewage: environmental effects on productivity. Proc. IBM/BP Technical Meeting.
- Oswald, W.J. 1975. Experiences with new pond designs in California. En: **Ponds as a Wasterwater Treatment Alternative**. Gloyna, E.F., Malina, J.F. & Davis, E.M. (eds.), Water Resources Symp. N° 9, University of Texas, Austin.
- Oswald, W.J. 1988. Large-scale algal culture systems (engineering aspects). En: **Microalgal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 357-394, Cambridge University Press. Cambridge.
- Oswald, W.J. & Golueke, C.G. 1960. Biological transformations of solar energy. *Adv. Appl. Microbiol.* 2: 223.
- Oswald, W.J., Golueke, C.G. & Shelef, G. 1965. Closedecological systems. *Proc. Ann. Soc. Civ. Eng.* 91: 23 (N° 4445).

- PAG. 1972. Protein Advisory Group, PAG guideline 12 on the production of single cell protein for human consumption. *PAG Bull* 2: 21.
- PAG 1975. Protein Advisory Group, PAG ad hoc working group meeting on clinical evaluation and acceptable nucleic acid levels of SCP for human consumption. *PAG Bull.*, 5: 17.
- Palmer, F.E., Ballard, K.A. & Taub, F.B. 1975. A continuous culture apparatus for the mass production of algae. *Aquaculture* 6: 319-331.
- Paoletti, M. 1976. Unsaponifiable matter of green and blue-green algal lipids as a factor of biochemical differentiation of their biomasses. 1. total unsaponifiable and hydrocarbon fraction. *Lipids* 11: 258-265.
- Parsons, T. R. & Takahashi, M. 1973. **Biological Oceanographic Processes**. Pergamon Press. Oxford.
- Parsons, T.R., Stephens, K. & Strickland, J.D.H. 1961. On the chemical composition of eleven species of phytoplankters. *J. Fish Res. Bd. Can.* 18: 1001-1016.
- Patrick, R. 1968. The structure of diatom communities on similar conditions. *Ann. Nat.* 102: 173-183.
- Payer, H.D. & Runkel, K.H. 1978. Environmental pollutants in fresh water algae from open-air mass cultures. *Archiv. für Hydrobiologie, Beihefte Ergebnisse der Limnologie.* 11: 184-189.
- Payer, H.D., Pabst, W. & Runkel, K.H. 1980. Review of the nutritional and toxicological properties of the green alga *Scenedesmus obliquus* as a Single Cell Protein. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 787-797. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Percival, E. & Foyle, A.J. 1979. The extracellular polysaccharides of *Porphyridium aeruginum*. *Carbohydrate Res.* 72: 165-176.
- Persoone, G. & Claus, C. 1980. Mass culture of algae: a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 265. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Pesando, D. 1990. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. En: **Introduction to Applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed.), pp: 3-26. SPB Academic Publishing bv. The Hague.
- Pesando, D., Gnassia-Barelli, M. & Gueho, E. 1979. Antifungal properties of some marine algae. En: **Marine Algae in Pharmaceutical Science**. Levring, T. & Tanaka, Y. (eds.). pp: 461-472. Walter de Gruyter, Berlín.
- Piorreck, M., Baasch, K.-H. & Pohl, P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, Lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23: 207-216.

- Pirt, M.W. & Pirt, S.J. 1977. Photosynthetic production of biomass starch by *Chlorella* in a chemostat culture. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 27: 643.
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. & Sporn, M.B. 1981. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 290: 201-208.
- Pourriot, R. 1990. Rotifers-biology. En: **Aquaculture**. vol 1. Barnabé, G. (ed.), pp: 213-231. Ellis Horwood. Chichester, England.
- Powles, S.B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.
- Rajasekaran, T., Somasekaran, T. & Venkataraman, L.V. 1981. Standardized procedures for pilot plant scale. Cultivation of *Spirulina platensis* under Indian conditions. *Arch. Hydrobiol.* 22: 114-126.
- Ramos, J. 1977. Primeras experiencias de cría del lenguado (*Solea solea*). *Inf. Tec. Inst. Inv. Pesq.* 48: 1-16.
- Ramos, J.L., Guerrero, M.G. & Losada, M. 1987. Factors affecting the photoproduction of ammonia from dinitrogen and water by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain ATCC 33047. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 566-571.
- Ramus, J. & Groves, S.T. 1972. Incorporation of sulfat into the capsular polysaccharide of the red *Porphyridium*. *J. Cell. Biol.* 54: 399.
- Raven, J.A. 1988. Limits to growth. En: **Microalgal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 257-287. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reddy, V.R., Reddy, C.V., Varadarajulu, P. & Reddy, G.V. 1978. Utilization of algae protein (*Scenedesmus acutus*) in chicken rations. *Indian Poultry Gazette* 62: 67-70.
- Reeve, M.R. 1963. Growth efficiency in *Artemia* under laboratory conditions. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole.* 125: 133-145.
- Regan, D.L. & Ivancic, N. 1984. Mixed populations of marine microalgae in continuous culture: factors affecting species dominance and biomass productivity. *Biotech. Bioeng.* 26: 1265-1271.
- Richardson, K., Beardall, J. & Raven, J.A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: An analysis of strategies. *New Phytol.* 93: 157-191.
- Richmond, A. 1983. Phototrophic microalgae. En: **Biotechnology**. Dellweg, H. (ed.). vol. 3. pp: 107-143. Verlag Chemie, Florida.
- Richmond, A. 1986a. Cell response to environmental factors. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 69-99. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Richmond, A. 1986b. Outdoor mass cultures of microalgae. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 285-338. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.

- Richmond, A. 1990. Large scale microalgal culture and applications. En: **Progress in Phycological Research**. Round, F.E. & Chapman, D.J. (eds.), pp: 269-330. Biopress Ltd., Bristol.
- Richmond, A. & Becker, E.W. 1986. Technological aspects of mass cultivation. A general outline. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 25-44. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- 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.
- Rodhouse, P.G., Roden, C. & Sommerville-Jacklin, M.E. 1983. Nutritional value of microalgal mass cultures to the oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 32: 11-18.
- Rodríguez, E.G. & Maestrini, S.Y. 1984. Nutrient enrichment of Cabo Frio (Brazil) sea water for phytoplankton mass production. *Hydrobiologia* 111: 49-56.
- Rodríguez, H. & Guerrero, M.G. 1992. Products and uses of cyanobacteria (blue-green algae). En: **Profiles on Biotechnology**. Villa, T.G. & Abalde, J. (eds.), pp: 247-260. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Rolle, I. & Pabst, W. 1980. Über die cholesterinsenkende Wirkung der einzelligen Grünalge *Scenedesmus acutus* 276-3a. *Nutr. Metabolism*, 24: 291-301.
- Romero, J.M. & 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.
- Rowlands, R.T. 1984. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enz. Microbial Technol.* 6: 3-10.
- Ruyters, G. 1984. Effects of blue light on enzymes. En: **Blue Light Effects in Biological Systems**. Senger, H. (ed.), pp: 283-301. Springer-Verlag, Berlin.
- Ryther, J.H., Goldman, J.C., Gifford, E.E., Huguenin, H., Wing, A.S., Clarner, J.P., Williams, L.D. & Lapointe, B.E. 1975. Physical models of integrated wasted recycling: marine polyculture systems. *Aquaculture* 5: 163.
- Samejima, H. & Myers, J. 1958. On the heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Gen. Microbiol.* 18: 107.
- Sandbank, E. & Hopher, B. 1978. The utilization of microalgae as a feed for fish. *Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.* 11: 108-120.
- Sautier, C. & Tremolieres, J. 1975. Food value of Spirulina algae in humans. *J. Ann. Nutr. Aliment.* 30: 517.
- Savins, J.G. 1978. Oil recovery process employing thickened aqueous driving fluid. *Us Patent n° 4 079544*.

- Schanz, F. & Zahler, U. 1981. Prediction of algal growth in batch cultures. *Schweiz. Z. Hydrobiol.* 43: 103-113.
- Schwartz, J., Shklar, G., Reid, S. & Trickler, D. 1988. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. *Nutr. Cancer.* 11: 127.
- Scott, J.M. 1981. The vitamin B₁₂ requirement of the marine rotifer *Brachionus plicatis*. *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 61: 983-994.
- Senger, H. (ed.) 1987. **Blue-light responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms.** Vol. I and II. 169 and 160 pp. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida
- Semenenko, V.E., Vladimirova, M.G., Soglin, L.N., Tauts, M.I., Phillipovskiy, Lu.N., Klyachko-Gurvich, G.L., Kuznetsov, E.D., Kovanova, E.S. & Raijkov, N.I. 1966. Prolonged continuous directed cultivation of algae and physiological and chemical characteristics of the productivity and efficiency of light energy utilization by *Chlorella*. *Upr. Biosynthes.* 128: 136.
- Seshadri, C.V. & Thomas, S. 1979. Mass culture of *Spirulina* using low cost nutrients. *Biotechnol. Lett.* 1: 287-291.
- Setlik, I., Veladimir, S. & Malek, I. 1970. Dual purpose open circulation units for large scale culture of algae in temperate zones. I. Basic design considerations and scheme for pilot plant. *Algological Studies (Trebou)*. 54: 353-386.
- Seymour, E.A. 1980. The effects and control of algal blooms in fish ponds. *Aquaculture*, 19: 55-74.
- Sheffer, M., Fried, A., Gottlieb, H.E., Tietz, A. & Avron, M. 1986. Lipid composition of the plasma-membrane of the halotolerant alga, *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. Acta.* 857: 165-172.
- Shekelle, R.B., Liu, S., Raynor, Jr., Lopper, M., Maliza, C. & Rossof, A.H. 1981. Dietary vitamin A and risk of cancer in the Western Electric study. *Lancet* 8257: 1185-1189.
- Shelef, G., Azov, Y., Moraine, R. & Oron, G. 1980. Algal mass production as an integral part of wastewater treatment and reclamation systems. En: **Algae Biomass. Production and Use.** Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 163-189. Elsevier/ North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Shelef, G., Moraine, R. & Oron, G. 1978. Photosynthetic biomass production from sewage. *Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.* 11: 3-14.
- Shelef, G., Oswald, W.J. & McGauhey, P.H. 1970. Algal reactor for life support systems. *J. Sanit. Eng. Div. Am. Soc. Civ. Eng.* 96(Sa 1), 91.
- Shifrin, N.S. & Chisholm, S.W. 1980. Phytoplankton lipids: environmental influences on production and possible commercial applications. En: **Algae Biomass. Production and Use.** Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 627-646. Elsevier/ North Holland Biomedical Press. Amsterdam.

- Shifrin, N.S. & Chisholm, S.W. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 17: 374-384.
- Shimaya, M., Kanazawa, A. & Kashiwada, K. 1967. Studies on the utilization of marine yeast. I. Culture of *Artemia* and *Daphnia* by marine yeast. *Mem. Fsc. Fish. Kagoshima Univ.* 16: 34-39.
- Sieburth, J.M. 1960. Acrylic acid, an antibiotic principle in *Phaeocystis* blooms in Antarctic waters. *Sciences* 132: 676-677.
- Sieburth, J.M. 1964. Antibacterial substances produced by marine algae. *Devel. Ind. Microbiol.* 5: 124-134.
- Singh, R.N. 1942. The fixation of elementary nitrogen by some of the commonest bluegreen algae from the paddy field soils of the United Provinces and Bihar. *Indian J. Agri. Sci.* 2: 743.
- Smayda, T.J. 1975. Phased cell division in natural populations of the marine diatom *Ditylum brightwellii* and the potential significance of diel phytoplankton behaviour in the sea. *Deep Sea Res.* 22: 161-165.
- Soeder, C.J. 1976. The technical production of microalgae and its prospects for marine aquaculture. En: **Harvesting Polluted Waters**. Devik, O. (ed.), pp: 11, Plenum Press, New York.
- Soeder, C.J. 1980. Massive cultivation of microalgae: results and prospects. *Hydrobiologia* 72: 197-209.
- Soeder, C.J. 1980. The scope of microalgae for food and feed. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 9-20. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Soeder, C.J. 1986. An historical outline of applied algology. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 25-44. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Soeder, C. & Stengel, E. 1974. Physico-chemical factors affecting metabolism and growth rate. En: **Algal Physiology and Biochemistry**. Stewart, W.D. (ed.). University of California Press, Berkeley.
- Soejima, T., Katayama, T. & Simpson, K.L. 1980. International Study on *Artemia* XII. The carotenoid composition of eight geographical strains of *Artemia* and the effect of the diet on the carotenoid composition of *Artemia*. En: **The brine shrimp *Artemia*. vol 2: Physiology, Biochemistry, Molecular Biology**. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (eds.), pp: 636. Universa Press, Wetteren (Belgium).
- Soong, P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. En: **Algae Biomass: Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.), pp: 97-114. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.

- Sorgeloos, P. 1974. The influence of algal food preparation on its nutritional efficiency for *Artemia salina* L. larvae. *Thalassia, Yugoslavia*, 10: 313-320.
- Sorgeloos, P., Baeza-Mesa, M., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Dobbeleir, J., Versichele, D., Lavina, E. & Bernardino, A. 1980. The culture of *Artemia* on ricebran: the conversion of a waste-product into highly nutritive animal protein. *Aquaculture* 21: 393-396.
- Sournia, A. 1974. Circadian periodicities in natural populations of marine phytoplankton. *Adv. mar. Biol.* 12: 325-389.
- Spectoroba, L.V., Goronkova, O.I., Nosova, L.P. & Albiskaya, O.N. 1982. High density culture of marine microalgae: promising items for mariculture. *Aquaculture* 26: 289-302.
- Spoehr, H.A. & Milner, H.W. 1949. The chemical composition of *Chlorella*: effect of environmental conditions. *Plant Physiol.* 24: 120.
- Sriharan, S., Bagga, D. & Sriharan, T.P. 1989. Environmental control of lipids and fatty acid production in the diatom *Navicula saprophila*. *Appl. Biochem. Biotech.* 20/21: 281-291.
- Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. & Holt, J.G. (eds.) 1989. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3: 1710-1806. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Stein, J.R. (ed.). 1973. **Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements**. 448 pp. Cambridge University Press. Cambridge.
- Stitt, M. 1986. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. *Plant Physiol.* 81: 1115-1122.
- Strömngren, T. & Cary, C. 1984. Growth in length of *Mytilus edulis* L. fed on different algal diets. *J. Exp. Biol. Ecol.* 76: 23-34.
- Sukenik, A. & Wahnon, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 97: 61-72.
- Sukenik, A., Zamora, O. & Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 117: 313-326.
- Syrett, P.J. 1987. Nitrogen assimilation by eukaryotic algae. En: **Inorganic Nitrogen Metabolism**. Ullrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. & Castillo, F. (eds.), pp: 25-31. Springer-Verlag. Berlin.
- Tadros, M.G. & Johansen, J.R. 1988. Physiological characterization of six lipid-producing diatoms from the southern United States. *J. Phycol.* 24: 445-452.
- Tamiya, H. 1957. Mass culture of algae. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 8: 309-334.
- Tan Tiu, A., Vaughan, D., Chiles, T. & Bird, K. 1989. Food value of eurytopic microalgae to bivalve larvae of *Cryptopleura costata* (Linnaeus, 1758) *Crassostrea virginica* (Gnehn, 1791) and *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *J. Shell. Res.* 8: 399-405.
- Taylor, F.J.R. 1980. Basic Biological Features of Phytoplankton Cells. En: **The Physiological Ecology of Phytoplankton**. Morris, I. (ed.), pp: 3-56. Blackwell Scientific Pub. Oxford.

- Tedesco, M.A. & Duerr, E.D. 1989. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *J. Appl. Phycol.* 1: 201-209.
- Terlizzi, D.E., Jr. & Karlander, E.P. 1980. Growth of a cocoid nanoplankter (*Eustigmatophyceae*) from the Chesapeake Bay as influenced by light, temperature, salinity and nitrogen source in factorial combination. *J. Phycol.* 16: 364-368.
- Terry, K.L. 1986. Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 988-995.
- Thomas, R.J., Hipkin, C.R. & Syret, P.J. 1976. The interaction of nitrogen assimilation with photosynthesis in nitrogen deficient cells of *Chlorella*. *Planta* 133: 9.
- Thomas, W.H., Seibert, D.L.R., Alden, M., & Edlridge, P. 1984. Cultural requirements, yields and light utilization efficiencies of some present saline algae. En: **Algal Biomass Workshop, University of Colorado, Boulder, Solar Energy Research Institute.**
- Thompson, P.A. & Harrison, P.I. 1992. Effects of nonspecific 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. & Whyte, J.N.C. 1990. Influence of irradiance on fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26: 278-288.
- Thompson, P.A., Guo, M. & Harrison, P.J. 1992. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28: 481-488.
- Tischner, R. & Lorenzen, H. 1979. Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. *Planta* 146: 287.
- Toro, J.E. 1989. The growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two light regimes. *Aquacult. Fish. Management.* 20: 249-254.
- Trotta, P. 1981. A simple and inexpensive system for continuous nonaxenic mass culture of marine microalgae. *Aquaculture* 22: 383-387.
- Ueberchaer, S. & Schulz, L.C.I. 1977. Histopathological results of a multigeneration test with mice fed algae as a SCP source. Israeli-German Workshop. Microalgae, GSF, Munchen Oct. 17-18.
- Ukeles, R. 1980. American experience in the mass culture of microalgae for feeding larvae of the American oyster *Crassostrea virginica*. En: **Algae Biomass: Production and Use.** Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.) pp: 287-306. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Ullrich, W. R. 1987. Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: mechanism and relationship with nitrate metabolism. En: **Inorganic Nitrogen Metabolism.** Ullrich, W. R., Aparicio, P. J., Syrett, P. J. & Castillo, F. (eds.), p: 32-38, Springer-Verlag, Berlin.

- Ullrich, W.R., Larsson, M., Larsson, C.-M., Lesch, S. & Novacky, A. 1984. Ammonium uptake in *Lemma gibba* G1, related membrane potencial changes and inhibition of anion uptake. *Physiol. Plant.* 61: 369-376.
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine 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.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E.-M. & Andersson, B. 1992. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1408-1412.
- Venkataraman, L.V. 1986. Blue-Green Algae as biofertilizer. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.), pp: 455-472. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Venkataraman, L.V. & Nigan, B.P. 1979. Mass culturing of freshwater algae for utilization as a protein source. *Phykos* 18: 83-95.
- Venkataraman, L.V., Becker, E.W. & Khanum, P.M. 1977b. Supplementary value of the proteins of alga *Scenedesmus acutus* to rice, ragi, wheat and peanut proteins. *Nutr. Rep. Int.* 15: 145-155.
- Venkataraman, L.V., Nigan, B.P. & Ramanathan, P.K. 1980. Rural oriented freshwater cultivation and production of algae in India. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. and Soeder, C.J. (eds.) pp: 81-95. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Verischele, D., Leger, P., Lavens, P. & Sorgeloos, P. 1990. The use of *Artemia*. En: **Aquaculture**. vol I. Barnabé, G. (ed.) pp: 246-263. Ellis Horwood. Chichester, England.
- Vieira, A.A.H. & Klaveness, D. 1986. The utilization of organic nitrogen compounds as sole nitrogen source by some freshwater phytoplankton. *Nord. J. Bot.* 6: 93-97.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. & Garland, C.D. 1989. Fatty acids and lipid composition of ten species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240.
- Von Henting, R. 1971. Einflub von Salzgehalt und Temperatur auf Entwicklung, Wachstum, Fortpflanzung und Energiebalanz von *Artemia salina*. *Mar. Biol.* 9: 145-182.
- Vonshak, J.B. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.) pp: 117-145. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Vonshak, A. 1987. Strain selection of *Spirulina* suitable for mass production. *Hydrobiologia* 151/152: 75-7.

- Vonshak, A. & Guy, R. 1988. Photoinhibition as a limiting factor in outdoor cultivation of *Spirulina platensis*. En: **Algal Biotechnology**. Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. & Cristiaen, D. (eds.), pp: 365-370. Elsevier Applied Science Pub., London.
- Waldock, M.J. & Nascimento, I.A. 1979. The triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different diets. *Mar. Biol. Lett.* 1: 77-86.
- Warburg, O. 1919. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlenzuretzung in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* 100: 230.
- Watanabe, I. 1984. Use of symbiotic and free-living blue-green algae in rice culture. *Outlook of Agriculture*, 13: 166-172.
- Watanabe, A., Nishigaki, S. & Konoshi, O. 1951. Effect of nitrogen fixing bluegreen algae on the growth of rice plants. *Nature* 168: 748.
- Wear, R.G. & Haslett, S.J. 1986. Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia* from Lake Grassmere, New Zealand. 1. Growth and mortality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 98: 153-166.
- Wear, R.G., Haslett, S.J. & Alexander, N.L. 1986. Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* Kellog from Lake Grassmere, New Zealand. 2. Maturation, fecundity and generation times. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 98: 176-183.
- Webb, K.L. & Chu, F.L.E. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: **Proceeding of 2nd International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approach to Shellfish Nutrition**. Pruder, G.D., Langdon, C. & Conklin, D. (eds.), pp: 272-291. Louisiana State University, Baton Touge, LA.
- Whately, J.M. 1993. Chloroplast ultrastructure. En: **Ultrastructure of Microalgae**. Berner, T. (ed.), pp: 135-204. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Wheeler, P.A., North, B.B. & Stephens, G.C. 1974. Aminoacid uptake by marine phytoplankters. *Limnol. Oceanogr.* 19: 249.
- Whitelam, G.C. & Codd, G.A. 1983. Photoinactivation of *Microcystis aeruginosa* ribulose 1,5-biphosphate carboxylase: effects of endogenous and added sensitizers and the role of oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.* 16: 269.
- Wiedeman, V.E., Walne, P.R. & Trainor, F.R. 1964. A new technique for obtaining axenic cultures of algae. *Can. J. Bot.* 42: 958-959.
- 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., Twarog, J.W., Jr. & Ukeles, R. 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.* 167: 251-263.

- Wikstrom, P., Szwajcer, E., Brodelius, P., Nilsson, K.N. & Mosbach, K. 1982. Formation of alphaketo acids from amino acids using immobilized bacteria and algae. *Biotech. Lett.* 4: 153.
- 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.
- Winter, J.E. 1978. A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* 13: 1-3.
- Witt, U., Koske, P.H., Kuhlmann, D., Lenz, J. & 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. & 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.
- Wynne, D. & Rhee, G.Y. 1988. Changes in alkaline phosphatase activity and phosphate uptake in P-limited phytoplankton, induced by light intensity and spectral quality. *Hydrobiologia* 160: 173-178.
- Yamaguchi, T. 1981. Strong deodorant. *Japanese Patent* 79 JP-116131.
- Yannai, S. & Mokady, S. 1985. Short-term and multi-generation toxicity test of algae grown in wastewater as a source of protein in growing rats with special regard to the nutritive value. *Br. J. Nutr.* 30: 411-424.
- Yap, T.N., Wu, J.F., Pond, W.G. & Krook, L. 1982. Feasibility of feeding *Spirulina maxima*, *Arthrospira platensis* or *Chlorella* sp. to pigs weaned to a dry diet at 4 to 8 days of age. *Nutr. Rep. Int.* 25: 543-552.
- Yoshida, R. 1977. *Spirulina* hydrolysates for cosmetic packs. *Japan, Kokai* 77 31,836.
- Yúfera, M. & Lubián, L.M. 1990. Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. En: **Introduction to Applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed.), pp: 209-227. SPB Academic Publishing bv. The Hague.

Julio Abalde Alonso es Profesor Titular; Ángeles Cid Blanco es Ayudante de Universidad; Pablo Fidalgo Paredes ha obtenido su grado de Doctor por la Universidad de La Coruña; Enrique Torres Vaamonde es Becario de FPI y Concepción Herrero López es Catedrática de Microbiología. Constituyen el grupo de investigación de Microbiología Marina del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Coruña.

Han realizado diversos proyectos de investigación financiados por la DGICYT, Plan Nacional de I+D y Xunta de Galicia.

Igualmente han sido invitados a dictar conferencias, participar en workshops e impartir cursos en distintos centros y universidades como son Universidad de Santiago, Universidad de Málaga, Instituto Politécnico Nacional (México) y Centro Nacional de Investigaciones Científicas (Cuba).

Los resultados de sus trabajos han sido publicados en diversos libros y artículos científicos en revistas nacionales e internacionales, como *Aquaculture*, *Aquatic Toxicology*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *Journal of General and Applied Microbiology* y *Journal of Applied Phycology* entre otras.