

Programa de Estudios de Posgrado

**Evaluación de un sistema de producción continua de  
microalgas.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación Acuicultura)

p r e s e n t a

**Biól. Salvador Acosta Galindo**

**La Paz, B.C.S. Diciembre 2006**

## RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó un sistema de producción continua de microalgas (*Isochrysis galbana*) instalado en un laboratorio a temperatura estable (22 °C), con iluminación artificial ( $183.2 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y control manual y automatizado de pH. Este sistema estuvo compuesto por nueve reactores cilíndricos (180 cm de altura x 40 cm de diámetro) de 200L de capacidad individual, construidos con bolsas de polietileno de calibre 600 contenidas en una estructura de malla de acero recubierta de plástico. Los reactores recibían agua de mar pasteurizada de manera continua conteniendo un medio de cultivo. Se evaluó la eficiencia del pasteurizador como medio para la eliminación o reducción de bacterias heterótrofas marinas y TCBS+. Se definió experimentalmente el procedimiento mas adecuado para la producción de inóculos, que permitiera obtener la mayor concentración celular posible con la menor concentración de bacterias heterótrofas marinas y TCBS+. Esto se logró, probando durante 12 días, cinco protocolos de diferentes factores de dilución, tamaño y tipo de contenedores, pero con los periodos de cada etapa similares (3 días). Posteriormente, se determinó el efecto combinado de la tasa de recambio diario (10, 20 y 40 %) y la concentración del inóculo ( $8.3 \times 10^6$ ,  $8.9 \times 10^6$  y  $10.5 \times 10^6$  cél/mL) sobre la vida útil de los reactores (días efectivos de producción), la concentración celular promedio, la producción de células diaria y total, el volumen de cultivo total cosechado, la carga bacteriana de heterótrofas marinas y TCBS+, el contenido bioquímico (proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos) y el perfil de ácidos grasos de las microalgas. Finalmente se comparó el rendimiento empleando dos medios de cultivo f/2 vs. Enhance Algae a una tasa de recambio diario del 40%, tomando en consideración las variables mencionadas.

El pasteurizador tuvo una eficiencia del 94.8 % en la eliminación de heterótrofas marinas y 100% de bacterias TCBS+. El mejor resultado en la producción de inóculos se obtuvo en los protocolos con factores de dilución 1:10:10:10, en bolsas de polietileno y garrafones de 5,000 mL esterilizados en horno de microondas durante 20 min. En la fase de reactores, se encontró que la concentración del inóculo es determinante en la vida útil de los reactores y en la concentración celular, lo cual afectó positivamente el total de células y el volumen de cultivo cosechados. La cantidad de células inoculadas por reactor no tuvo un efecto sobre el rendimiento. Además se encontró que los reactores operados a la mayor tasa de recambio diario (40%), tuvieron la mayor vida útil y la mayor producción de células y volumen de cultivo, a pesar de la menor concentración celular registrada. Esto se debió a que la diferencia en el volumen cosechado tuvo mayor impacto sobre el rendimiento celular, que las diferencias de concentración entre tratamientos. Se observó una tendencia al decremento en la concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos conforme

se elevó la tasa de recambio diario, pero se obtuvo la tendencia opuesta en las concentraciones de ácidos grasos esenciales eicosapentanoico (EPA) (20:5 n3) y docosahexanoico (DHA) (22:6 n3). No se encontraron bacterias TCBS+ y no hubo un efecto de la tasa de recambio diario sobre las concentraciones de heterótrofas marinas. Se registró un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la concentración celular con medio Enhance Algae vs. f/2, lo cual impactó positivamente sobre la producción de células diarias y totales. No hubo diferencias significativas en los promedios de concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos ( $P > 0.05$ ), aunque se observó una mayor concentración promedio de proteínas en f/2 que en Enhance Algae. Las concentraciones de EPA y DHA en Enhance Algae, fueron mas elevadas que en f/2 aunque estas diferencias no fueron significativas ( $P > 0.05$ ).

Con estos resultados se concluye que el sistema de producción continua de microalgas es capaz de producir un total de  $5.9 \times 10^{12}$  células y 780 L de cultivo por reactor, libre de bacterias TCBS+, con  $9.8 \times 10^5$  UFC/mL de heterótrofas marinas, y a una concentración de  $7.6 \times 10^6$  cél/mL en 19 días. Para ello es necesario partir de inóculos a alta densidad  $\geq 10.5 \times 10^6$  cel/mL, a una tasa de recambio diario de 40%, pH menor a 8.6, 33 ups de salinidad y 24-26 °C de temperatura. El sistema evaluado es una alternativa para la producción masiva de microalgas.

## ABSTRACT

In this work, a continuous culture system was evaluated, using the microalgae *Isochrysis galbana*. The system was installed in a temperature controlled room, with constant illumination ( $183.2 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) and a manual or automatic control of pH. This system consisted of nine 200 L reactors (180 cm high x 40 cm diameter) made with a polyethylene bag inserted in a cylindrical frame made of vinyl-coated steel netting (1.5" square mesh). Each reactor received a constant flow of pasteurized sea water containing a nutrient medium. The efficiency of the pasteurizer as a means for controlling heterotrophic and TCBS+ bacteria was measured. Five known protocols used for the production of *I. galbana* inoculums, were tested during 12 days. The combined effect of the daily rate of water exchange (10, 20 and 40%) and the concentration of the inoculum ( $8.3 \times 10^6$ ,  $8.9 \times 10^6$  and  $10.5 \times 10^6$  cell/mL) was tested by means of the number of harvest days, the mean cellular concentrations, the daily and total production of cells and volume, the bacterial loads in 2216 and TCBS agar media, the biochemical content (proteins, carbohydrates, lipids and triglycerides) and the fatty acid profile of the cells. Finally, the same parameters were measured to compare the effect of f/2 vs. Enhance Algae media at 40% daily rate of water exchange.

Results indicate that the pasteurizer has a 94.8 and 100% efficiency for heterotrophic and TCBS+ bacteria removal respectively. The best protocol for the production of *I. galbana* inoculums were those that followed a dilution factor of 1:10:10:10, in 5,000 mL polyethylene bags and plastic bottles, sterilized in a domestic microwave oven for 20 min. On test, it was found that the concentration of the inoculum was the key factor producing a longer harvest life of the reactors and higher cell concentrations, resulting in higher cell and volume yields. The quantity of cells inoculated per reactor, did not have an effect on yields. In addition it was found that a higher yield in terms of the harvest life of the reactor and of the cells and volume harvested was obtained at the highest rate of water exchange tested (40%), regardless the lowest cell concentrations found. The difference of the harvest volume, had a higher impact over the cell yield than the differences in cell concentrations. The biochemical content of the cells was reduced at higher water exchange rates. However the opposite tendency was observed in the concentrations of essential fatty acids *i.e.* eicosapentanoic acid (EPA)(20:5 n3) and docosahexanoic acid (DHA) (22:6 n3). TCBS+ bacteria were never found in the experiments and there was no effect of the rate of water exchange on the concentrations of heterotrophic bacteria. A significant effect ( $P < 0.05$ ) of Enhance Algae medium over f/2 medium was detected on cell concentrations, which positively affected the daily and total production of cells. There was no significant difference in the average values of proteins, carbohydrates, lipids and triglycerides ( $P > 0.05$ ) of cells grown at different media. However, a higher protein concentrations was observed in the f/2 medium. No significant differences ( $P > 0.05$ ) of EPA and DHA were obtained at both media.

It was concluded that the continuous culture system tested is capable of producing  $5.9 \times 10^{12}$  cells and 780 L per reactor of TCBS+ free culture at a cell concentration of  $7.6 \times 10^6$  cells/mL and  $9.8 \times 10^5$  UFC/mL of heterotrophic bacteria in 19 days. In order to achieve these results a highly concentrated ( $\geq 10.5 \times 10^6$  cell/mL) inoculum must be used, as well as a 40% rate of water exchange, a pH lower than 8.6, 33 psu salinity, and 24-26 °C. The continuous flow system evaluated, represents a good alternative for mass production of microalgae.

## DEDICATORIA

*Este paso más en la vida se lo dedico a mis padres por haberme educado con un  
instinto de superación.*

*A mis hermanos Neto, Edgar y Manuel por haberme apoyado toda la vida y sobre todo  
por ser mis mejores amigos.*

*A toda mi familia; a mis demás hermanos y hermanas, que aunque están lejos me han  
apoyado con sus palabras de aliento.*

*A Triny, gracias por tu comprensión y apoyo en todo momento.*

*A todos ellos: ¡Gracias!*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por haberme brindado las condiciones para la realización de éste trabajo y por haberme otorgado una beca que me permitió concluir mi tesis.

Mi agradecimiento a mi director de tesis Dr. Alfonso N. Maeda Martínez y a los miembros de mi comité tutorial Dra. María Concepción Lora Vilchis y M.C. María Teresa Sicard González, por sus atinados comentarios y consejos respecto a la realización de este trabajo. Sinceramente gracias.

A Minerva, por su apoyo en todo el trabajo técnico y sobre todo por brindarme su amistad estando lejos de casa. Por tus consejos y amistad: gracias.

A los M. en C. Armando Monge y Armando López, por la ayuda brindada durante los experimentos, y principalmente por su amistad.

A la Biól. Minerva Cerro Zepeda y Marte Félix Virgen por capacitarme y apoyarme en el manejo de las cepas y en la preparación de los inóculos.

A la Dra. Bertha Olivia Arredondo por sus aportaciones, críticas y comentarios a este manuscrito.

Agradezco a los responsables y al personal de los siguientes laboratorios del CIBNOR: Ecofisiología de Organismos Acuáticos, M. en C. Armando Monge Quevedo; Biotecnología de Microalgas: M. en C. Laura Carreón; Bioquímica Fisiológica: M. en C. Roberto Hernández y Daniel Ceceña; Pigmentos y Plancton: Francisco Hernández; Microalgas: Biól. Cinthya Aldana Avilés, Adriana

Green Yeen y Julián Garzón Favela; Diagnóstico microbiológico: M. C. Norma Angélica Ochoa Álvarez y Aux. H.B. María Sofía Ramos Galván.

El presente estudio se realizó con fondos de los proyectos SEP-CONACYT G33593-B, SAGARPA-CONACYT 11947 y el proyecto interno CIBNOR AC-4.3.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sistema de producción continua de microalgas. Se muestra la disposición de los reactores de 200L, para aprovechar la iluminación de un solo foco de 400 Watts para cuatro reactores.....**20**
- Figura 2. Irradiancia emitida por un foco de vapor de mercurio de 400w a un reactor de cultivo continuo de microalgas de 200L de capacidad.....**21**
- Figura 3. Detalle de la parte superior de un reactor, en donde se muestra el tubo puerto donde se inserta la manguera de alimentación y por donde sale el aire.....**22**
- Figura 4. Sistema de pasteurización de agua de mar. a) tanque de almacenamiento de agua de mar; b) Intercambiador de placas de titanio, c) Boiler; d) Sistema de protección para evitar el paso del agua a la temperatura no deseada.....**23**
- Figura 5. Mezclador de medio de cultivo fabricado con un refrigerante de vidrio. La flecha blanca señala la “T” por donde se inyectó el medio de cultivo a la línea. Las flechas negras indican el sentido del flujo del agua de mar.....**24**
- Figura 6. Detalle fotográfico del sistema de producción continua de microalgas donde se muestra el tubo distribuidor de agua de mar con medio de cultivo hacia los reactores.....**25**
- Figura 7. Fotografía que muestra el sitio de inserción de la línea de aireación.....**26**
- Figura 8. Distribuidor de las líneas de aire a los reactores, en donde ocurre la mezcla de aire y bióxido de carbono.....**29**
- Figura 9. Sistema de válvulas que permite tratar con agua caliente los tubos y mangueras del sistema de producción continua de microalgas para su limpieza. Se muestra la caja del sistema de seguridad y el pozo de acero inoxidable donde se

insertan los sensores de este sistema y del termómetro digital.....**29**

Figura 10. Protocolos ensayados para la producción de inóculos de *Isochrysis galbana*, para un sistema de producción continua de microalgas. Se muestran los factores de dilución entre etapas de cada uno de los experimentos.....**31**

Figura 11. Algunas de las fases ensayadas en la definición del protocolo para la producción de inóculos de *Isochrysis galbana*. a) Cepas no axénicas en el cepario del CIBNOR; b) Filtro de aire en línea tipo Sweenex; c) Fase de 1,000 mL; d) Fase de bolsa 5,000 mL; e) Fase de garrafón 5,000 mL; f) Fase de bolsa 30,000 mL. ....**33**

Figura 12. Variación en las concentraciones celulares de *Isochrysis galbana* durante la fase de inóculos en los experimentos 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), y 5 (e).....**46**

Figura 13. Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre la vida útil de los reactores de flujo continuo en la producción de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). ND = no determinado.....**52**

Figura 14. Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre la concentración celular promedio de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). ND = no determinado.....**53**

Figura 15. Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre la concentración celular promedio de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras

mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). ND = no determinado.....54

Figura 16. Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre el volumen de cultivo cosechado de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ . ND = no determinado.....56

Figura 17. Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre el total de células cosechadas de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n = 3$ . ND = no determinado.....57

Figura 18. Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre las concentraciones de heterótrofas marinas en los cultivos cosechados de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n = 3$ . ND = no determinado. ....59

Figura 19. Variación de temperatura en los cultivos de *Isochrysis galbana*, registrada con termógrafos digitales dentro de los reactores, a tres tasas de recambio diario.....60

- Figura 20. Registro de pH a lo largo del cultivo continuo de *Isochrysis galbana* en el experimento  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo.....**60**
- Figura 21. Variación en el contenido de proteínas (a), carbohidratos (b), lípidos (c) y triglicéridos (d) de *Isochrysis galbana* del experimento  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo, cultivada en el sistema de flujo continuo a tres tasas de recambio diario: 10% (▲—▲), 20% (●--●) y 40 % (■—■).....**62**
- Figura 22. Efecto del medio de cultivo (f/2 y Enhance Algae), sobre la vida útil de los reactores, la concentración promedio y la producción promedio diaria de *Isochrysis galbana* a una tasa de recambio diario del 40%. Letras minúsculas entre medios de cultivo indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).....**67**
- Figura 23. Efecto del medio de cultivo (f/2 y Enhance Algae), sobre el total de células cosechadas, el volumen cosechado y la concentración de heterótrofas marinas en los cultivos de *Isochrysis galbana*, a una tasa de recambio diario del 40%. Letras minúsculas entre medios de cultivo indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).....**68**
- Figura 24. Variación en el contenido de proteínas (a), carbohidratos (b), lípidos (c) y triglicéridos (d) de *Isochrysis galbana*, cultivada en el sistema de flujo continuo de agua de mar enriquecida con los medios f/2 (▲—▲ ) y Enhance Algae (●---●).....**70**
- Figura 25. Fotografías del interior de un boiler de uso doméstico usado para calentar el agua de un pasteurizador durante mas de un año en el CIBNOR. a). Se aprecia el recubrimiento anticorrosivo de la porcelana y en la parte inferior b), se muestra el interior del boiler con sus dos resistencias.....**76**

## LISTA DE TABLAS

- Tabla I. Especies de microalgas más utilizadas en acuicultura marina debido a su alto valor nutritivo y digestibilidad, además de su capacidad para crecer en cultivos masivos. La duración del ciclo celular como los requerimientos de temperatura son susceptibles de variación mediante selección de variedades (Coll-Morales, 1983).....**13**
- Tabla II. Células inoculadas por reactor en los experimentos sobre el efecto combinado de concentración de inóculo y de tasa de recambio diario sobre el rendimiento y la calidad de *Isochrysis galbana*.....**35**
- Tabla III. Eficiencia del pasteurizador como un medio para la eliminación o reducción de bacterias heterótrofas marinas y de bacterias TCBS +. El experimento fue realizado el 23/08/2004, en el sistema de abastecimiento de agua de mar del laboratorio de ecofisiología de organismos acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n = 3$ .....**44**
- Tabla IV. Células y volumen totales producidos y concentraciones celulares ( $\times 10^6$ ) al final de cada etapa de cultivo de *Isochrysis galbana* durante la fase de inóculo, en 5 protocolos experimentales. Letras distintas entre filas de la columna células producidas y de las concentraciones finales (sombreadas) de los cinco experimentos, indican diferencias significativas  $P < 0.05$ . Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar  $n=3$ .....**47**
- Tabla V. Concentración de bacterias heterótrofas marinas (UFC/mL  $\times 10^3$ ) al final de cada etapa de cultivo de *Isochrysis galbana* durante la fase de inóculo en 5 experimentos. No hubo diferencias significativas entre concentraciones bacterianas al final de los experimentos (sombreadas). Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar  $n=3$ .....**47**

- Tabla VI. Días efectivos de cosecha, concentración celular promedio y producción diaria y total de microalgas (*Isochrysis galbana*) en reactores de flujo continuo con medio f/2, a tres tasas de recambio diario partiendo de una concentración inicial de  $8.3 \times 10^6$  cél/mL. Además se muestran las concentraciones bacterianas promedio de heterótrofas marinas cultivadas en medio 2216. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .....**49**
- Tabla VII. Días efectivos de cosecha, concentración celular promedio y producción diaria y total de microalgas (*Isochrysis galbana*) en reactores de flujo continuo con medio f/2, a tres tasas de recambio diario partiendo de una concentración inicial de  $8.9 \times 10^6$  cél/mL. Además se muestran las concentraciones bacterianas promedio de heterótrofas marinas cultivadas en medio 2216. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .....**50**
- Tabla VIII. Días efectivos de cosecha, concentración celular promedio y producción diaria y total de microalgas (*Isochrysis galbana*) en reactores de flujo continuo con medio f/2, a tres tasas de recambio diario partiendo de una concentración inicial de  $10.5 \times 10^6$  cél/mL. Además se muestran las concentraciones bacterianas promedio de heterótrofas marinas cultivadas en medio 2216. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .....**51**
- Tabla IX. Concentración promedio de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos de *Isochrysis galbana* cosechadas durante la vida útil de los reactores del tratamiento  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo, a tres tasas de recambio diario, usando el f/2 como medio de cultivo. Letras diferentes entre filas en una misma columna, indican diferencia significativa  $P < 0.05$ . Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .....**61**

- Tabla X. Perfil de ácidos grasos de *Isochrysis galbana* cultivada en reactores de flujo continuo del tratamiento  $8.9 \times 10^6$  de inóculo, a tres tasas de recambio diario. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores de concentración (mg/g) son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .....64
- Tabla XI. Días efectivos de cosecha, concentración celular promedio y producción diaria y total de microalgas (*Isochrysis galbana*) en reactores de flujo continuo a 40% de tasa de recambio diario y  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo, con f/2 y Enhance Algae como medios de cultivo. Además se muestran las concentraciones bacterianas promedio de heterótrofas marinas cultivadas en medio 2216. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .....66
- Tabla XII. Concentración promedio de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos de *Isochrysis galbana* cosechadas durante la vida útil de los reactores de flujo continuo al 40% de tasa de recambio diario, empleando f/2 y Enhance Algae como medios de cultivo. Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .....71
- Tabla XIII. Perfil de ácidos grasos obtenidos de la microalga *Isochrysis galbana* cultivada en reactores de flujo continuo de 200L de capacidad, a 1 nivel de recambio (40%) y dos nutrientes (Medio f/2 de Guillard y Enhance algae). Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores expresados en mg/g son la media  $\pm$  la desviación estándar  $n=3$ .....72
- Tabla XIV. Comparación del rendimiento del sistema “Seacaps” reportado por McKeon, (1984) contra el obtenido en el presente trabajo.....74

## CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>9</b>
4.1 Generalidades de las microalgas .....	9
4.2 Taxonomía de la especie utilizada .....	11
4.3 Descripción de la especie .....	11
4.4 Microalgas más utilizadas en Acuicultura.....	12
4.5 Concepto de producción masiva .....	13
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>I. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 General .....	17
3.2 Particulares .....	17
<b>V. HIPOTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>VI. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>18</b>
6.1 Construcción y operación del sistema.....	19
6.2 Evaluación del pasteurizador para la eliminación de bacterias mesofílicas aerobias y bacterias TCBS+ (Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose agar) .....	28
6.3 Definición del protocolo para la producción de inóculos de <i>Isochrysis</i> <i>galbana</i> .....	29
6.4 Determinación de la tasa de recambio diario y la concentración del inóculo óptimas.....	34
6.4.1 <i>Contenido bioquímico de Isochrysis galbana</i> .....	35
6.5 Efecto comparativo del medio f/2 vs. Enhance Algae sobre el rendimiento y la calidad de <i>Isochrysis galbana</i> .....	42
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
7.1 Evaluación del pasteurizador como medio para la eliminación de bacterias mesofílicas aerobias y bacterias TCBS+.....	44
7.2 Definición del protocolo para la producción de inóculos de <i>Isochrysis</i> <i>galbana</i> .....	44
7.3 Determinación de la tasa de recambio diario y la concentración del inóculo óptimas durante la fase de producción en reactores.....	48
7.3.1 <i>Contenido bioquímico de Isochrysis galbana</i> .....	61
7.4 Efecto comparativo del medio f/2 vs. Enhance Algae sobre el rendimiento y la calidad de <i>Isochrysis galbana</i> .....	65
7.4.1 <i>Contenido bioquímico de Isochrysis galbana, cultivada en medio f/2 y</i> <i>Enhance Algae</i> .....	69
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>73</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>79</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>84</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>96</b>
<b>ANEXO II</b> .....	<b>104</b>
<b>ANEXO III</b> .....	<b>106</b>

## I. INTRODUCCIÓN

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 flujo de energía en las cadenas alimenticias acuáticas más importantes. Específicamente, las microalgas son un componente esencial de la dieta del zooplancton (Soeder, 1976; Persoone y Claus, 1980; Ukeles, 1980; De Pauw y Persoone, 1988), de moluscos bivalvos marinos (ostras, almejas, etc.), de larvas de crustáceos y de algunas especies de peces (tilapia, carpa plateada). Durante sus primeras etapas de desarrollo, estos organismos son micrófagos filtroalimentadores y requieren una dieta de alta calidad nutricia como las microalgas, ya que contienen altas concentraciones de lípidos, proteínas, vitaminas y ácidos grasos de diferentes grados de insaturación, esenciales para el crecimiento y el desarrollo larvario (Brown *et al.*, 1989; Yúfera y Lubián, 1990.).

Por otra parte, las microalgas han despertado el interés de especialistas en diferentes áreas de la ciencia y de la tecnología debido a que presentan rápidos procesos metabólicos y capacidad para multiplicarse, y facilidad de adaptación a diversas condiciones ambientales. Además de su importancia en la acuicultura, las microalgas son usadas para el mejoramiento de suelos y la fijación de nitrógeno atmosférico en la agricultura, para el tratamiento de aguas negras, para la producción de productos químicos de alto valor comercial o para

la producción de biomasa. Estas actividades industriales han sido revisadas y documentadas por Richmond (1986) y Becker (1994).

De las aproximadamente 30,000 especies de microalgas que han sido descritas a nivel mundial, menos de cien han sido estudiadas para fines de acuicultura, y de éstas no más de cuarenta son cultivadas y usadas como alimento en sistemas de producción comercial. Aquí se incluyen *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, y *Chaetoceros calcitrans* (De Pauw y Persoone, 1988). Para cubrir la demanda de los laboratorios es necesario producirlas masivamente (Persoone y Claus, 1980). Existen tres tipos de métodos para el cultivo masivo de microalgas: cultivo discontinuo ("batch"), cultivo semicontinuo y cultivo continuo. En los cultivos discontinuos, la población pasa por las distintas fases de crecimiento (latencia, exponencial y estacionaria) ajustándose generalmente a una función logarítmica (Schanz y Zahler, 1981). Cuando la población alcanza las fases exponencial o estacionaria, el cultivo es cosechado en su totalidad. En estos cultivos, la calidad de las células es variable ya que ocurren cambios fisiológicos en la población a medida que transcurre el tiempo de cultivo, y además se requiere una gran cantidad de mano de obra. Sin embargo, poseen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar los parámetros que inciden en el crecimiento celular.

Con respecto al cultivo semicontinuo, parte del volumen es cosechado al final de la fase exponencial, y el volumen extraído es reemplazado

por medio de cultivo fresco. En un sistema con energía lumínica suficiente, se puede cosechar hasta el 90% del volumen de cultivo tres veces por semana a altas concentraciones celulares (Laing, 1985).

El cultivo continuo es el método de producción más eficiente en términos de mano de obra, y la calidad celular se mantiene estable en la fase de crecimiento exponencial. Se suministra agua de mar tratada y enriquecida con nutrientes de manera continua, y simultáneamente se cosecha por rebosamiento para mantener el crecimiento y la población celular a nivel constante “steady-state” (Abalde *et al.*, 1985). Los primeros cultivos continuos de microalgas se realizaron para la producción de *Phaeodactylum tricornutum* (Ketchum y Redfield, 1938) y para el cultivo masivo de *Chlorella sp.* (Myers y Clark, 1944). Posteriormente, la teoría de los cultivos continuos fue establecida por Monod (1950), elaborada por el grupo de Porton (Herbert *et al.*, 1956) y más tarde descrita y analizada por Droop (1975). Los cultivos continuos pueden ser operados como turbidostatos o como quimiostatos. Laing y Jones (1983) y Reynoso *et al.*, (1990) describen turbidostatos en los que las variaciones en la concentración celular en el reactor, son detectadas con una celda fotoeléctrica que controla a una bomba peristáltica, la cual transferirá medio de cultivo al recipiente si la densidad celular aumenta. Al aumentar el volumen del cultivo, el producto es cosechado por rebosamiento. Los turbidostatos tienen la desventaja de que la producción es variable por el error en la transmisión de luz que llega a la fotocelda como resultado de la adhesión de células a las paredes de los reactores.

Por otro lado, un quimiostato es un dispositivo para el cultivo continuo de microorganismos, controlado por la concentración de un nutriente limitante y la tasa de dilución. Ballard y Taub (1972) describen un sistema que produce altas concentraciones celulares a una tasa de dilución de 25% por día. Palmer *et al.*, (1975) desarrollaron un sistema similar con una dilución de 30% al día. A diferencia de los quimiostatos para bacterias y levaduras, en los quimiostatos para la producción de microalgas las densidades celulares no se controlan regulando el nutriente limitante sino más bien por la tasa de recambio, la cual es uno de los factores críticos porque de ésta depende la estabilidad de la densidad celular dentro del reactor. Un flujo elevado que supere la replicación celular, produciría la dilución del cultivo, mientras que un flujo muy bajo produciría una concentración elevada que mas tarde provocaría la caída del cultivo por el incremento de metabolitos en el medio y una limitación del medio de cultivo. Por lo tanto, la definición de la tasa de dilución es importante para la operación correcta del sistema. Durante los años 80's del siglo pasado, la empresa inglesa Sea Salters LTD desarrolló el quimiostato "Seacaps" (Seasalter Continuous Algal Production Systems), el cual emplea agua marina pasteurizada, en lugar de usar agua químicamente esterilizada con cloro y neutralizada con tiosulfato de sodio (como se hace comúnmente). Este sistema además emplea contenedores desechables con lo que se elimina el lavado de tanques y posibles infecciones de los cultivos. Estos son construidos con bolsas de polietileno tubular soportadas por estructuras cilíndricas de malla de acero recubierta con plástico para evitar la corrosión. El "Seacaps" fue evaluado parcialmente por McKeon (1984), con la

microalga *Skeletonema costatum*, la cual fue empleada como alimento de larvas y juveniles de *Crassostrea gigas* en Guernsey Sea Farms. Mckeon empleó reactores de 350 L de capacidad instalados en un invernadero a 18-22 °C, los cuales recibieron una iluminación combinada de luz solar durante el día y luz blanca fluorescente durante la noche. Los cultivos partieron de inóculos de 11.5 millones de cél/mL, y se empleó un medio de cultivo (Solución C) similar al f/2 (Guillard, 1975). Los resultados indicaron una producción total por reactor de  $4.3 \times 10^{12}$  células de *S. costatum*, y 1,580 L (4.5 veces su volumen) en 17 días de cultivo. Las densidades celulares variaron entre 0.2 y  $10.2 \times 10^6$  cél/mL. A pesar de que este sistema es utilizado en laboratorios comerciales de producción de juveniles de moluscos en todo el mundo ([www.seacaps.com](http://www.seacaps.com)), los fabricantes carecen de información técnica y científica del sistema (John Bayes com. pers.).

Otro factor importante en el cultivo de microalgas es la intensidad lumínica. Una célula microalgal que se encuentre en condiciones limitadas de luz crecerá lentamente pero también puede ocurrir la inhibición del crecimiento cuando la luz es muy intensa (Darley, 1982). En un cultivo, la intensidad lumínica que llega a las células es variable, ya que a medida en que se incrementa la densidad, la penetración de la luz va a disminuir por la sombra producida por las mismas células. Por consiguiente, es necesario proveer una intensidad lumínica óptima que no sea limitante, pero que por su intensidad no inhiba el crecimiento. A pesar de la importancia de este factor, la intensidad lumínica empleada en sistemas de producción masiva no ha sido estandarizada. Por ejemplo, en el turbidostato de

Reynoso *et al.*, (1990), se emplean 4 focos fluorescentes de 40 Watts por cada reactor de 200 L, mientras que Molina *et al.*, (1994) utilizaron focos de 20W en sus cultivos.

Por otra parte, el medio de cultivo es determinante para el crecimiento de los cultivos. Se han desarrollado numerosos medios (Guillard y Ryther, 1962; Stein, 1973; Becker, 1994), como la Solución C empleada por McKeon, (1984) o como el f/2 (Guillard, 1975), el cual es uno de los mas empleados a nivel mundial (Stein, 1973; Reynoso *et al.*, 1990). Estos medios se preparan a partir de reactivos analíticos que pudiesen ser costosos y además, es necesario mantener las soluciones de trabajo (sales y vitaminas) de manera separada antes de ser agregadas al agua de mar en donde se cultivarán las microalgas. Recientemente, la empresa Marine Search de Chile, ha lanzado al mercado un medio de cultivo llamado Enhance Algae, cuya presentación en polvo facilita su preparación, requiriendo únicamente mezclar el polvo en agua de mar tratada antes de ser usado. Adicionalmente, este medio resulta cinco veces mas económico que el f/2 preparado a partir de reactivos analíticos (C. Aldana, com. pers., responsable del laboratorio de microalgas del CIBNOR). Este medio de cultivo aún no se ha evaluado científicamente. Sin embargo, en caso de que este medio resultara adecuado, se habría conseguido un avance considerable en la reducción de costos y en la simplificación de las operaciones de cultivo de microalgas.

Las microalgas son una fuente potencial de contaminación bacteriana a los cultivos larvarios (Sainz-Hernández y Maeda-Martínez, 2005). En invertebrados,

la fase crítica del desarrollo donde los organismos son altamente susceptibles a estas bacterias es la fase larvaria (Luna, 2003). Las bacterias patógenas con mayor virulencia para las larvas de moluscos son las del género *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, las cuales son bacterias mesofílicas aerobias cuyas formas de resistencia toleran una exposición a la temperatura máxima de 54 °C. (Skinner, 1968). Por lo tanto, si se diera un tratamiento térmico igual o superior al mencionado al medio de cultivo, se podrían eliminar estas bacterias y con ello, evitar las infecciones bacterianas por esta vía.

El valor nutritivo de una microalga, puede ser distinto entre las diferentes especies consumidoras, y depende de múltiples factores como el estadio de desarrollo, la digestibilidad y la capacidad de filtración vs. tamaño de la partícula, forma, motilidad, y en gran medida de su contenido bioquímico (proteínas, carbohidratos y lípidos) (Walne, 1970). Es conocido que las larvas de invertebrados carecen de la capacidad de sintetizar *de novo* ciertos ácidos grasos (C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>) y por esta característica se les conoce como ácidos grasos esenciales (Volkman *et al.*, 1989). Se ha encontrado una correlación entre el contenido de dichos ácidos grasos de las microalgas con su valor nutricional (Whyte, 1987). El contenido bioquímico de las microalgas no es constante, y puede variar por las condiciones de luz (Wynne y Rhee, 1986; Molina. *et al.*, 1994) y de la calidad de los nutrientes presentes en el agua (Walne, 1970).

En el presente trabajo se evaluó un sistema de producción continua de microalgas tipo Seacaps a diferentes tasas de recambio diario para encontrar la tasa óptima. El rendimiento del sistema se evaluó con la microalga *Isochrysis galbana*, comparando los medios de cultivo f/2 (Guillard 1975) y Enhance Algae. Además, se evaluó el efecto de la calidad del inóculo sobre el rendimiento y también se estudió la evolución de las concentraciones de bacterias mesofílicas aerobias y de TCBS+ (Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose agar). Finalmente se determinó el contenido bioquímico y el perfil de ácidos grasos de las microalgas cosechadas.

## II. ANTECEDENTES

### **4.1 Generalidades de las microalgas**

Las microalgas son un grupo diversificado de microorganismos fotosintéticos, procariotas y eucariotas, catalizadores del proceso de fijación del CO<sub>2</sub>, convirtiéndolo en materia orgánica. Pese a las grandes diferencias estructurales, fisiológicamente ambos tipos de microalgas, procariotas y eucariotas, son similares y poseen un metabolismo fotosintético similar al de las plantas superiores. Las microalgas, son seres unicelulares muy variados en tamaño y forma, y existen en casi todos los hábitats conocidos. La mayor parte pertenecen a hábitats acuáticos, tanto marinos como dulceacuícolas, aunque algunas viven en tierra. Los mares y océanos contienen enormes cantidades de algas planctónicas, estimándose que el 90% de la fotosíntesis total de la Tierra es realizada por estos vegetales acuáticos. El número de taxones es elevado, se cuentan hasta ahora más de 30,000 especies de microalgas sobrepasando las 10,000 especies de cianofíceas y clorofíceas, representando en la actualidad un recurso prácticamente inexplorado, ya que solamente unas 50 especies han sido estudiadas con detalle desde el punto de vista fisiológico y bioquímico (<http://www.ual.es/personal/jlguil/Investigacion/Composicion.htm>).

El estudio científico de las microalgas comenzó en 1890, cuando el microbiólogo holandés Biejelinçk estableció cultivos puros de una microalga de

agua dulce: *Chlorella vulgaris*. Estos cultivos y otros de otras especies y tipos de microalgas fueron objeto de atención por parte de 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 fotolitotróficas aisladas de las mismas (<http://www.ual.es/personal/jlguil/Investigacion/Composicion.htm>).

En los últimos años, los desarrollos tecnológicos para la producción masiva de microalgas han sido significativos en todo el mundo. Aunque su utilización como fuente de proteínas es actualmente muy controvertida debido principalmente a que los elevados costos de producción de la biomasa microalgal le impiden competir con los alimentos tradicionales. Pueden ser utilizadas en otras aplicaciones como biofertilizantes, en la purificación de aguas residuales, como acondicionadores de suelo y como alimento en acuicultura. Asimismo, se ha puesto de manifiesto la potencialidad 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, así como hidrógeno, hidrocarburos y otros combustibles biológicos. En los últimos años se ha establecido del mismo modo 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 (Brindley, 2002).

## **4.2 Taxonomía de la especie utilizada**

La ubicación del la microalga *Isochrysis galbana*, dentro de las categorías taxonómicas, de acuerdo a la clasificación propuesta por Throndsen (1985), es la siguiente:

**Reino** Vegetal

**Phylum** Chrysophyta

**Clase** Haptophyceae

**Orden** Isochrysydales

**Familia** Isochrysidacea

**Género y especie** *Isochrysis galbana*.

## **4.3 Descripción de la especie**

Son células con forma de pera, y su tamaño va desde las 3 a las 15 micras de diámetro. En condiciones de cultivo, la coloración que presenta va del amarillo al café dorado conforme se incrementa su concentración y tiempo de cultivo. Son células móviles que poseen dos largos flagelos y tienen un haptonema reducido o carecen de él. El haptonema es una proyección especializada que surge cerca de los flagelos y algunos lo utilizan como órgano de fijación. Son microalgas eurihalinas, se desarrollan generalmente a temperaturas que oscilan entre los 24 y 30°C, a una salinidad de 30 ups y un pH

de 7.5 a 8.0. Presenta adaptaciones fisiológicas a diferentes salinidades. Su reproducción es por bipartición. Esta especie es considerada adecuada para ser cultivada debido a su adaptabilidad y resistencia a condiciones ambientales extremas, además de tener una buena aceptación como alimento por parte de los crustáceos, bivalvos y algunas especies de peces marinos y dulceacuícolas (Thronsen, 1985).

#### **4.4 Microalgas más utilizadas en Acuicultura**

Por otra parte, se ha mencionado ya la necesidad de los organismos filtradores por el fitoplancton como dieta única o principal durante toda su vida y es por éste motivo que varios autores se han dedicado a reunir información sobre las microalgas más utilizadas o efectivas, como es el caso de Brown *et al.*, (1989). Como resultado de lo anterior, se ha encontrado que la haptofita *Isochrysis galbana* es probablemente la especie más ampliamente utilizada en la acuicultura mundial para el cultivo de moluscos (Coutteau y Sorgeloos, 1992) secundada por la microalga *Chaetoceros*, más popular en los laboratorios comerciales mexicanos (Torres-Rodríguez, 1996; Saucedo-Lastra, 2001).

En la Tabla 1 se presentan las características de algunas de las especies de algas unicelulares más utilizadas en acuicultura.

**Tabla 1.** Especies de microalgas más utilizadas en acuicultura marina debido a su alto valor nutritivo y digestibilidad, además de su capacidad para crecer en cultivos masivos. La duración del ciclo celular como los requerimientos de temperatura son susceptibles de variación mediante selección de variedades (Coll-Morales, 1983).

Género	Ciclo	Temperatura óptima	Diámetro medio
<i>Phaeodactylum</i> (diatomea)	10 h	25°C	10.4μ
<i>Skeletonema</i> (diatomea)	13.1 h	18°C	>20μ
<i>Dunaliella</i> (cloroficea)	24 h	16°C	17.8μ
<i>Chlorella</i> (cloroficea)	7.7 h	25°C	5μ
<i>Tetraselmis</i> (cloroficea)	18 h	18°C	18.4μ
<i>Monochrysis</i> (crisoficea)	15.3 h	20–25°C	10μ
<i>Isochrysis</i> (crisoficea)	30.2 h	20°C	10.2μ

#### **4.5 Concepto de producción masiva**

El concepto de producción masiva de microalgas se desarrolló en Alemania durante la II Guerra Mundial, (Harder y Von Witsch, 1942). A partir de 1948, un grupo de científicos del Instituto de Washington establecen los fundamentos científicos del cultivo masivo de *Chlorella* sp. (Burlew, 1953). En esos años y debido a la escasez de las fuentes tradicionales de alimento, los cultivos de microalgas, principalmente de diatomeas, se consideraron como una posible fuente de lípidos y en años siguientes se consideró su uso para la producción de proteínas para consumo humano (Soeder, 1976). Por otro lado, se ha comentado que los altos costos de su producción hacen improbable que esta fuente de biomasa orgánica pueda contribuir de manera directa a la solución del

problema de la escasez de alimentos (Becker, 1994), en especial considerando que la tecnología es muy avanzada para su aplicación a gran escala en los países subdesarrollados, en donde las necesidades de fuentes alternativas de alimentos son mucho mayores. Por este motivo, el uso más común para los cultivos de microalgas es y seguirá siendo durante algún tiempo el de servir como cultivos de apoyo para la acuicultura, en donde los sistemas de producción son en una escala menor y el valor agregado del producto final es mucho más alto (De Pauw y Persoone, 1988).

Paralelamente, en Checoslovaquia Lebedeu y Untenkov en (Malek, 1978) hicieron intentos de cultivo masivo de microalgas. Durante los años 50's, los científicos continuaron investigando sobre las posibilidades del cultivo microalgal a gran escala en Japón, Alemania, Estados Unidos, Israel y Checoslovaquia (Tamiya, 1957; Oswald, 1963; 1969). En los años 60's destacan los trabajos de Setlik *et al.*, (1970) sobre producción masiva de microalgas en Trebon (República Checa). En esa misma década se desarrollaron sistemas cerrados para cultivar *Chlorella* con altos rendimientos en misiones espaciales (Nichiporovich *et al.*, 1962; Semenenko *et al.*, 1966). Durante los 70's, Ryther *et al.*, (1975) desarrollaron sistemas de tratamiento de aguas residuales en agua de mar, a base de cultivos microalgales como alimento de moluscos (Goldman, 1979). En los años 80's se establecen numerosas industrias orientadas principalmente a la producción masiva de especies de agua dulce que podrían servir como suplemento alimenticio o para el tratamiento de aguas residuales. En Asia por ejemplo, existen actualmente fábricas cuya producción excede los 1,000 Kg de

*Chlorella* seca por mes. Sobre esto, Richmond (1990) menciona que el sistema de producción de *Spirulina* en el evaporador de la compañía SOSA TEXCOCO del lago de Texcoco, ubicó a México por varios años como el país productor más importante a nivel mundial de esta microalga.

La producción masiva de microalgas se orientó mas tarde hacia las especies marinas, para alimentar moluscos, crustáceos y peces bajo cultivo (Ukeles, 1980). Sin embargo, mucha atención se prestó hacia la calidad nutricional de las microalgas (Lichfield, 1983), y no hacia la optimización de los procesos de producción. Actualmente los costos de producción microalgal son tan elevados que las microalgas no pueden competir con los alimentos tradicionales (Behr y Soeder, 1981).

Hoy en día, la producción de microalgas en grandes volúmenes es una de las actividades que ocupan el mayor porcentaje de los gastos de operación en los laboratorios de los larvicultores, llegando a constituir más del 30% - 35% del costo total de producción de las especies cultivadas (Lango-Alemán, 1999). A pesar de varios intentos de reemplazar el alimento vivo con productos inertes como microencapsulados o microalgas conservadas o preservadas, éstos no han tenido éxito dado que éstas dietas no tienen en general una buena aceptación por parte de los organismos y además porque el alimento artificial o inerte no mantiene su flotabilidad en la columna de agua, acarreando como consecuencia pérdidas de alimento y un aumento del sustrato disponible para el crecimiento de bacterias oportunistas, varias de las cuales son potencialmente patógenas (Coutteau y Sorgeloos, 1992).

Con la finalidad de reducir al máximo los gastos y altos costos de producción masiva, muchos acuicultores optan por ubicar al exterior los cultivos de mayores dimensiones y mantenerlos bajo condiciones naturales en invernaderos o directamente a la intemperie. Estos cultivos, que son los cosechados para usarlos como alimento para las larvas, presentan las desventajas de que deben ser investigados con detenimiento en lo que se refiere a sus composiciones y densidades, ya que los cambios climáticos y las diferencias en la cantidad y calidad de luz pueden alterar profundamente la composición bioquímica de la célula y su velocidad de reproducción. Otra de las grandes desventajas de los cultivos al exterior, es el hecho de encontrarse a expensas de cualquier contaminante, aunado a la mano de obra constante que necesitan dichos cultivos.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La producción de microalgas es uno de los requerimientos básicos en el proceso de producción de juveniles de invertebrados y vertebrados marinos. Por lo tanto, es necesario contar con un sistema de producción de microalgas de alta calidad bacteriológica y nutricia, capaz de cubrir la alta demanda a bajo costo. La evaluación del sistema de flujo continuo que aquí se presenta, representa una alternativa para ese propósito.

## IV. OBJETIVOS

### 3.1 General

Evaluar un sistema de producción continua de microalgas.

### 3.2 Particulares

- 1.- Determinar la eficiencia del pasteurizador en la eliminación de bacterias mesofílicas aerobias y bacterias TCBS+.
- 2.- Definir el protocolo más eficiente para la producción de inóculos de *Isochrysis galbana*, con la mayor concentración celular posible en un tiempo preestablecido de 12 días.
- 3.- Determinar la tasa de recambio diario y la concentración del inóculo óptimas, tomando en consideración los días efectivos de producción, la concentración celular promedio, la producción de células diaria y total, el volumen de cultivo total cosechado, la carga bacteriana, el contenido bioquímico de las microalgas (proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos) y su perfil de ácidos grasos.
- 4.- Comparar el efecto de dos medios de cultivo (f/2 vs. Enhance Algae) en el rendimiento y calidad de *Isochrysis galbana*, a la tasa de recambio diario óptima.

## **V. HIPOTESIS**

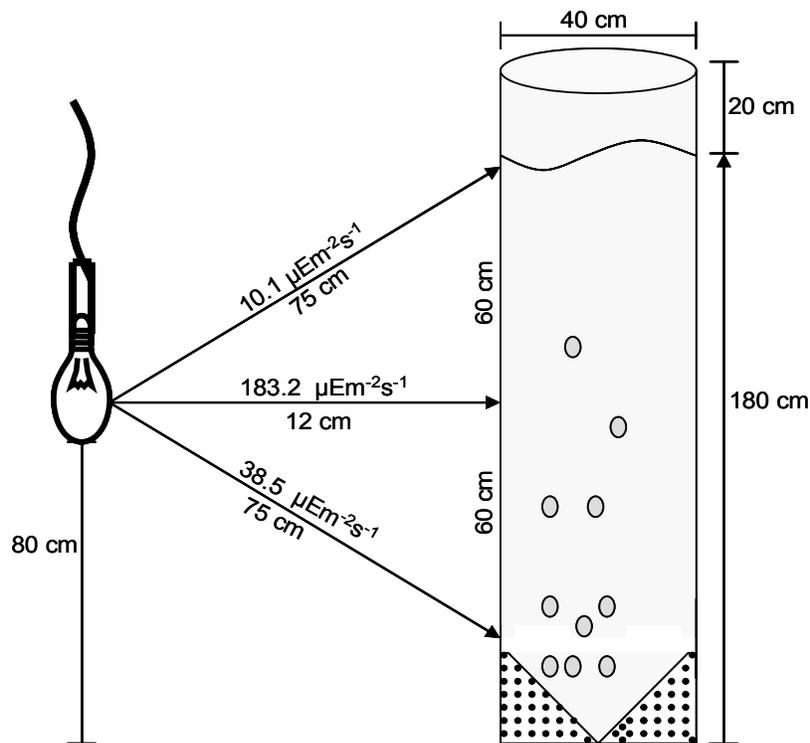
## **VI. MATERIALES Y METODOS**

## 6.1 Construcción y operación del sistema

Se construyeron nueve reactores de 200L de capacidad, similares a los descritos por McKeon (1984). Estos reactores cilíndricos de 2.0 m de altura x 40 cm. de diámetro fueron contruidos con malla de acero de 5cm de luz de malla recubierta de vinil. (Figura 1). Los cilindros se montaron sobre bases de fibra de vidrio en forma de "V" para evitar en lo posible la sedimentación de las microalgas en el fondo. Dentro del cilindro de malla se colocó una bolsa de polietileno de calibre 600 fabricada con resina virgen. El sistema se instaló en una cámara de temperatura controlada a 21°C, colocando los reactores de tal forma que cuatro de ellos recibían la iluminación de dos focos de vapor de mercurio de 400 W (Figura 2) en lugar de uno solo como ocurrió con los reactores de los extremos. Resultados preliminares indicaron que no existían diferencias significativas entre rendimientos debido a la posición de los reactores. Los focos producían una irradiancia de  $183.2 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a la distancia mas corta entre el foco y el reactor (12cm), y de  $10.1 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $38.5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  en los niveles superior e inferior del reactor, a una distancia de 75cm del foco (Figura 3). La irradiancia se midió con un irradiómetro Sper Scientific Ltd modelo 840022.



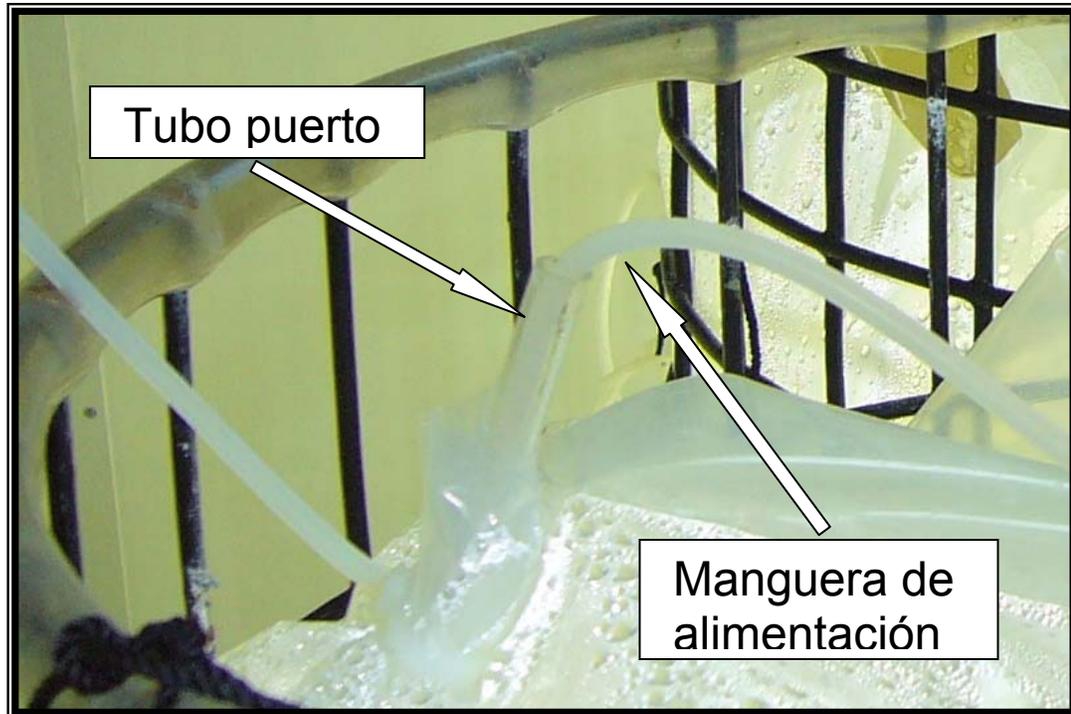
**Figura 1.** Sistema de producción continua de microalgas. Se muestra la disposición de los reactores de 200L, para aprovechar la iluminación de un solo foco de 400 Watts para cuatro reactores.



**Figura 2.** Irradiancia emitida por un foco de vapor de mercurio de 400w a un reactor de cultivo continuo de microalgas de 200L de capacidad.

El polietileno se recibió del proveedor en forma de rollo tubular de 60 cm de ancho. Se cortaron tramos de 2.5 m de longitud y posteriormente se sellaron en ambos extremos con una selladora industrial marca M. R. Sellado de 120 Watts. Cada bolsa se instaló dentro de los cilindros de malla y posteriormente se hizo un corte diagonal en una de las esquinas de la parte superior de la bolsa, por donde se inflaron con aire filtrado a través de un filtro de cartucho en línea de 10  $\mu\text{m}$  de porosidad. Una vez inflada, se procedió a vaciar el inóculo y finalmente se selló con un cincho de plástico, dejando insertado un tubo de vidrio de 11 cm de longitud y 2 cm de diámetro, el cual sirvió como puerto de entrada para la

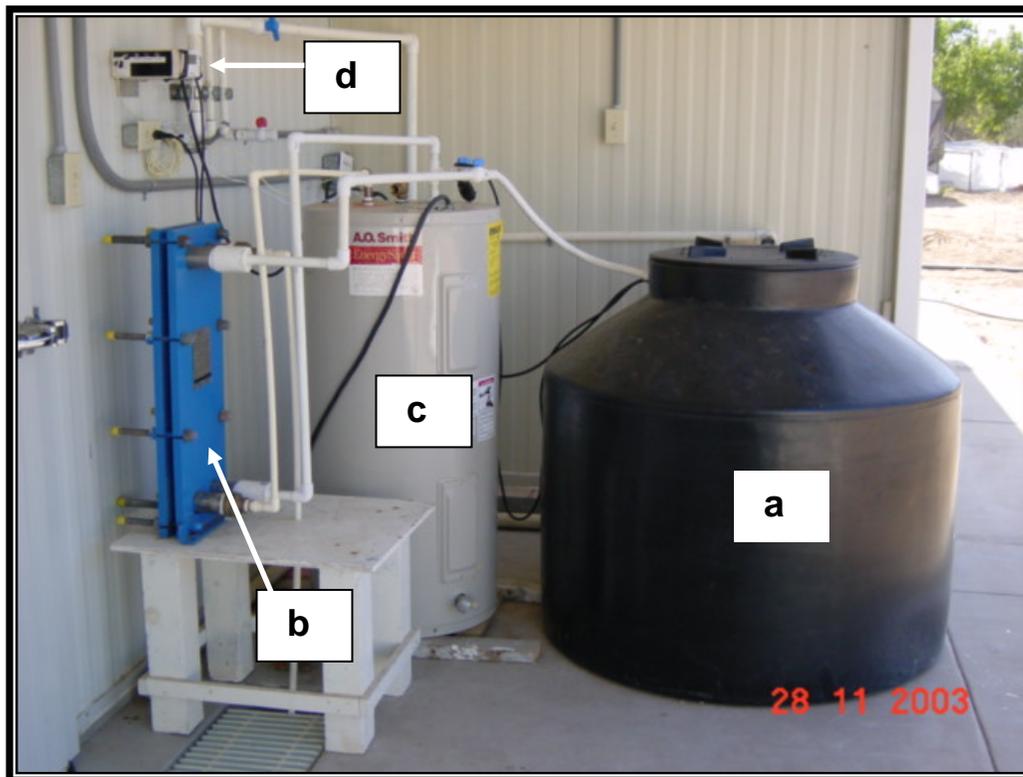
manguera de alimentación de agua de mar pasteurizada con el medio de cultivo, y para permitir la salida de aire.



**Figura 3.** Detalle de la parte superior de un reactor, en donde se muestra el tubo puerto donde se inserta la manguera de alimentación y por donde sale el aire.

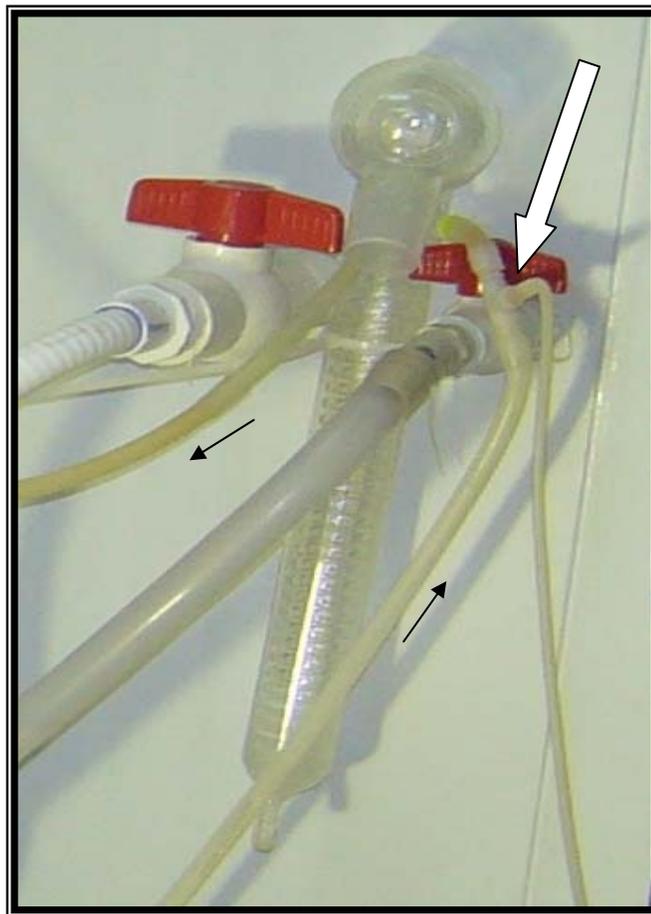
En la Figura 4 se muestra una fotografía del sistema de pasteurización. Agua de mar filtrada por un filtro de arena a 37 ups de salinidad, fue bombeada automáticamente a un tanque de plástico de 750 L de capacidad Figura 4a. Este tanque se mantuvo permanentemente lleno gracias a una válvula de flotador que permitía la entrada de agua de mar al tanque cuando bajaba el nivel. El agua del tanque fue bombeada con una bomba sumergible marca Little Giant Puma de  $\frac{1}{2}$  HP de 115 V, 60Hz, 11 amps hacia el puerto de entrada 1 de un intercambiador de calor de 8 placas de titanio marca Plate-Tech modelo G306 (Figura 4b) y de

ahí fue conducida con tubería de PVC de 1/2" del puerto de salida 1 del intercambiador de calor hacia un boiler casero marca AO Smith de 114 L de capacidad (Figura 4c), equipado con dos resistencias de 1,500 Watts cada una. Los termostatos del boiler fueron ajustados a una temperatura de 54 °C. El agua caliente proveniente del boiler, fue conducida al puerto de entrada 2 del intercambiador de calor a través de tubería de CPVC de 1/2". Posteriormente el agua enfriada por el intercambiador de calor fue llevada por tuberías de CPVC del mismo calibre hacia el interior del laboratorio.



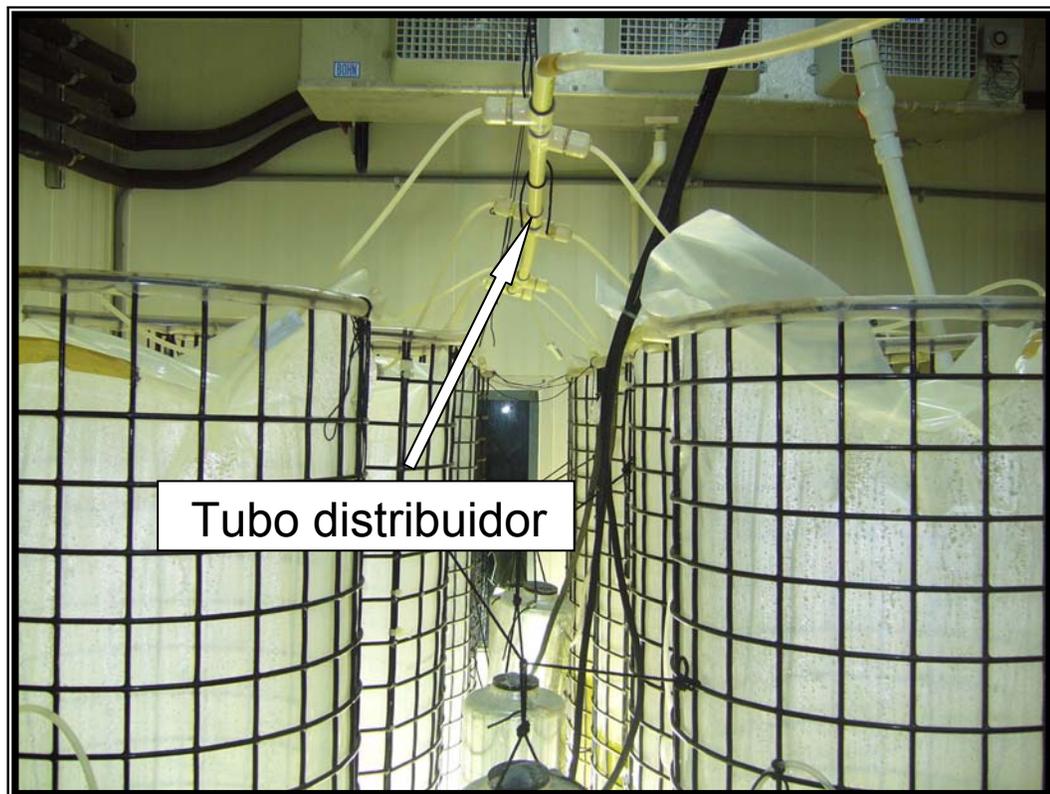
**Figura 4.** Sistema de pasteurización de agua de mar. a) tanque de almacenamiento de agua de mar; b) Intercambiador de placas de titanio, c) Boiler; d) Sistema de protección para evitar el paso del agua a la temperatura no deseada.

El agua pasteurizada fue entonces conducida hacia un mezclador de nutrientes construido con un refrigerante de vidrio colocado de forma vertical (Figura 5). El medio de cultivo fue bombeado con una bomba peristáltica Masterflex modelo 7518-00 a través de una "T" instalada en la parte superior del mezclador. Entonces conforme el agua fluía, el medio de cultivo se diluía en el agua de mar a lo largo del serpentín del refrigerante. La cantidad de medio de cultivo suministrado se calculó en función del volumen de cosecha esperado por el sistema.



Después de la **Figura 5.** Mezclador de medio de cultivo fabricado con un refrigerante de vidrio. La flecha blanca señala la "T" por donde se inyectó el medio de cultivo a la línea. Las flechas negras indican el sentido del flujo del agua de mar.

un orificio con una broca fina en las partes laterales de la tubería sobre cada reactor, en donde se insertó una manguera de silicón de 3 mm de diámetro. La manguera de alimentación se introdujo en el tubo de vidrio antes mencionado. Cada manguera tenía una llave reguladora de flujo.



**Figura 6.** Detalle fotográfico del sistema de producción continua de microalgas donde se muestra el tubo distribuidor de agua de mar con medio de cultivo hacia los reactores.

Dos líneas de aireación fueron insertadas en la parte inferior de cada reactor como se muestra en la Figura 7. Para facilitar la inserción, se acopló una

pipeta Pasteur en la punta de las mangueras de aireación y posteriormente se insertó la pipeta en el polietileno. Debido a la presión del cultivo y a la elasticidad del polietileno, se obtuvo un sellado efectivo.



**Figura 7.** Fotografía que muestra el sitio de inserción de las líneas de aireación.

En este estudio, se buscó mantener el pH en 8.2, mediante la inyección automática o manual de bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en el distribuidor que suministraba el aire a los reactores. La dosificación automática de pH se realizó con un sistema pH stat marca AZOO modelo AZ12018, equipado con un electrodo de pH y una válvula solenoide de alta presión. Primeramente el

electrodo se introdujo en uno de los reactores y cuando el pH se elevó mas allá del valor deseado, el sistema inyectó CO<sub>2</sub> automáticamente. El control automático de pH se llevó a cabo solamente en los tres primeros experimentos debido a una falla del pH stat. El control de pH en los experimentos restantes se realizó manualmente, dando pulsos de 2.5 a 3 min. una vez por día hasta alcanzar el pH deseado según lo indicaba un peachimetro marca Termo Orion digital modelo 310. El suministro de CO<sub>2</sub> se hizo conectando la manguera proveniente del tanque de CO<sub>2</sub> al distribuidor de aire hacia los reactores (Figura 8).

Con el fin de evitar la contaminación de los cultivos en caso de ocurrir alguna falla del boiler, se diseñó un sistema electrónico (Figura 9) equipado con un sensor de temperatura insertado en un pozo de acero inoxidable, el cual a su vez se instaló en la parte superior del boiler para registrar la temperatura del agua de mar en el interior del mismo. En caso de que la temperatura fuese menor a la temperatura crítica (54°C) necesaria para la eliminación de las bacterias mesófilas aerobias, el aparato apagaba la bomba y en consecuencia el agua no tratada dejaba de fluir hacia los reactores.

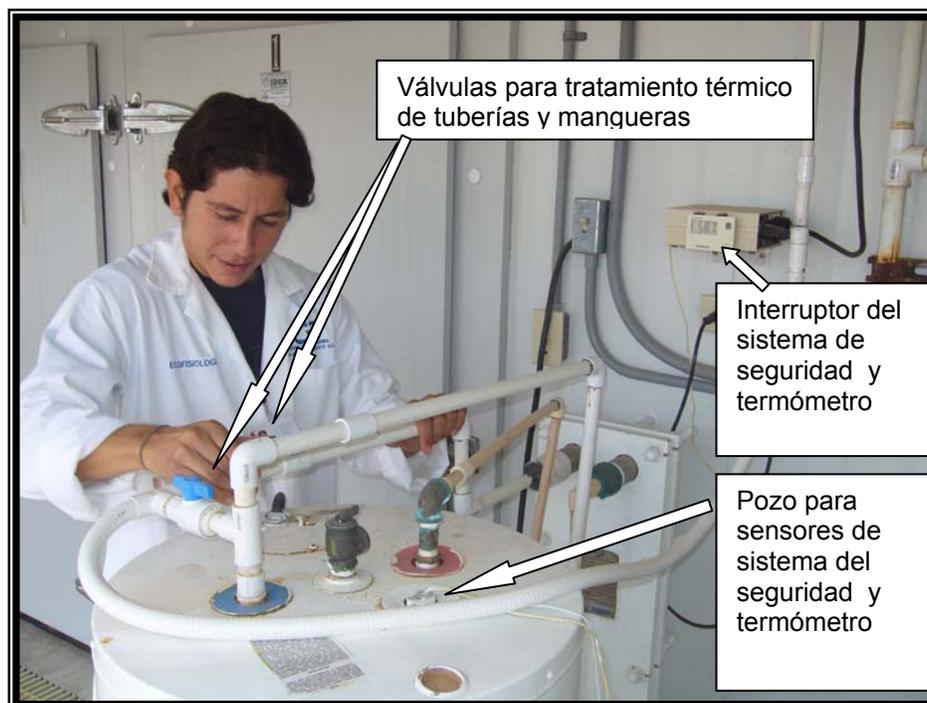
Una vez instalada la aireación en cada reactor y antes de abrir el flujo de agua con los nutrientes, las mangueras del sistema se sacaron de los tubos puerto para desinfectarlas bombeando agua caliente a través de ellas durante toda la noche. Para ello, se instalaron una serie de válvulas en el pasteurizador (Figura 9) que permitieron enviar el agua de mar directamente del boiler a los reactores sin pasar por el intercambiador de calor. Una vez desinfectadas las tuberías, las

válvulas del pasteurizador se regresaron a su configuración original y se iniciaron los experimentos. La temperatura de agua con medio de cultivo varió entre 36 y 40 °C. Dependiendo de la tasa de recambio seleccionada, fue el tiempo que tardó el reactor en iniciar la cosecha por rebosamiento. Para la cosecha se insertó una manguera con pipeta Pasteur similar a las empleadas en la aireación, a 1.8 m de altura. Las microalgas cosechadas fueron empleadas para las determinaciones de rendimiento.

## 6.2 Evaluación del pasteurizador para la eliminación de bacterias mesofílicas aerobias y bacterias TCBS+ (Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose agar)

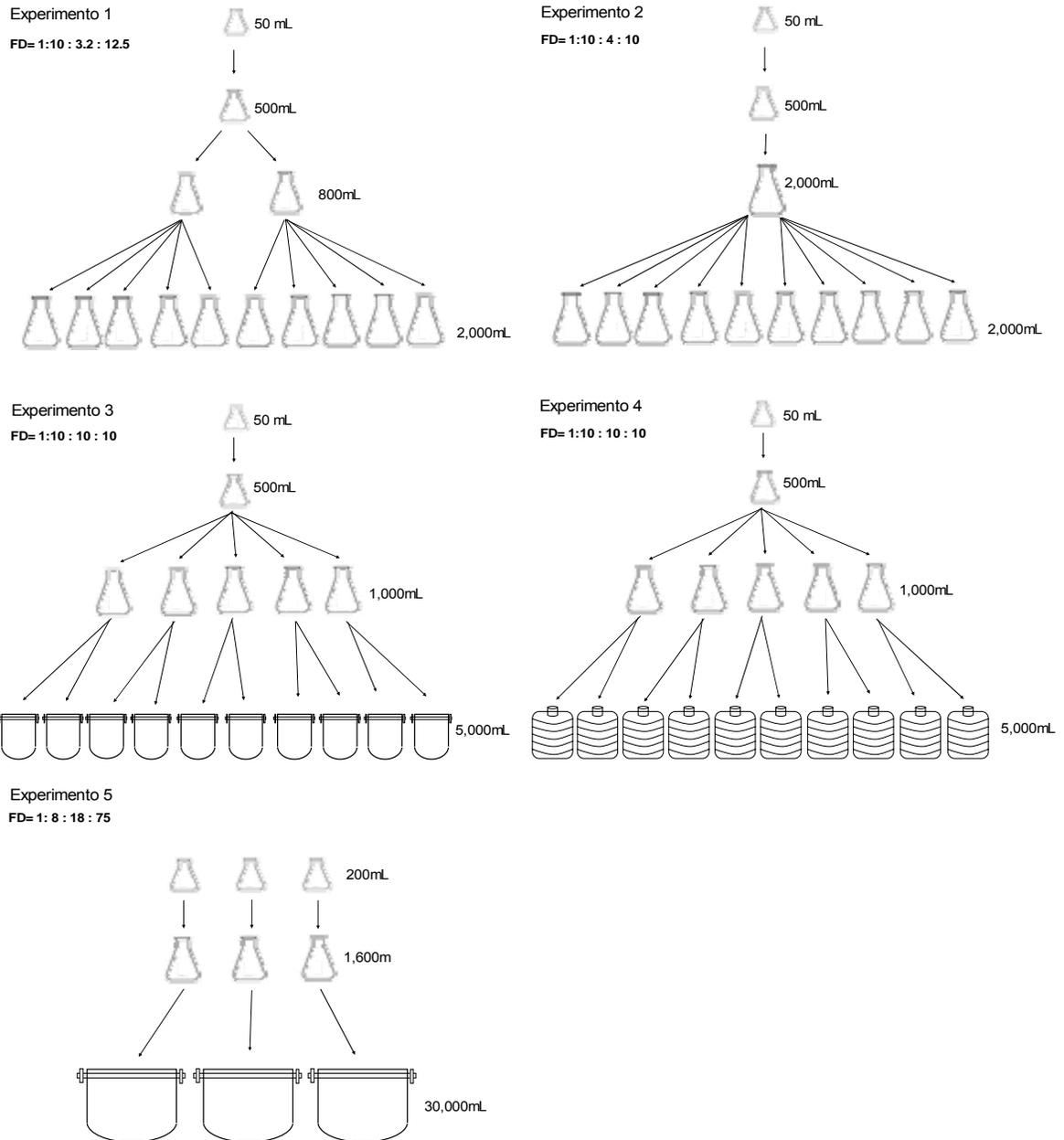
La evaluación del pasteurizador como medio para eliminar o reducir las concentraciones de bacterias mesofílicas aerobias y TCBS+ se realizó comparando las concentraciones de dichos organismos en el agua de mar antes y después de pasar por el pasteurizador. Las bacterias mesofílicas aerobias se cuantificaron en medio 2216 y las del género *Vibrio* en el medio TCBS. Se tomó una muestra de 1mL en un tubo de ensayo estéril por triplicado y posteriormente se hicieron diluciones seriadas en tres ocasiones ( $\times 10^{-3}$ ) diluyendo la muestra en 9 mL de agua de mar estéril en una cámara de flujo laminar. Una alícuota de 100 $\mu$ L de cada tubo se sembró en cajas de Petri con agar 2216 y en agar TCBS, extendiendo la muestra por toda la caja en movimientos circulares y con la ayuda de una varilla de vidrio esterilizada con el mechero. Las cajas inoculadas se incubaron a 21 °C, y se realizaron los conteos de colonias a las 24 y 48 h.





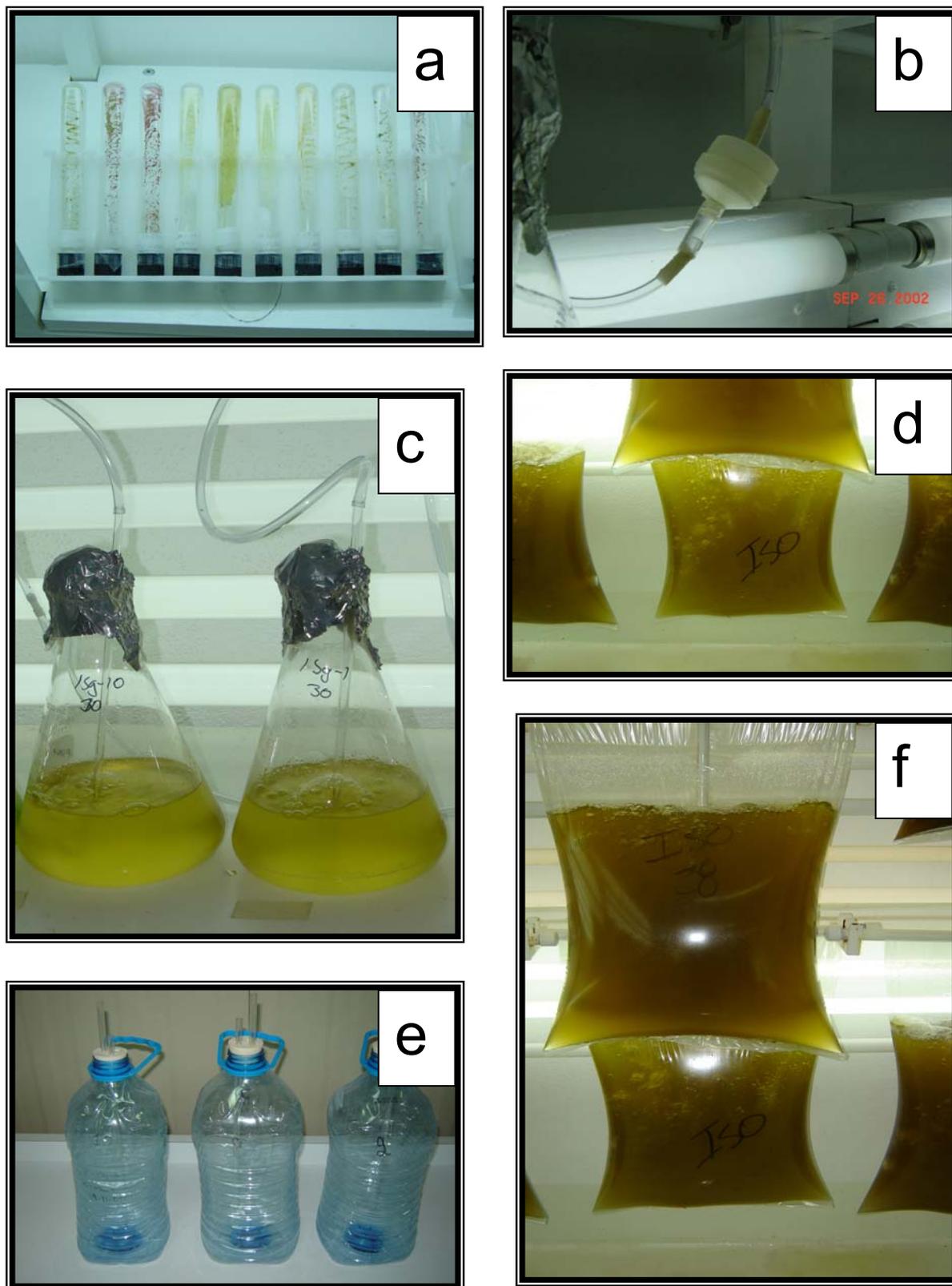
**Figura 9.** Sistema de válvulas que permite tratar con agua caliente los tubos y mangueras del sistema de producción continua de microalgas para su limpieza.  
6. Se muestra la caja del sistema de seguridad y el pozo de acero inoxidable donde  
9 se insertan los sensores de este sistema y del termómetro digital.

Se diseñaron y evaluaron cinco protocolos para la producción de inóculos de *I. galbana* (Figura 10), tomando en consideración los procedimientos aplicados en diferentes laboratorios de producción de microalgas, incluyendo el del laboratorio del CIBNOR. Cada protocolo consistía en ir escalando gradualmente los cultivos a contenedores de mayor volumen y aumentando el número de contenedores cada tercer día. Los factores de dilución entre etapas se muestran en la Figura 10. Los cultivos iniciaron a partir de cepas no axénicas (Figura 11a) mantenidas en el cepario del CIBNOR bajo condiciones de asepsia, empleando medio f/2 e iluminación constante ( $33.7 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-2}$ ). Se suministró aireación continua después de la fase de 500 mL. El aire se filtró a través de una membrana de  $0.49 \mu\text{m}$  de 2.4 cm de diámetro, montada en un Sweenex en línea (Figura 11b). A excepción de los experimentos 5 y 6, los cuatro primeros partieron de un inóculo de 50 mL, el cual se transfirió a un matraz de 500 mL. Posteriormente el cultivo se inoculó en dos matraces de 800 mL (exp. 1), o en uno de 2,000 mL (exp. 2), o en 5 de 1,000 mL (exp. 3 y 4). Después, en el experimento 1 el contenido del matraz de 800 mL se transfirió a 5 de 2,000 mL, mientras que en el experimento 2, el contenido del matras de 2,000 mL se pasó a diez matraces del mismo volumen. En los experimentos 3 y 4, el



**Figura 10.** Protocolos ensayados para la producción de inóculos de *Isochrysis galbana*, para un sistema de producción continua de microalgas. Se muestran los factores de dilución entre etapas de cada uno de los experimentos.

cultivo de cada matraz de 1,000 mL (Figura 11c) se transfirió a dos bolsas de 5,000 mL (exp. 3) (Figura 11d) o a garrafrones de 5,000 mL (exp. 4) (Figura 11e). Los matraces con agua de mar y medio de cultivo (a excepción de las vitaminas del medio f/2 las cuales se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ ), fueron esterilizados en el autoclave marca Sterilmatic modelo 109-85 a 115 libras de presión y una temperatura de 121 °C durante 20 min. El medio de cultivo de las bolsas y de los garrafrones, se esterilizaron en un horno de microondas marca Daewoo modelo KOR-L6G de 1000 Watts a la máxima potencia durante 20 min. El método de esterilización por microondas se definió en experimentos preliminares. El experimento 5 se realizó en el laboratorio de microalgas del CIBNOR siguiendo el procedimiento aplicado rutinariamente en el laboratorio. El protocolo partió de un inóculo de 200 mL, el cual se transfirió a un matraz de 1,600 mL y finalmente a una bolsa de 30,000 mL (Figura 11f). Los contenedores con el medio de cultivo de las etapas en matraz se esterilizaron en la autoclave marca Sterilmatic modelo 109-85 a 115 libras de presión y una temperatura de 121 °C durante 20 min.; y en la etapa de bolsa la esterilización se llevó a cabo desinfectando el agua con cloro y después neutralizándola con Tiosulfato de sodio, como se hace comúnmente. Se determinó la concentración celular y la carga bacteriana de heterótrofas marinas y TCBS+ al finalizar cada etapa.



**Figura 11.** Algunas de las fases ensayadas en la definición del protocolo para la producción de inóculos de *Isochrysis galbana*. a) Cepas no axénicas en el cepario del CIBNOR; b) Filtro de aire en línea tipo Sweenex ; c) Fase de 1,000 mL; d) Fase de bolsa 5,000 mL; e) Fase de garrafón 5,000 mL; f) Fase de bolsa 30,000 mL.

#### **6.4 Determinación de la tasa de recambio diario y la concentración del inóculo óptimas.**

Se realizaron tres experimentos para determinar el efecto combinado de la concentración del inóculo ( $8.3 \times 10^6$ ,  $8.9 \times 10^6$ ,  $10.5 \times 10^6$ ) y la tasa de recambio diario (10, 20 y 40 %, equivalentes a 14, 28 y 42 mL/min), sobre el rendimiento y la calidad de *Isochrysis. galbana*. Los inóculos para los experimentos  $8.3 \times 10^6$ ,  $8.9 \times 10^6$ ,  $10.5 \times 10^6$  cél/mL se produjeron de acuerdo a los protocolos de los experimentos 3, 5 y 1 de la sección anterior. La cantidad de células inoculadas por reactor se muestra en la Tabla 2. Aquí, se puede apreciar que el número de células varió entre experimentos siendo mayor en el de  $8.9 \times 10^6$  cél/mL, seguido por el de  $8.3 \times 10^6$  cél/mL y finalmente en el de  $10.5 \times 10^6$  cél/mL. Los reactores se prepararon como se indica en la sección 6.1, empleando medio f/2, a una temperatura ambiente de 21°C. Se colocaron termógrafos en los reactores de los experimentos  $8.3 \times 10^6$  y  $8.9 \times 10^6$  cél/mL para conocer si el calor de los focos y del agua proveniente del pasteurizador tenía un efecto sobre la temperatura de los cultivos. Se registró y controló el pH a lo largo de los experimentos y se ajustó la salinidad del agua del depósito del pasteurizador a 33 ups con agua dulce, en virtud de la salinidad del agua de mar del laboratorio era de 40-43 ups. Se determinó la concentración celular promedio diaria, haciendo conteos por triplicado diariamente con una cámara de Neubauer. Los resultados obtenidos se verificaron periódicamente en un contador de partículas multisizer Coulter Counter.

Además se registró el número de días efectivos de producción de cada reactor para determinar su vida útil, la producción de células diaria y total, el volumen de cultivo total cosechado. En cuanto a la calidad de los cultivos se determinó la carga bacteriana de heterótrofas marinas y TCBS+ cada tercer día siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.2, el contenido bioquímico (proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos), y el perfil de ácidos grasos de las microalgas.

**Tabla II.** Células inoculadas por reactor en los experimentos sobre el efecto combinado de concentración de inóculo y de tasa de recambio diario sobre el rendimiento y la calidad de *Isochrysis galbana*.

Concentración del inóculo (cél/mL x 10 <sup>6</sup> )	Volumen inoculado por reactor (L)	Células inoculadas por reactor (x 10 <sup>10</sup> )
8.3	5.5	4.6
8.9	10	8.9
10.5	2.2	2.3

#### 6.4.1 Contenido bioquímico de *Isochrysis galbana*

El contenido bioquímico (proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos) de las microalgas se determinó cada tercer día por triplicado. Muestras de 600 mL

de microalgas cosechadas de cada reactor fueron centrifugadas a 2,500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 10°C en una centrífuga refrigerada marca BECKMAN GPR modelo CS-6R. El centrifugado se decantó y el precipitado fue resuspendido en aproximadamente 5 mL de formato de amonio al 5% para eliminar las sales. El procedimiento de lavado se repitió una vez más y posteriormente las microalgas se colocaron en tubos eppendorf previamente pesados y etiquetados y se centrifugaron nuevamente en una microcentrífuga refrigerada marca Biofuge Heraeus a 3,000 rpm durante 10 min a 10°C. Posteriormente, los tubos eppendorf fueron guardados en un ultracongelador marca Continental Freezer a -80°C, dentro de un frasco Pyrex para liofilización. Finalmente, las muestras se secaron en un liofilizador Virtis 5L en dos sesiones de 6 horas cada una, habiendo reemplazado previamente la tapa del frasco por parafilm perforado con una aguja de disección para permitir el paso de la humedad. Para las determinaciones de contenido bioquímico, las muestras fueron primeramente rehidratadas con 1 mL de solución salina y posteriormente fueron homogenizadas en un vortex marca Virtis.

### Proteínas

El contenido de proteínas se determinó mediante la técnica de Bradford (1976). El principio de esta técnica se basa en la reacción de los grupos amino con el colorante azul cromassie, ácido fosfórico y metanol. El compuesto colorido resultante es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la muestra. Diez  $\mu$ L del homogenizado de *Isochrysis galbana* fueron digeridos en

un tubo eppendorf de 0.6 mL con 90  $\mu$ L de NaOH 0.1N durante 2 h. Posteriormente se tomaron 10 $\mu$ L del digerido y se colocaron en tubos de vidrio con 1 mL de solución reactiva de Bradford y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro marca Génesis II. La concentración absoluta de proteínas, se determinó comparando los valores obtenidos contra los de una curva patrón preparada con 0.31, 0.63, 1.25, 2.50, 5.0 y 10.0 mg/mL de proteína a partir de una solución estándar de 10 mg/mL de albúmina bovina. Para obtener la concentración de proteínas por unidad de peso seco de la microalga se utilizó la relación:

$$\text{Proteínas} = (A \times \text{FD}) / (m \times P)$$

donde:

A = absorbancia del problema - absorbancia del blanco de la curva tipo

FD = factor de dilución de cada tejido

M = pendiente de la curva tipo

P = peso seco de tejido liofilizado

### Carbohidratos

Para la determinación de carbohidratos se utilizó el método de antrona (Van-Handel, 1965). El fundamento de éste método se basa en hidrolizar los enlaces glucosídicos que forman los polisacáridos y disacáridos para ser convertidos a monosacáridos. Los complejos variarán en color de verde a negro, dependiendo de la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra. Se tomaron 150  $\mu$ L del homogeneizado y se le añadieron 150  $\mu$ L de TCA (ácido

triclora acético) al 20%, para después centrifugar a 3600 rpm durante 10 min a 5°C en una centrífuga Eppendorf modelo 5810R. Se tomaron 100 µL del sobrenadante con una pipeta de precisión y se hizo reaccionar con 1 mL de una solución de antrona (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O) al 0.1% en un baño maría marca Techne TE-8J a 85 °C durante 15 min. Por último, las muestras se enfriaron en un baño de hielo. El compuesto colorido resultante fue directamente proporcional a la concentración de carbohidratos totales presentes en la muestra. La absorbancia de las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Génesis II a 620 nm. Los resultados se compararon contra una curva patrón preparada con 0.040, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 y 2.5 mg/mL de carbohidratos, a partir de una solución estándar de carbohidratos de 10 mg/mL. Para obtener los carbohidratos totales por unidad de peso seco de *I. galbana* se utilizó la relación:

$$\text{Carbohidratos} = (A \times \text{FD}) / (m \times P)$$

donde:

A = absorbancia del problema - absorbancia del blanco de la curva tipo

FD = factor de dilución de cada tejido

M = pendiente de la curva tipo

P = peso seco de tejido liofilizado

### Lípidos

La determinación de lípidos se realizó con un kit de diagnóstico Randox TR 210, basado en el método sulfofosfórico-vainilla (Zöllner y Kirsch, 1962). El principio de la técnica está en que los lípidos reaccionan con el reactivo fosfórico-

vainilla dando un producto color rosa. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de lípidos de la muestra. Para dicha determinación se tomaron 25  $\mu\text{L}$  del homogeneizado con una pipeta de precisión y se mezclaron con 250  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado agitándose y calentándose a baño maría a  $85^\circ\text{C}$  por 10 min. La mezcla se enfrió y posteriormente se tomaron 20  $\mu\text{L}$ , los cuales se hicieron reaccionar con 200  $\mu\text{L}$  de solución reactiva del kit Randox durante 40 min. a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 530 nm en un fotocolorímetro de microplaca marca Bio-Rad modelo 550. Para determinar la concentración de lípidos totales se construyó una curva patrón de 0.16, 0.31, 0.63, 1.0 1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/mL, a partir de una solución de lípidos de 10 mg/mL. Para obtener los lípidos totales por unidad de peso seco de la microalga se utilizó la relación:

$$\text{Lípidos} = (A \times \text{FD}) / (m \times P)$$

donde:

A = absorbancia del problema - absorbancia del blanco de la curva tipo

FD = factor de dilución de cada tejido

M = pendiente de la curva tipo

P = peso seco de tejido liofilizado

### Triglicéridos

La determinación de los triglicéridos se realizó con el kit de diagnóstico Randox 290 319 basado en el método CHOD-PAP (1969). El indicador de la prueba enzimática colorimétrica surge a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazon y 4-fenazona bajo la influencia de la peroxidasa. Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  del homogenizado en un pozo de una microplaca, y posteriormente se

agregaron 200 µL de solución reactiva del kit de Randox. Se dejaron reposar por 20 min. Posteriormente las muestras se leyeron en un fotocolorímetro de microplacas Bio-Rad modelo 550, a 490 nm. Los resultados se compararon con una curva patrón construida con 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/dL de una solución estándar de triglicéridos de 200 mg/dL. . Para obtener la concentración de triglicéridos por unidad de peso seco de *I. galbana* se utilizó la fórmula:

$$\text{Triglicéridos} = (A \times \text{FD}) / (m \times P \times 100)$$

donde:

A = absorbancia del problema - absorbancia del blanco de la curva tipo

FD = factor de dilución de cada tejido

m = pendiente de la curva tipo

P = peso seco de tejido liofilizado

100= conversión de dL a mL

### Ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de *Isocrhysis galbana* se determinó por cromatografía de gases. Primeramente se hizo la derivatización analítica de los lípidos para incluir los compuestos volátiles e inestables y que por su naturaleza no se encuentran directamente disponibles, y para mejorar la detección de los compuestos durante el análisis cromatográfico. Los lípidos totales se sometieron a metanólisis adicionando 2.5 mL de mezcla de HCl:CH<sub>3</sub>OH al 5% (Sato y Murata, 1988), durante 2.5 h a 85°C. Los metil ésteres obtenidos se extrajeron con 1 mL de hexano (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, grado HPLC),

repetiendo este paso dos veces hasta su total extracción. Al extracto resultante se le adicionó agua destilada, permitiendo la formación de dos capas, una inferior de agua destilada y la superior con hexano y metil-ésteres. El agua destilada se separó con una pipeta Pasteur y posteriormente se realizaron dos o tres veces lavados con agua destilada para eliminar las impurezas resultantes de la derivatización. El extracto de hexano con metil-ésteres se secó con una corriente de nitrógeno gaseoso. Las muestras de ácidos grasos se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_6\text{H}_{12}$  en viales. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas Hewlett Packard serie G1800B, modelo GC-MS), acondicionada con una columna Omegawax TM250 de sílica fundida (Supelco) de 30 m x 0.25 mm de diámetro externo x 0.25  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. El gas acarreador fue helio de alta pureza. Las condiciones de corrida fueron: temperatura del inyector = 110°C manteniéndose 3 min. La rampa de temperatura que presentó la columna fue: inicialmente aumento a 165°C a una tasa de 30°C por min., manteniéndose a 165 °C por 2 min., enseguida aumentó a 220°C a una tasa de 2°C por cada minuto y se mantuvo a 220°C por 16 min. La temperatura del detector fue de 260°C.

Los ácidos grasos se identificaron mediante la comparación de los espectros de masas con los espectros contenidos en la biblioteca de espectros de masas NIST2002, NB575K y una biblioteca creada con 30 estándares de ácidos grasos metil-esterificados (Sigma Chemical Company)

denominada CIBNOR. Los resultados se confirmaron comparando los tiempos de retención obtenidos (tiempo entre la inyección de la muestra y su detección) contra los de un patrón comercial de metil-ésteres de ácidos grasos (PUFAC30).

Para calcular la concentración de los ácidos grasos presentes en las muestras, se integró el área bajo los picos la cual, en el sistema GC-MS es directamente proporcional a la masa. Los resultados se presentan en mg/g y en porcentaje con respecto al total de ácidos grasos. El cálculo de concentración se realizó mediante la fórmula:

$$\text{Concentración de ácido graso} = (A \times V) / (FC \times W)$$

A = área bajo los picos

V = volumen de la muestra

FC = factor de corrección

W = peso de la muestra

### **6.5 Efecto comparativo del medio f/2 vs. Enhance Algae sobre el rendimiento y la calidad de *Isochrysis galbana***

Para este experimento se emplearon seis reactores, los cuales fueron operados de la misma forma que en el experimento anterior a una tasa de recambio diario de 40%. Tres de ellos recibieron medio f/2 y los tres restantes Enhance Algae. En este caso, el suministro de los medios de cultivo se hizo de forma manual dos veces al día. Se utilizó una jeringa estéril. El rendimiento y la calidad de las microalgas se determinaron de la misma forma que en el

experimento anterior. En el anexo I, se compara la composición de ambos medios de cultivo.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Evaluación del pasteurizador como medio para la eliminación de bacterias mesofílicas aerobias y bacterias TCBS+

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones bacterianas obtenidas en muestras de agua de mar antes y después de la pasteurización. Aquí se puede apreciar que el pasteurizador tuvo una eficiencia del 94.8 % de eliminación de mesofílicas aerobias y el 100% de eficiencia para las TCBS+.

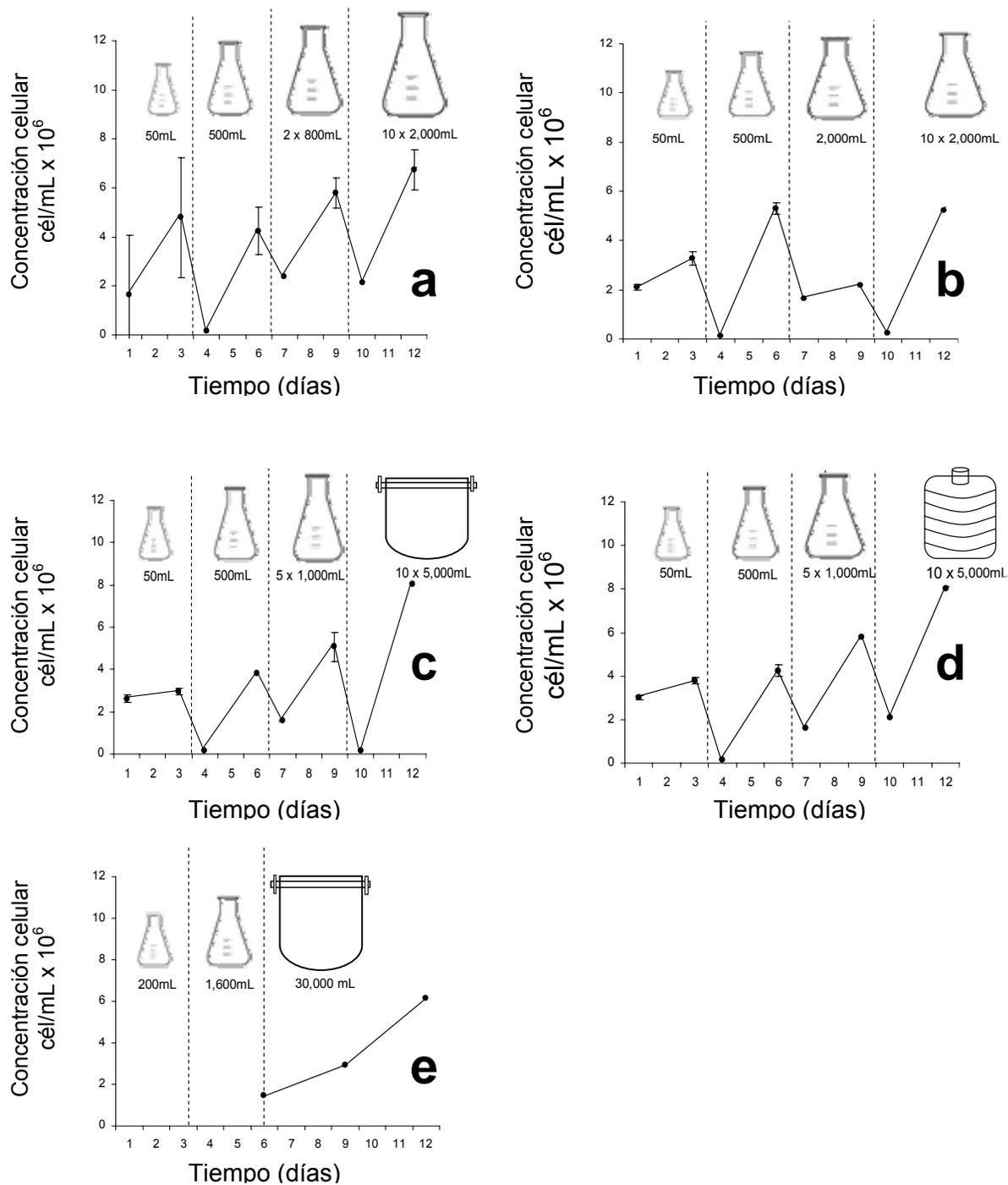
**Tabla III.** Eficiencia del pasteurizador como un medio para la eliminación o reducción de bacterias heterótrofas marinas y de bacterias TCBS +. El experimento fue realizado el 23/08/2004, en el sistema de abastecimiento de agua de mar del laboratorio de ecofisiología de organismos acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n = 3$ .

Heterótrofas marinas (Medio 2216)			TCBS+		
Antes del tratamiento (UFC/mL x 10 <sup>3</sup> )	Después del tratamiento (UFC/mL x 10 <sup>3</sup> )	Eficiencia %	Antes del tratamiento (UFC/mL x 10 <sup>3</sup> )	Después del tratamiento (UFC/mL x 10 <sup>3</sup> )	Eficiencia %
406.0 $\pm$ 15.2	21 $\pm$ 3	94.8	3.3 $\pm$ 5.7	0	100

### 7.2 Definición del protocolo para la producción de inóculos de *Isochrysis galbana*

En la Figura 12 se muestran las variaciones de las concentraciones celulares de *Isochrysis galbana* durante las distintas etapas de la fase de inóculos

en los cinco protocolos experimentales. Se observan las caídas en la concentración por las diluciones realizadas en los momentos de cambio de contenedor. En la Tabla 4, se aprecia que las concentraciones de los protocolos 3 y 4 fueron significativamente las más elevadas ( $P < 0.05$ ) ( $8 \times 10^6$  cél/mL) en los 12 días de experimentación. En estos protocolos se emplearon los mismos factores de dilución (1:10:10:10), volumen (5,000 mL) y método de esterilización por microondas, pero diferentes contenedores (garrafones y bolsas). Sin embargo la cantidad de células y el volumen producidos fueron mayores en el protocolo 6, seguidos por los protocolos 3 y 4 con  $4 \times 10^{11}$  células y 50 L cosechados, y finalmente en los protocolos 1 y 2. La carga bacteriana de TCBS+ fue nula a los 12 días de experimentación, mientras que la de heterótrofas marinas varió entre 2,000 y 4,100 UFC/mL sin existir diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 5). Esto sugiere una misma eficiencia de los tres medios de esterilización (autoclaveado, microondas y clorinación-neutralización) de recipientes y medios de cultivo.



**Figura 12.** Variación en las concentraciones celulares de *Isochrysis galbana* durante la fase de inóculos en los experimentos 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), y 5 (e).

**Tabla IV.-** Células y volumen totales producidos y concentraciones celulares ( $\times 10^6$ ) al final de cada etapa de cultivo de *Isochrysis galbana* durante la fase de inóculo, en 5 protocolos experimentales. Letras distintas entre filas de la columna células producidas y de las concentraciones finales (sombreadas) de los cinco experimentos, indican diferencias significativas  $P < 0.05$ . Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar  $n=3$ .

Exp.	Volumen del contenedor									Células producidas $\times 10^6$	Volumen total (L)
	(mL)										
	50	200	500	800	1,000	1,600	2,000	5,000	30,000		
1	1.6 $\pm$ 0.1	-	3.8 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 1.8	-	-	6.7 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>			76,400 <sup>a</sup>	20
2	2.4 $\pm$ 0.1	-	3.2 $\pm$ 0.2	-			5.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>			104,444 <sup>b</sup>	20
3	2.6 $\pm$ 0.1	-	2.9 $\pm$ 0.1	-	3.8 $\pm$ 0.4	-	-	8.0 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>		402,000 <sup>c</sup>	50
4	3.0 $\pm$ 0.1	-	3.8 $\pm$ 0.3	-	4.0 $\pm$ 0.1	-	-	8.0 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>		401,333 <sup>c</sup>	50
5	-	NC	-	-	-	NC	-	-	6.1 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	552,000 <sup>d</sup>	90

NC = No cuantificado.

**Tabla V.-** Concentración de bacterias heterótrofas marinas (UFC/mL  $\times 10^3$ ) al final de cada etapa de cultivo de *Isochrysis galbana* durante la fase de inóculo en 5 experimentos. No hubo diferencias significativas entre concentraciones bacterianas al final de los experimentos (sombreadas). Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar  $n=3$ .

Exp.	Etapa de cultivo (mL)								
	50	200	500	800	1,000	1,600	2,000	5,000	30,000
1	1.3 $\pm$ 1.5	-	2.6 $\pm$ 1.5	2.8 $\pm$ 1.1	-	-	3.3 $\pm$ 0.7	-	-
2	1.0 $\pm$ 1.0	-	1.3 $\pm$ 1.1	-	-	-	2.0 $\pm$ 0.6	-	-
3	1.6 $\pm$ 1.1	-	1.3 $\pm$ 1.5	-	2.5 $\pm$ 0.5	-	-	4.1 $\pm$ 0.5	-
4	1.3 $\pm$ 1.5	-	1.0 $\pm$ 1.0	-	2.2 $\pm$ 0.3	-	-	3.4 $\pm$ 0.6	-
5	-	NC	-	-	-	NC	-	-	3.1 $\pm$ 0.6

NC = No cuantificado

### **7.3 Determinación de la tasa de recambio diario y la concentración del inóculo óptimas durante la fase de producción en reactores.**

En el Anexo 2, se presentan las variaciones en las concentraciones celulares por día, la producción diaria y acumulada de células y litros de cultivo, y la concentración de bacterias (medio 2216), por cada reactor en los diferentes tratamientos. Estos datos se condensan en las Tablas 6, 7 y 8; y se ilustran en las Figuras 13-18. En la Figura 13 se aprecia un incremento en la vida útil de los reactores cuando se emplearon inóculos más densos. En el tratamiento de densidad intermedia del inóculo, se observa un incremento significativo ( $P<0.05$ ) de la vida útil de los reactores a las tasas de recambio más altas (20 y 40%). No se cuenta con datos en el tratamiento de mayor tasa de recambio y mayor concentración de inóculo por haberse roto los reactores en el momento de la siembra. El rango de días útiles de cosecha varió entre 6 y 19 días.

En la Figura 14 se muestra una reducción significativa ( $P<0.05$ ) de la concentración celular, a las tasas de recambio intermedia (20%) y alta (40%), posiblemente como resultado de una mayor dilución. También se aprecia que la concentración celular fue significativamente ( $P<0.05$ ) más alta cuando se empleó el inóculo más concentrado ( $10.5 \times 10^6$ ). El rango de concentraciones celulares promedio diarias obtenidas en los reactores independientemente de los tratamientos, fue de  $2.2 \times 10^6$  a  $9.2 \times 10^6$  cél/mL.

A pesar de la reducción en las concentraciones a las mayores tasas de recambio, la producción promedio diaria (Figura 15) se incrementó significativamente

**Tabla VI.-** Días efectivos de cosecha, concentración celular promedio y producción diaria y total de microalgas (*Isochrysis galbana*) en reactores de flujo continuo con medio f/2, a tres tasas de recambio diario partiendo de una concentración inicial de  $8.3 \times 10^6$  cél/mL. Además se muestran las concentraciones bacterianas promedio de heterótrofas marinas cultivadas en medio 2216. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .

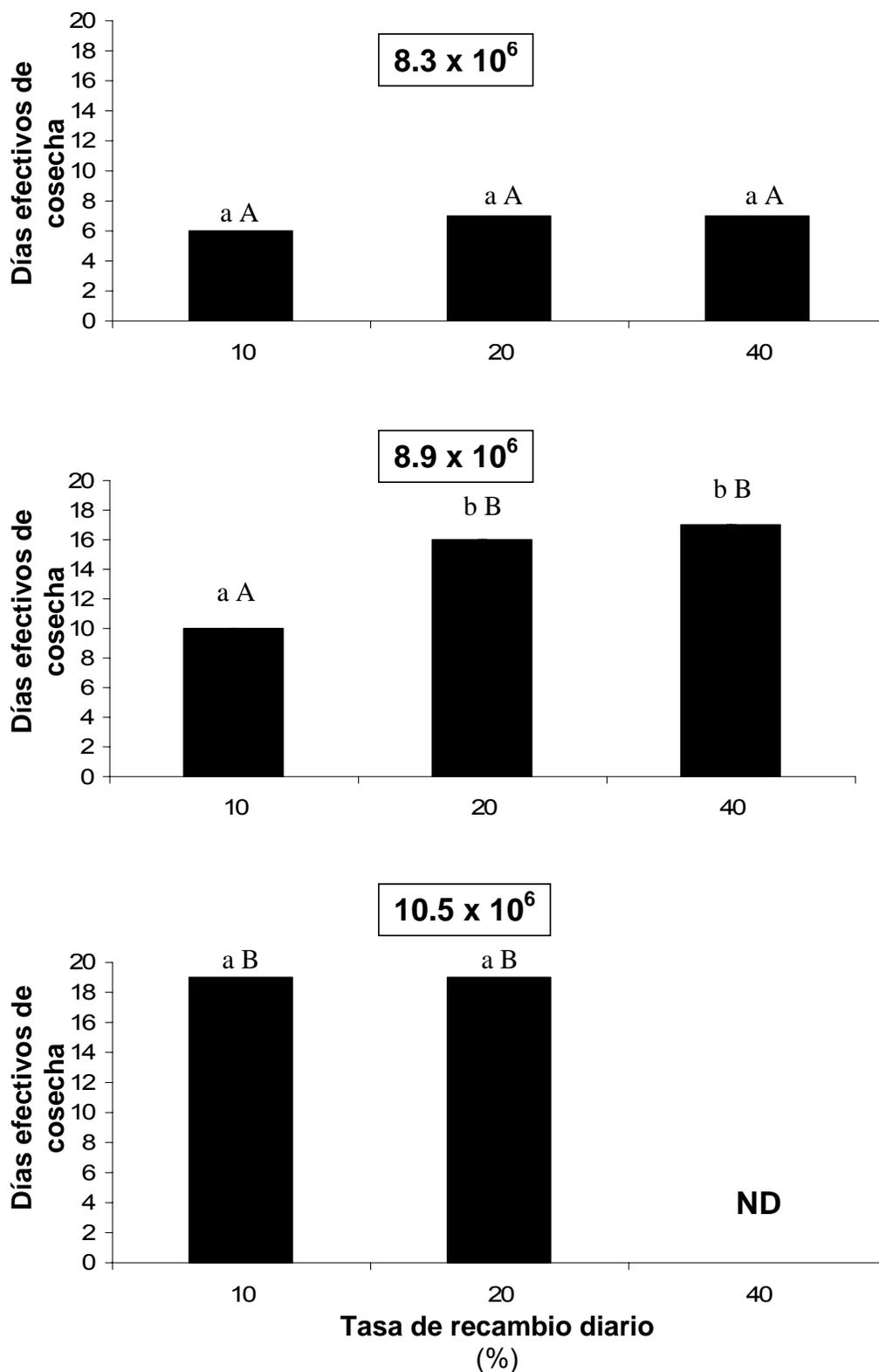
Reactor	Tasa de recambio diaria (%)	Días de cultivo	Días efectivos de cosecha	Concentración promedio (cél. $\times 10^6$ )	Producción			Concentración bacteriana (UFC/mL $\times 10^3$ )
					Diaria (cél. $\times 10^9$ )	Total (L)	Total (cél. $\times 10^9$ )	
1	10	12	6	$2.4 \pm 0.1^a$	50 <sup>a</sup>	125	300 <sup>a</sup>	$432.0 \pm 1.8$
2	10	12	6	$2.4 \pm 0.0^a$	49 <sup>a</sup>	123	295 <sup>a</sup>	$327.2 \pm 4.1$
3	10	12	6	$2.8 \pm 0.0^a$	55 <sup>a</sup>	117	328 <sup>a</sup>	$637.6 \pm 6.0$
<b>Promedio</b>		<b>12</b>	<b>6</b>	<b><math>2.5 \pm 0.0</math></b>	<b><math>51 \pm 3</math></b>	<b><math>122 \pm 4</math></b>	<b><math>308 \pm 17</math></b>	<b><math>466.0 \pm 4.0</math></b>
4	20	12	7	$2.2 \pm 0.2^b$	76 <sup>b</sup>	241	530 <sup>b</sup>	$693.5 \pm 4.0$
5	20	12	7	$2.5 \pm 0.2^b$	85 <sup>b</sup>	238	595 <sup>b</sup>	$700.0 \pm 3.5$
6	20	12	7	$2.4 \pm 0.1^b$	79 <sup>b</sup>	231	554 <sup>b</sup>	$681.0 \pm 2.6$
<b>Promedio</b>		<b>12</b>	<b>7</b>	<b><math>2.4 \pm 0.2</math></b>	<b><math>80 \pm 5</math></b>	<b><math>237 \pm 5</math></b>	<b><math>560 \pm 33</math></b>	<b><math>692.0 \pm 3.4</math></b>
7	40	12	7	$2.1 \pm 0.0^b$	108 <sup>c</sup>	360	756 <sup>c</sup>	$650.0 \pm 3.0$
9	40	12	7	$2.3 \pm 0.1^b$	117 <sup>c</sup>	357	821 <sup>c</sup>	$548.1 \pm 3.4$
<b>Promedio</b>		<b>12</b>	<b>7</b>	<b><math>2.2 \pm 0.1</math></b>	<b><math>113 \pm 7</math></b>	<b><math>359 \pm 2</math></b>	<b><math>789 \pm 46</math></b>	<b><math>599.0 \pm 3.2</math></b>

**Tabla VII.-** Días efectivos de cosecha, concentración celular promedio y producción diaria y total de microalgas (*Isochrysis galbana*) en reactores de flujo continuo con medio f/2, a tres tasas de recambio diario partiendo de una concentración inicial de  $8.9 \times 10^6$  cél/mL. Además se muestran las concentraciones bacterianas promedio de heterótrofas marinas cultivadas en medio 2216. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .

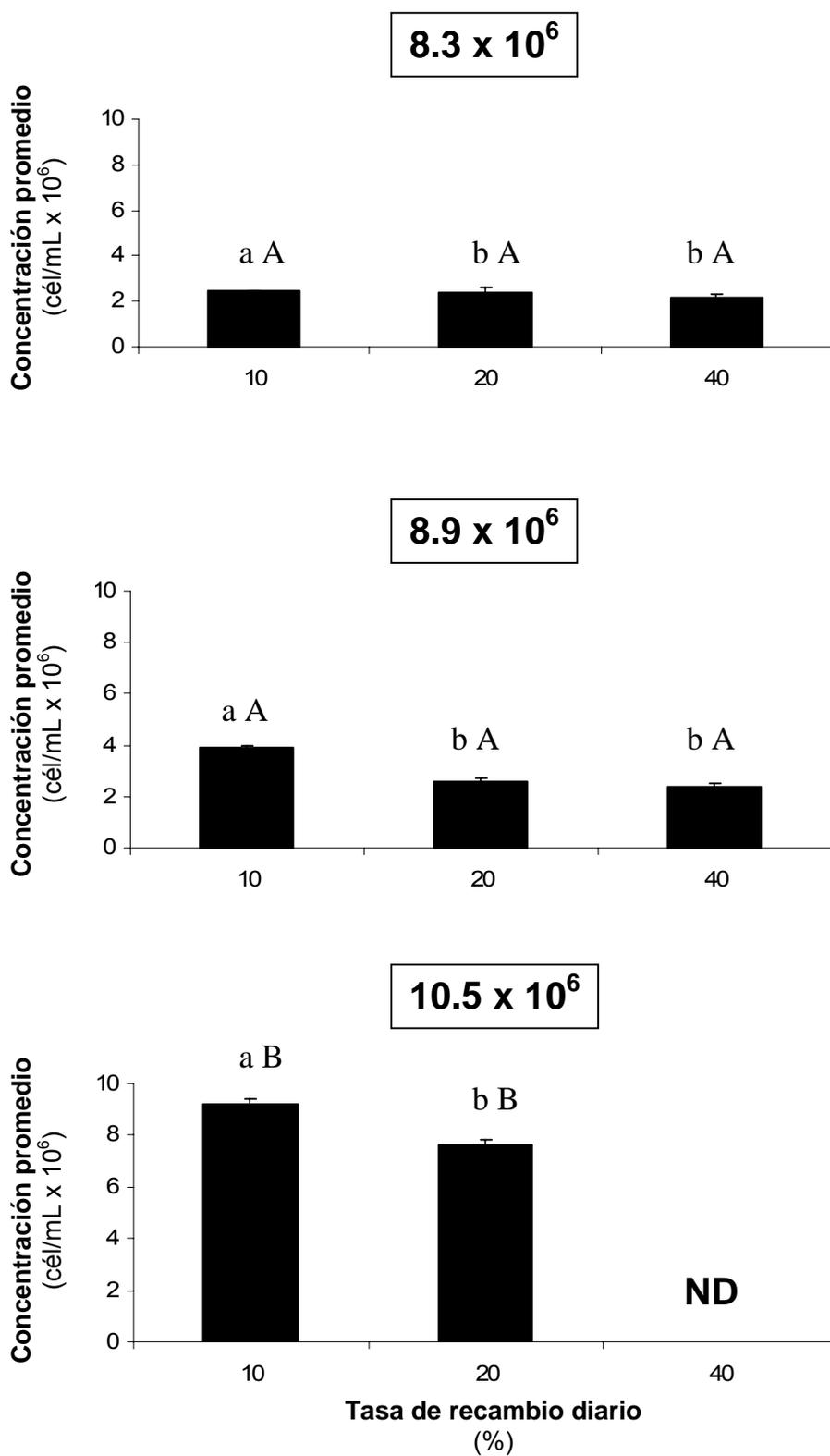
Reactor	Tasa de recambio diaria (%)	Días de cultivo	Días efectivos de cosecha	Concentración promedio (cél. $\times 10^6$ )	Producción			Concentración bacteriana (UFC/mL $\times 10^3$ )
					Diaria (cél. $\times 10^9$ )	Total (L)	Total (cél. $\times 10^9$ )	
1	10	20	10	$4.2 \pm 0.2^a$	86 <sup>a</sup>	205	861 <sup>a</sup>	$877.0 \pm 12.7$
2	10	10	-	-	-	-	-	$1,167.0 \pm 2.74$
3	10	16	5*	$3.7^* \pm 0.1^a$	77 <sup>a*</sup>	104*	385 <sup>b*</sup>	$1,270.0^* \pm 34.0$
<b>Promedio</b>		<b>15</b>	<b>7.5</b>	<b><math>4.2 \pm 0.2</math></b>	<b>86</b>	<b>205</b>	<b>861</b>	<b><math>1,215.3 \pm 16.5</math></b>
4	20	10	6*	$2.5^* \pm 0.1^b$	84 <sup>a*</sup>	202*	505 <sup>a*</sup>	$1,630.0^* \pm 15.5$
5	20	20	16	$2.5 \pm 0.1^b$	100 <sup>a</sup>	643	1,608 <sup>a</sup>	$1,190.0 \pm 63.6$
6	20	20	16	$2.8 \pm 0.1^b$	112 <sup>b</sup>	642	1,798 <sup>c</sup>	$1,150.0 \pm 43.4$
<b>Promedio</b>		<b>17</b>	<b>16</b>	<b><math>2.6 \pm 0.1</math></b>	<b><math>106 \pm 14</math></b>	<b><math>496 \pm 254</math></b>	<b><math>1,703 \pm 198</math></b>	<b><math>1,170.0 \pm 40.8</math></b>
7	40	20	17	$2.8 \pm 0.1^b$	163 <sup>b</sup>	989	2,769 <sup>d</sup>	$1,197.0 \pm 22.8$
8	40	20	17	$2.6 \pm 0.1^b$	152 <sup>b</sup>	996	2,590 <sup>d</sup>	$1,108.0 \pm 25.3$
9	40	10	7*	$1.8^* \pm 0.1^b$	108 <sup>b*</sup>	420*	756 <sup>a*</sup>	$1,178.0^* \pm 9.00$
<b>Promedio</b>		<b>17</b>	<b>17</b>	<b><math>2.7 \pm 0.1</math></b>	<b><math>150.7 \pm 29</math></b>	<b><math>802 \pm 331</math></b>	<b><math>1,680 \pm 114</math></b>	<b><math>1,115.0 \pm 19.0</math></b>

(\*).- Ruptura accidental del reactor. Por lo tanto, estos datos no se consideraron en el cálculo de los promedios.

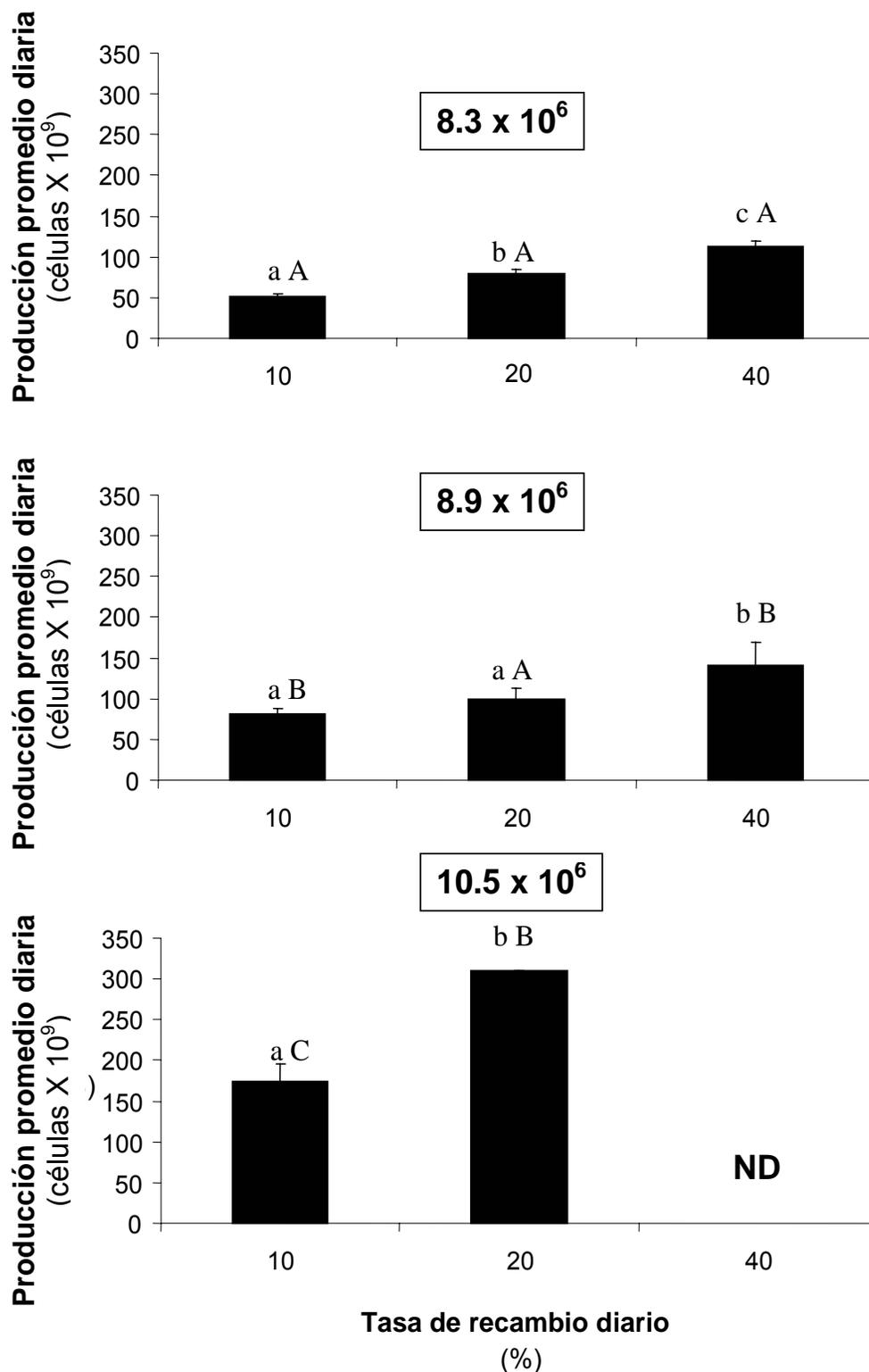




**Figura 13.** Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre la vida útil de los reactores de flujo continuo en la producción de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). ND = no determinado.



**Figura 14.** Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre la concentración celular promedio de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). ND = no determinado.



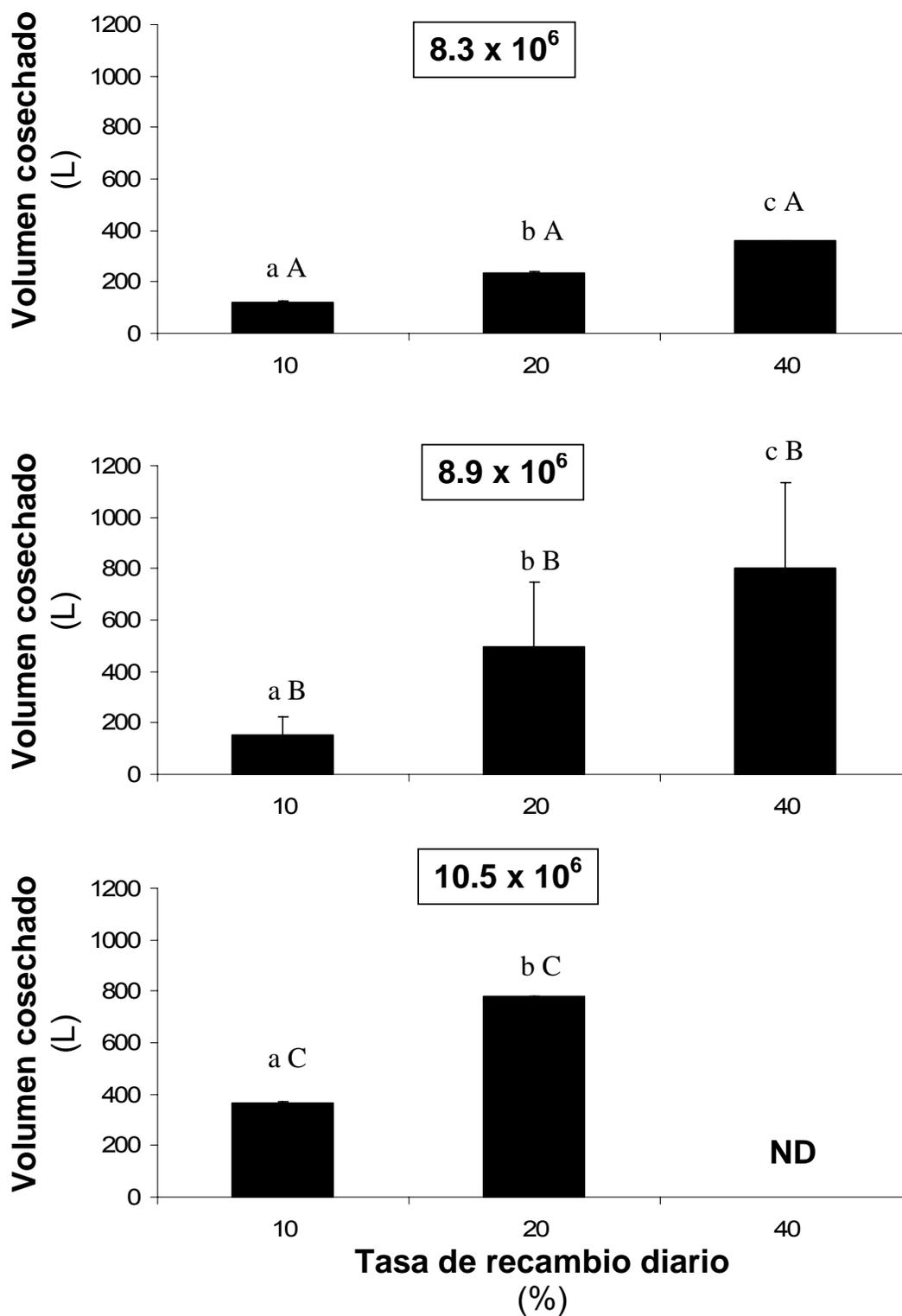
**Figura 15.** Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre la producción promedio diaria de células de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.

conforme aumentó la tasa de recambio, debido a un mayor impacto del volumen cosechado, que el que tuvo la concentración celular. Comparando la producción promedio diaria de los tres tratamientos de concentración de inóculo, se observa una producción significativamente ( $P<0.05$ ) mayor en el de mayor concentración de inóculo, debido a la elevada densidad celular promedio antes mencionada en ese tratamiento (Figura 14). El rango de producción promedio diaria de *I. galbana* fue de  $51 \times 10^9$  a  $310 \times 10^9$  células/reactor, independientemente de los tratamientos.

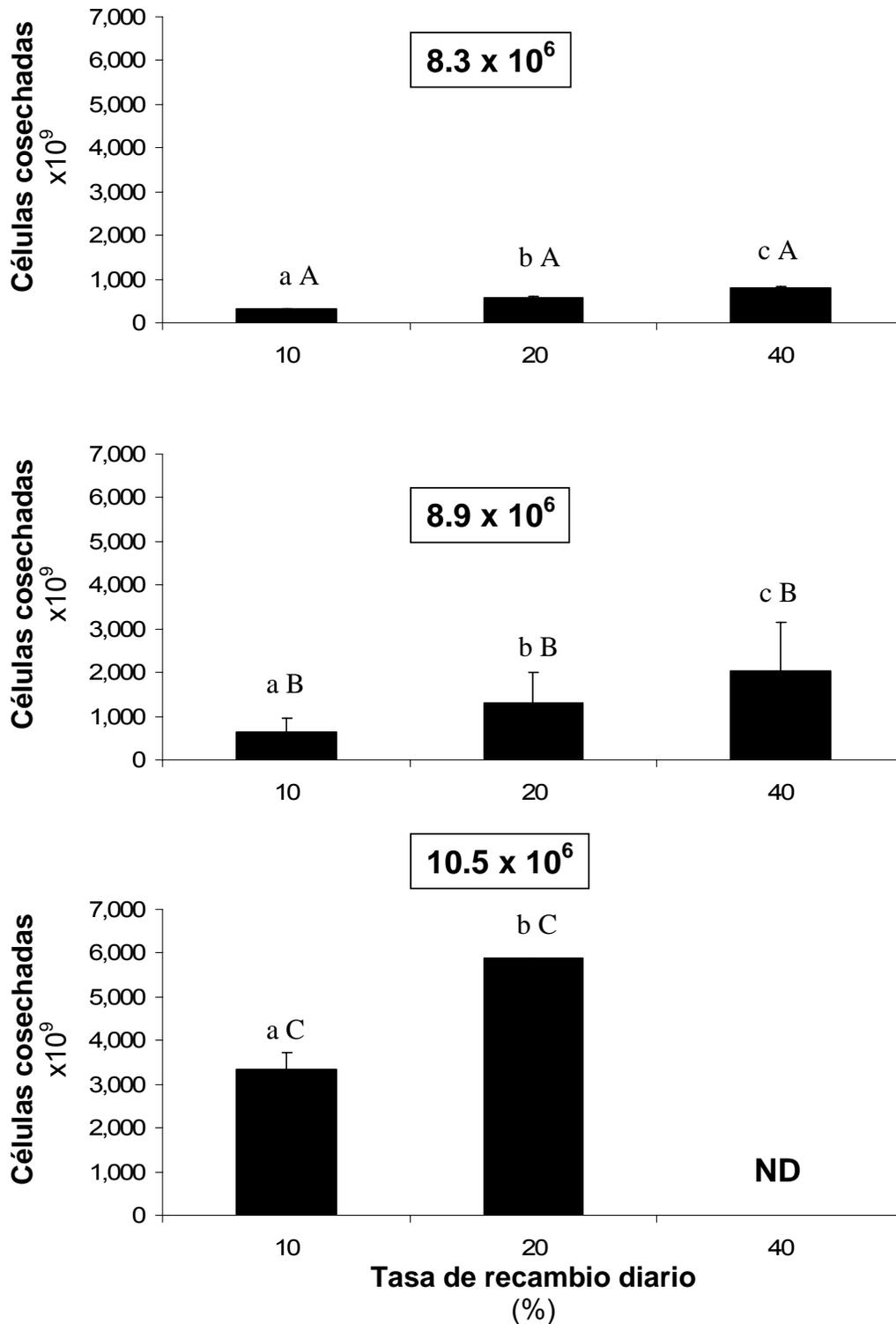
Las variaciones en el volumen total cosechado en cada tratamiento dependieron no solo de la tasa de recambio diaria, sino del número de días útiles de cosecha. Los resultados (Figura 16) muestran el incremento significativo ( $P<0.05$ ) esperado en el volumen cosechado conforme aumentó la tasa de recambio diario, pero el volumen fue significativamente mayor ( $P<0.05$ ) cuando los reactores se inocularon a una mayor densidad, como resultado de una mayor vida útil de los reactores. El rango de volúmenes de cultivo cosechados por reactor independientemente de los tratamientos varió entre 122 y 802 L.

Las variaciones en el volumen de cosecha influyeron directamente sobre la cantidad total de células cosechadas (Figura 17). Aquí se observa que la mayor producción de células fue de  $6 \times 10^{12}$ , a una tasa de recambio de 20% y a una concentración del inóculo de  $10.5 \times 10^6$  cél/mL.

En relación a la carga bacteriana de las microalgas cosechadas, en ninguna ocasión se registraron bacterias TCBS+, y no se observó un patrón definido en la concentración de heterótrofas marinas debido a la tasa de



**Figura 16.** Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre el volumen de cultivo cosechado de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n = 3$ . ND = no determinado.

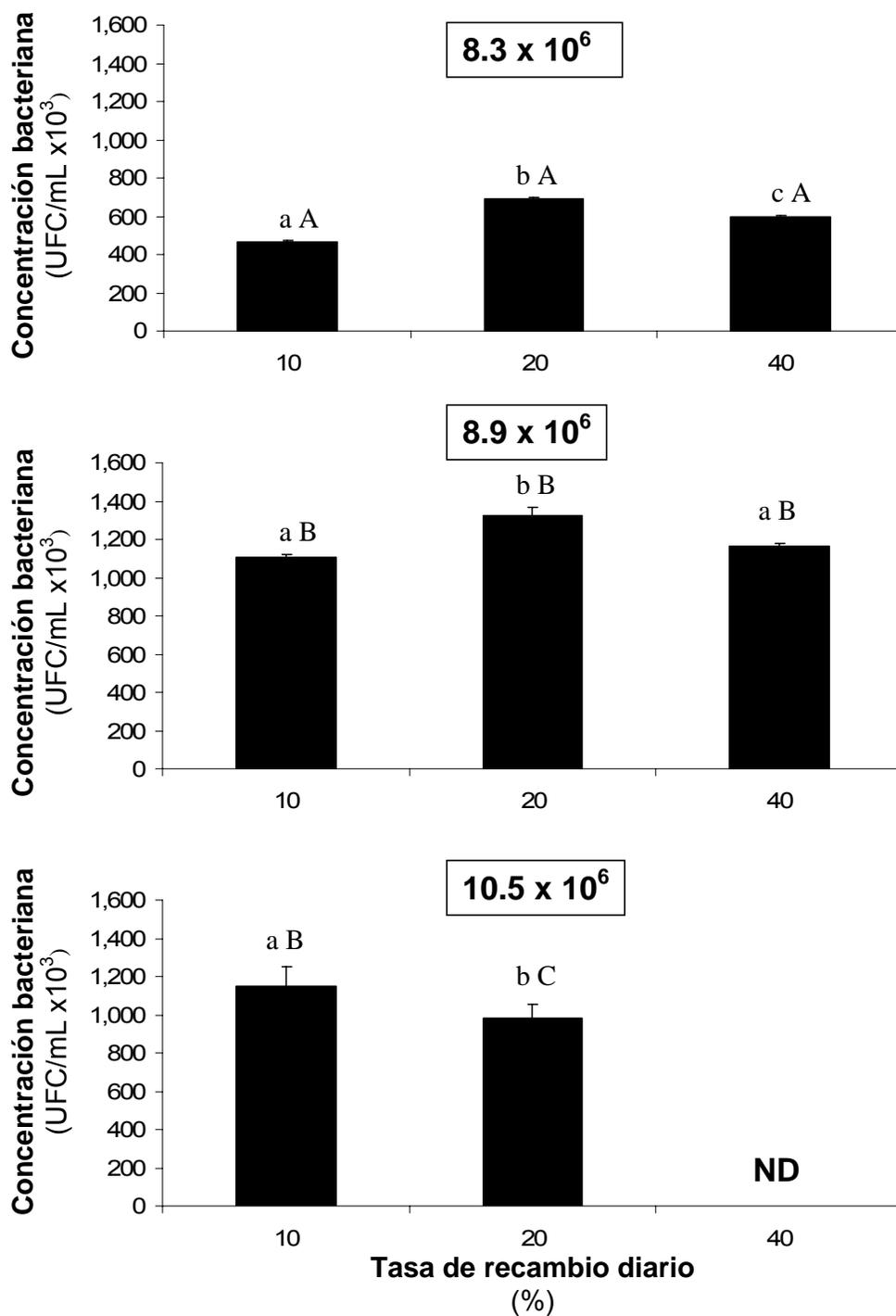


**Figura 17.** Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre el total de células cosechadas de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n = 3$ . ND = no determinado.

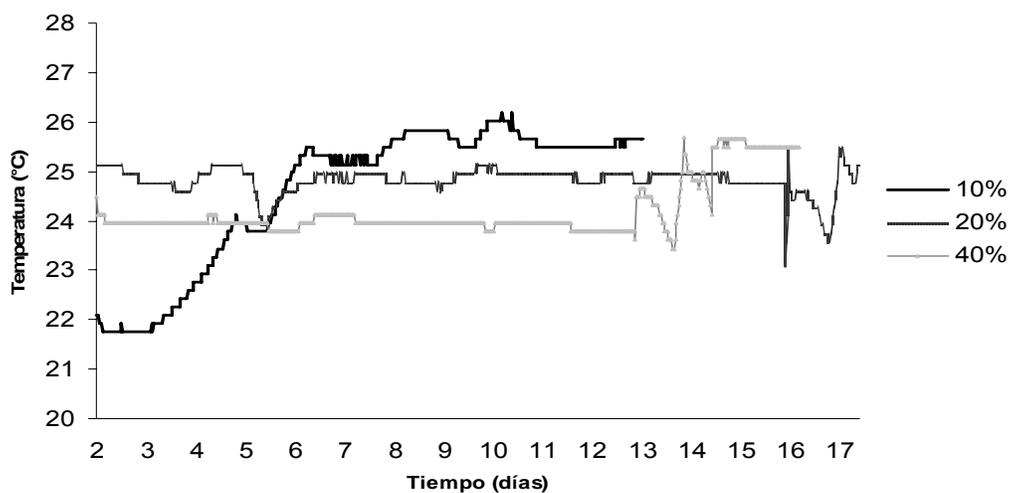
recambio diaria (Figura 18). Sin embargo, si se observó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) de las densidades bacterianas en los tratamientos de concentración de inóculo intermedio y superior. Posiblemente la carga bacteriana asociada al inóculo, produzca el mismo efecto en las poblaciones bacterianas que el ocurre en las poblaciones microalgales.

En la Figura 19 se muestran los registros de temperatura promedio obtenidos con los termógrafos instalados dentro de los reactores de los tres tratamientos de recambio diario. Aquí se puede observar un incremento de la temperatura en los tres tratamientos en relación a la temperatura ambiente del laboratorio ( $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), siendo aproximadamente  $3.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  más alta que la del ambiente en los reactores de 10% de recambio y de  $2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  en los de 40%. La mayor diferencia de temperatura entre tratamientos fue de  $\approx 1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se ignora el efecto de esta diferencia sobre los resultados obtenidos.

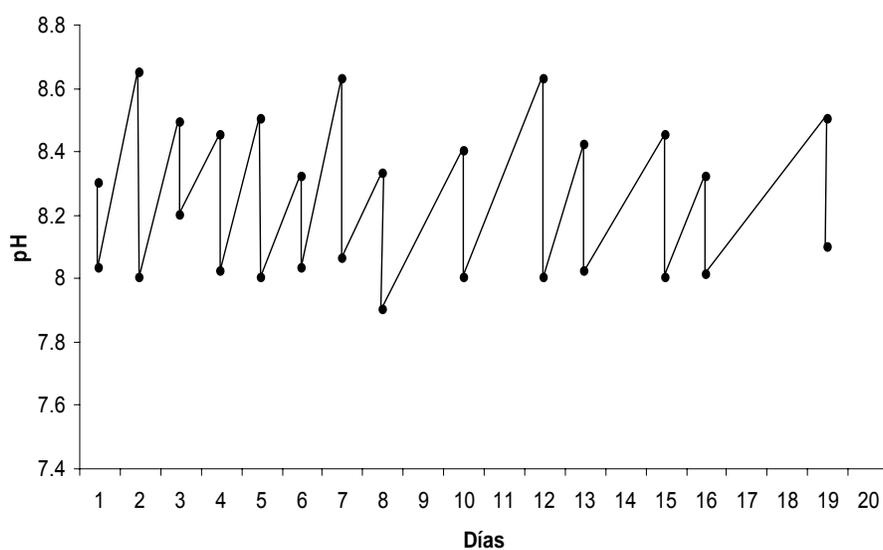
En los experimentos de  $8.3 \times 10^6$  y  $10.5 \times 10^6$  de inóculo, el pH se mantuvo constante con el pH stat a  $\text{pH } 8.0 \pm 3.0$ . Sin embargo, en el experimento  $8.9 \times 10^6$ , el pH fluctuó entre 7.9 y 8.6 ya que éste se reguló manualmente, dando pulsos de  $\text{CO}_2$  durante el día (Figura 20).



**Figura 18.** Efecto de la tasa de recambio diario y de la concentración del inóculo, sobre las concentraciones de heterótrofas marinas en los cultivos cosechados de *Isochrysis galbana*. Letras minúsculas entre tasas de recambio diario a una misma concentración de inóculo, y letras mayúsculas entre concentraciones de inóculo a una misma tasa de recambio diario, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n = 3$ . ND = no determinado.



**Figura 19.** Variación de temperatura en los cultivos de *Isochrysis galbana*, registrada con termógrafos digitales dentro de los reactores, a tres tasas de recambio diario.



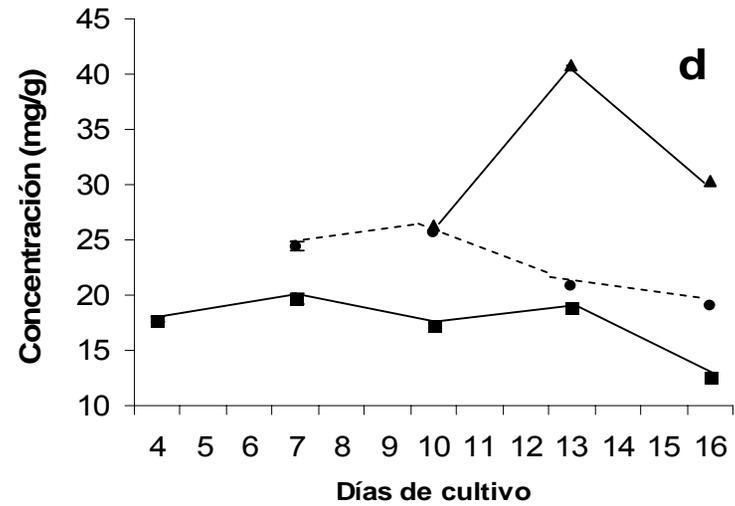
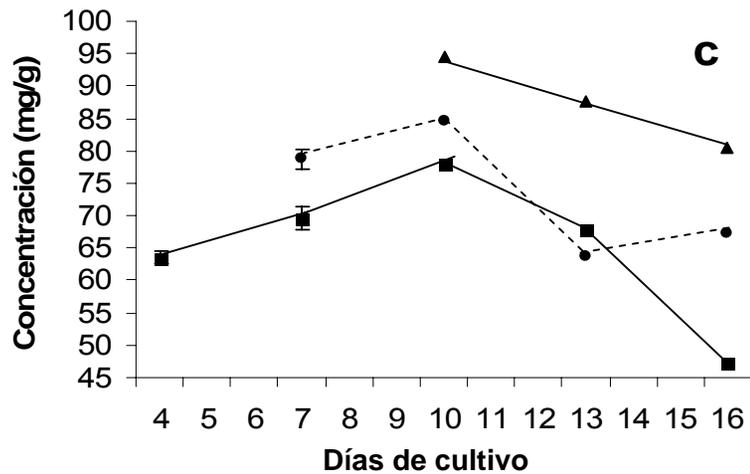
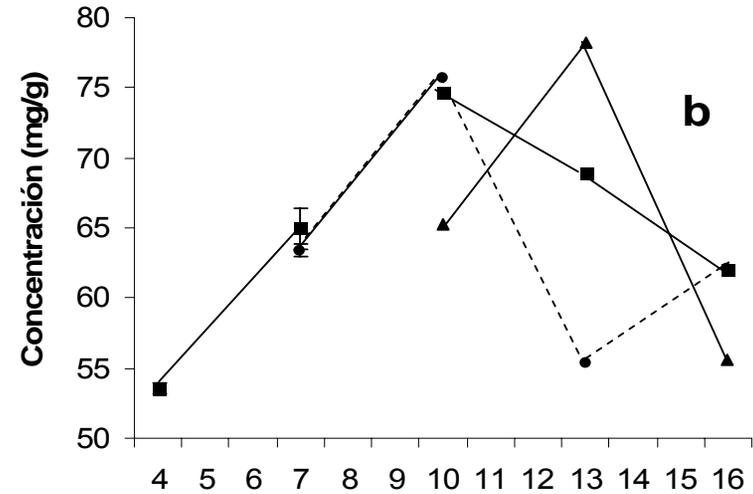
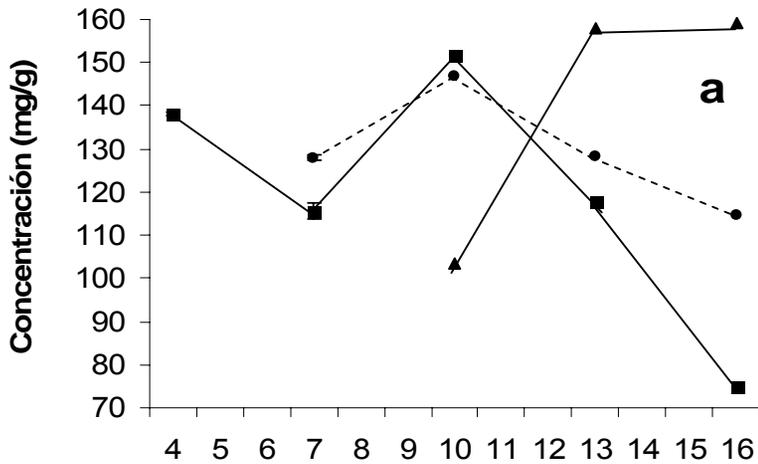
**Figura 20.** Registro de pH a lo largo del cultivo continuo de *Isochrysis galbana* en el experimento  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo.

### 7.3.1 Contenido bioquímico de *Isochrysis galbana*

En la Figura 21 se muestran las variaciones en la concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos de *Isochrysis galbana*, cosechadas del experimento  $8.9 \times 10^6$  cél/mL, a tres tasas de recambio diario. Se aprecia que las concentraciones de las cuatro biomoléculas tienden a incrementarse hacia la mitad de la vida útil del reactor y posteriormente se observa una caída. Estos datos condensados en la Tabla 9 indican un relación inversa entre las concentraciones de las cuatro biomoléculas con las tasas de recambio diario, aunque solamente se encontró un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) en los triglicéridos. En esta tabla, la concentración promedio de proteínas (135.6 mg/g) fue la mas alta, seguida por la de los lípidos (75.5 mg/g), carbohidratos (69.0 mg/g), y finalmente triglicéridos (26.8 mg/g).

**Tabla IX.** Concentración promedio de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos de *Isochrysis galbana* cosechadas durante la vida útil de los reactores del tratamiento  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo, a tres tasas de recambio diario, usando el f/2 como medio de cultivo. Letras diferentes entre filas en una misma columna, indican diferencia significativa  $P < 0.05$ . Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .

Tratamiento (% de recambio diario )	Proteínas (mg/g)	Carbohidratos (mg/g)	Lípidos (mg/g)	Triglicéridos (mg/g)
10	157.9 $\pm$ 1.1	78.2 $\pm$ 0.7	87.6 $\pm$ 0.6	40.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
20	129.3 $\pm$ 1.3	64.1 $\pm$ 0.9	73.58 $\pm$ 1.8	22.4 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>
40	119.6 $\pm$ 1.9	64.8 $\pm$ 1.4	65.20 $\pm$ 1.9	17.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
<b>Promedio</b>	<b>135.6 <math>\pm</math> 19.9</b>	<b>69.0 <math>\pm</math> 7.9</b>	<b>75.5 <math>\pm</math> 11.3</b>	<b>26.8 <math>\pm</math> 12.1</b>



**Figura 21.** Variación en el contenido de proteínas (a), carbohidratos (b), lípidos (c) y triglicéridos (d) de *Isochrysis galbana* del experimento  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo, cultivada en el sistema de flujo continuo a tres tasas de recambio diario: 10% (▲—▲), 20% (●---●) y 40% (■—■).

En la Tabla 10 se presenta el perfil de ácidos grasos de *Isochrysis galbana*, cosechadas en el experimento  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo, a tres tasas de recambio diario. Veinticinco ácidos grasos fueron extraídos e identificados, ocho de los cuales eran saturados, cinco monoinsaturados, ocho poliinsaturados y los cuatro restantes eran altamente poliinsaturados. Los ácidos mas concentrados fueron el 18:2 n6, 14:0, 18:4 n3, 18:3 n3, 22:6 n3, 16:0 y el 18:1 n9. La suma de las concentraciones fueron mayores a 20% de tasa de recambio diario (103.7 mg/g), seguido por el 40% (94.7 mg/g) y finalmente al 10% de recambio diario (83.7 mg/g), aunque estas diferencias no fueron significativas ( $P > 0.05$ ). Solamente se obtuvo un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) de la tasa de recambio sobre la concentración en los ácidos 20:0, 14:1, 16:1 n9, 18:1 n9 y 20:4 n6. Sin embargo, se observó una tendencia a aumentar las concentraciones con la tasa de recambio diaria de los ácidos grasos esenciales eicosapentanoico (EPA) (20:5 n3) y docosahexanoico (DHA) (22:6 n3). En términos porcentuales, el DHA representó aproximadamente el 10% con respecto al total de los aminoácidos.

**Tabla X.** Perfil de ácidos grasos de *Isochrysis galbana* cultivada en reactores de flujo continuo del tratamiento  $8.9 \times 10^6$  de inóculo, a tres tasas de recambio diario. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores de concentración (mg/g) son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .

Ácido graso	Concentración (mg/g)			Porcentaje con respecto al total de aminoácidos			
	10 % de recambio	20 % de recambio	40 % de recambio	10 % de recambio	20 % de recambio	40 % de recambio	
Saturados	12:0	0.02 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.02	0.03	0.05	0.05
	14:0	13.29 $\pm$ 1.51	17.74 $\pm$ 6.91	15.85 $\pm$ 5.80	15.64	17.22	16.14
	15:0	0.25 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.13	0.26 $\pm$ 0.10	0.30	0.31	0.27
	16:0	6.78 $\pm$ 0.42	8.07 $\pm$ 3.17	7.69 $\pm$ 3.02	8.09	7.93	7.78
	17:0	0.03 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.04	0.04	0.04
	18:0	0.14 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.10	0.17	0.16	0.22
	20:0	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.45 <sup>ab</sup>	0.72 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.41	0.66	0.81
	22:0	0.08 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.03	0.09	0.07	0.08
Monoinsaturados	14:1	0.32 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	0.38	0.56	0.51
	16:1 n9	0.04 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.06	0.09	0.24
	16:1 n7	3.98 $\pm$ 0.21	5.18 $\pm$ 2.12	4.40 $\pm$ 1.72	4.89	4.98	4.54
	17:1	0.29 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.13	0.25 $\pm$ 0.13	0.36	0.30	0.25
	18:1 n9	7.99 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	7.54 $\pm$ 3.38 <sup>b</sup>	7.14 $\pm$ 2.92 <sup>ab</sup>	9.18	7.22	7.30
	18:1 n7	0.70 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.35	0.81 $\pm$ 0.35	0.84	0.87	0.82
	16:2 n6	0.05 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.04	0.07	0.09	0.10
	16:2 n4	0.41 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.29	0.53 $\pm$ 0.21	0.51	0.62	0.55
PUFAS	17:2	0.17 $\pm$ 0.00	0.25 $\pm$ 0.10	0.21 $\pm$ 0.09	0.21	0.25	0.21
	18:2 n6	19.07 $\pm$ 0.71	20.08 $\pm$ 8.39	17.26 $\pm$ 8.26	22.93	19.40	17.64
	18:3 n6	1.87 $\pm$ 0.20	2.44 $\pm$ 0.90	2.24 $\pm$ 0.76	2.27	2.41	2.44
	18:3 n3	8.69 $\pm$ 1.46	12.39 $\pm$ 4.16	11.28 $\pm$ 4.56	10.42	12.38	12.06
HUFAS	18:4 n3	8.63 $\pm$ 0.72	14.20 $\pm$ 6.83	13.18 $\pm$ 5.61	10.68	13.22	15.59
	20:4 n6	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.26	0.22	0.17
	20:5 n3	0.53 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.30	0.59 $\pm$ 0.23	0.65	0.64	0.61
	22:5	0.65 $\pm$ 0.12	0.73 $\pm$ 0.34	0.75 $\pm$ 0.30	0.76	0.69	0.81
	22:6 n3	9.17 $\pm$ 1.71	10.15 $\pm$ 4.54	10.25 $\pm$ 4.31	10.74	9.64	10.80
<b>Total</b>	<b>83.7</b>	<b>103.7</b>	<b>94.7</b>				

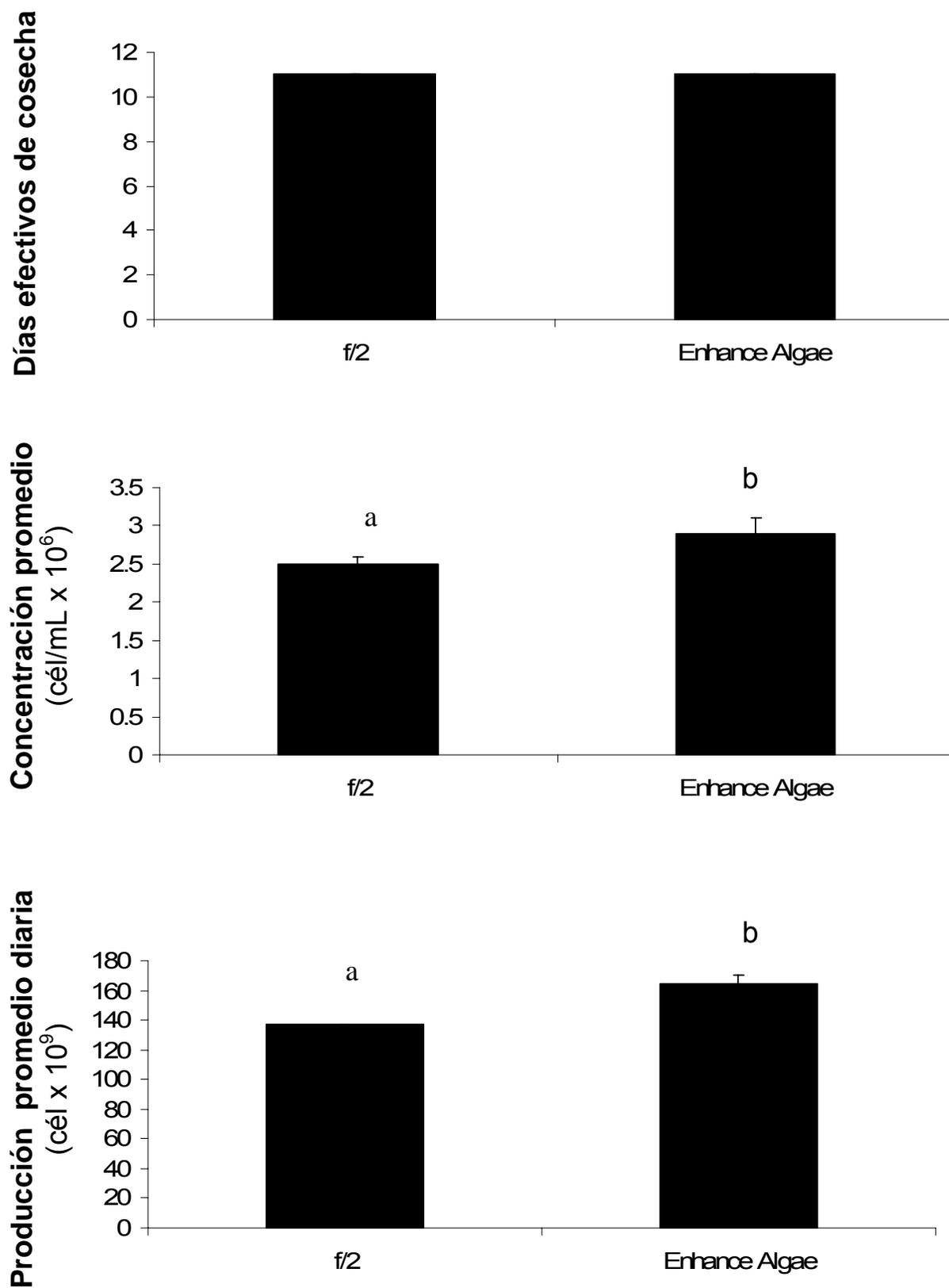
#### **7.4 Efecto comparativo del medio f/2 vs. Enhance Algae sobre el rendimiento y la calidad de *Isochrysis galbana***

En el Anexo 3, se presentan las variaciones en las concentraciones celulares por día, la producción diaria y acumulada de células y litros de cultivo, y la concentración de bacterias (medio 2216), por cada reactor en los tratamientos con f/2 y Enhance Algae. Estos datos se condensan en la Tabla 11 y se ilustran en las Figuras 22 y 23. En la Figura 21 se aprecia que no hubo un efecto del medio de cultivo sobre la vida útil de los reactores, siendo ésta de 11 días en ambos tratamientos. Sin embargo se registró un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) de la concentración celular, cuando se empleó Enhance Algae, elevándose de  $2.5 \times 10^6$  cél/mL en f/2 a  $2.9 \times 10^6$  cél/mL en Enhance Algae. En consecuencia, la producción de células diarias y totales (Figuras 22 y 23) fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en ese medio, habiéndose producido  $164 \times 10^9$  células por día y un total de  $1.8 \times 10^{12}$  células durante los 11 días efectivos de cosecha. Debido a la misma vida útil de los reactores y a que se empleó la misma tasa de recambio diario (40%), no hubo diferencias significativas en el volumen total cosechado (Figura 23). Durante el experimento, no se detectaron bacterias TCBS+, y las concentraciones de heterótrofas marinas fueron similares entre tratamientos ( $\approx 1.2 \times 10^6$  UFC/mL).

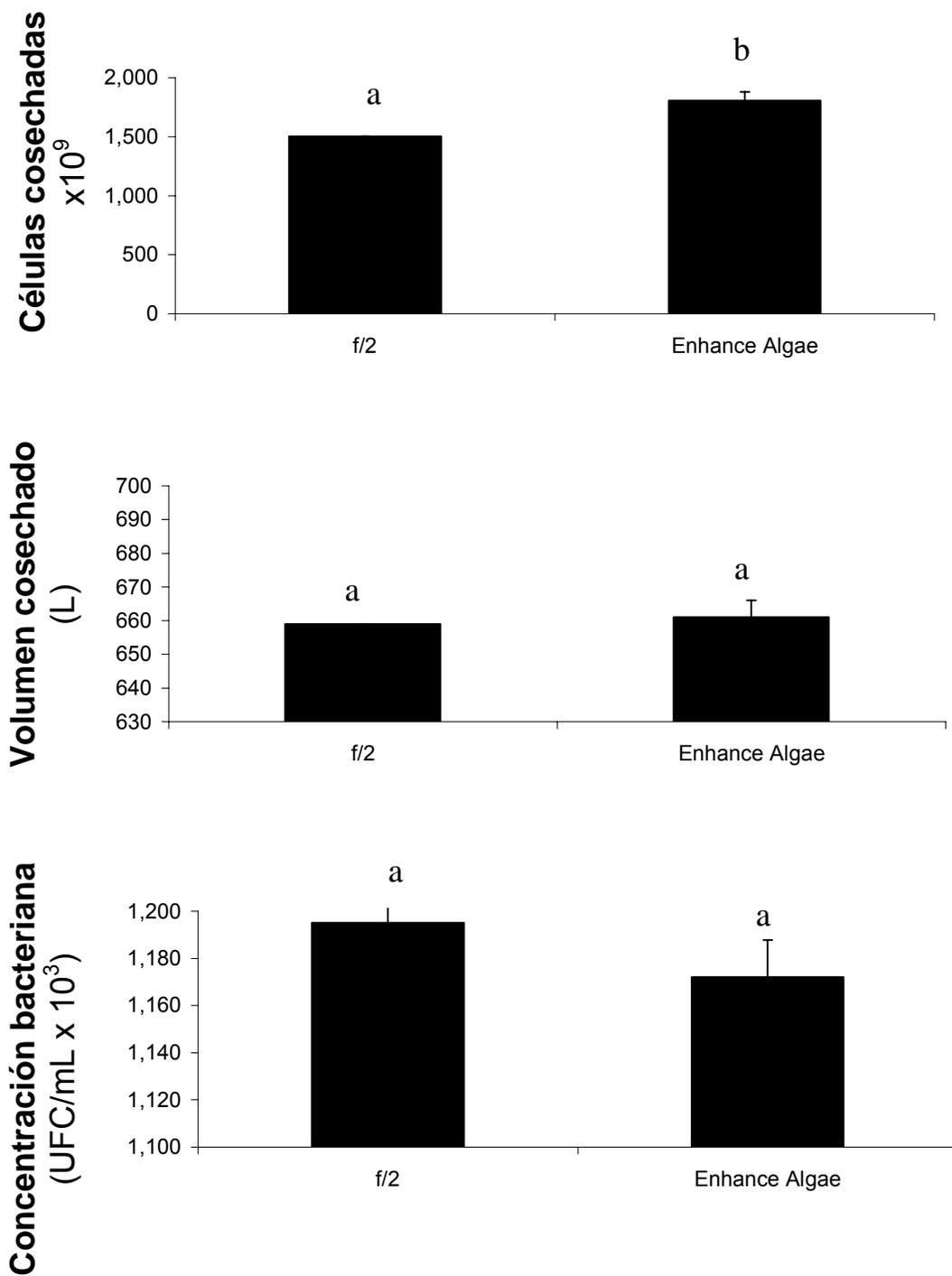
**Tabla XI.** Días efectivos de cosecha, concentración celular promedio y producción diaria y total de microalgas (*Isochrysis galbana*) en reactores de flujo continuo a 40% de tasa de recambio diario y  $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo, con f/2 y Enhance Algae como medios de cultivo. Además se muestran las concentraciones bacterianas promedio de heterótrofas marinas cultivadas en medio 2216. Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .

Reactor	Medio de cultivo	Días de cultivo	Días efectivos de cosecha	Concentración promedio (cél. $\times 10^6$ )	Producción		Concentración bacteriana (UFC/mL $\times 10^3$ )	
					Diaria (cél. $\times 10^9$ )	Total (L) (cél. $\times 10^9$ )		
1	f/2	15	11	$2.5 \pm 0.2^a$	137 <sup>a</sup>	659	1,505 <sup>a</sup>	$1,195.0 \pm 40.9$
2	f/2	13	9*	$2.6^* \pm 0.2^a$	144 <sup>a*</sup>	472*	1,300 <sup>a*</sup>	$1,177.0 \pm 26.9^*$
3	f/2	09	5*	$2.5^* \pm 0.3^a$	124 <sup>a*</sup>	301*	618 <sup>b*</sup>	$1,120.0 \pm 28.2^*$
<b>Promedio</b>		<b>12</b>	<b>11</b>	<b><math>2.5 \pm 0.2^a</math></b>	<b>137<sup>a</sup></b>	<b>659</b>	<b>1,505<sup>a</sup></b>	<b><math>1,195.0 \pm 40.9</math></b>
4	Enhance	15	11	$3.0 \pm 0.1^b$	168 <sup>b</sup>	661	1,846 <sup>c</sup>	$1,160.0 \pm 5.36$
5	Enhance	15	11	$2.7 \pm 0.1^a$	157 <sup>b</sup>	657	1,722 <sup>c</sup>	$1,171.7 \pm 9.5$
6	Enhance	15	11	$2.9 \pm 0.2^b$	168 <sup>b</sup>	666	1,849 <sup>c</sup>	$1,184.6 \pm 31.8$
<b>Promedio</b>		<b>15</b>	<b>11</b>	<b><math>2.9 \pm 0.2^b</math></b>	<b>164 <math>\pm</math> 6<sup>b</sup></b>	<b>661 <math>\pm</math> 5</b>	<b>1,806 <math>\pm</math> 72<sup>b</sup></b>	<b><math>1,172.1 \pm 15.6</math></b>

(\*).- Ruptura accidental del reactor. Por lo tanto, los datos no se consideraron en el cálculo de los promedio.



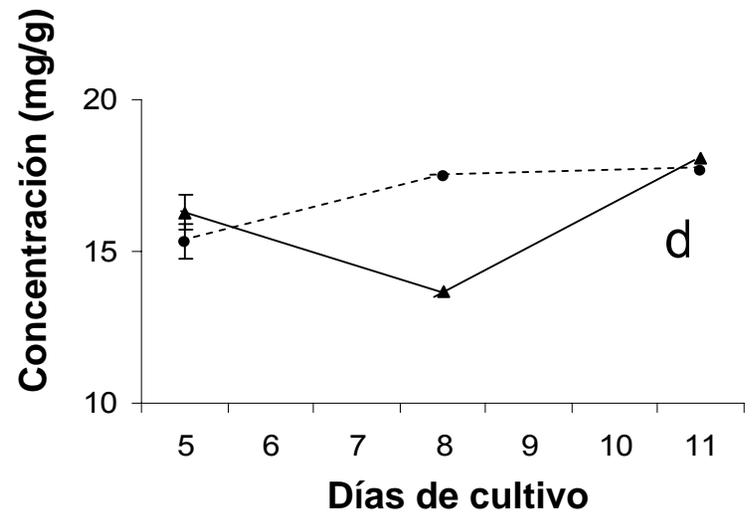
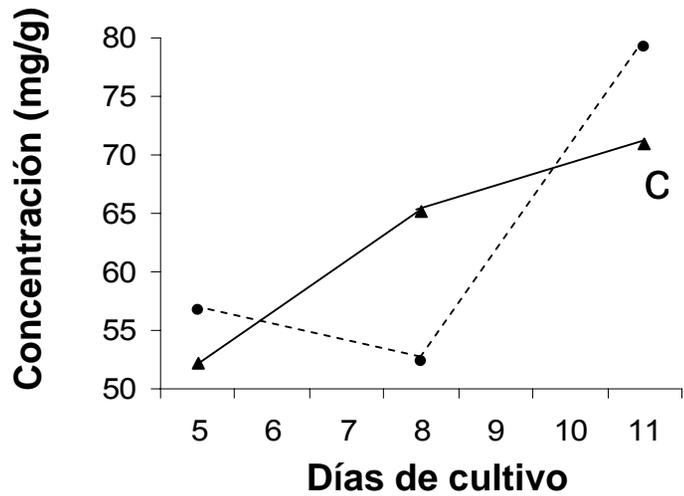
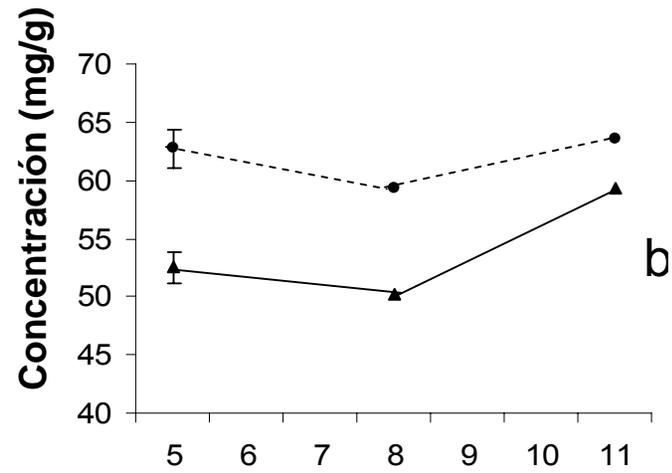
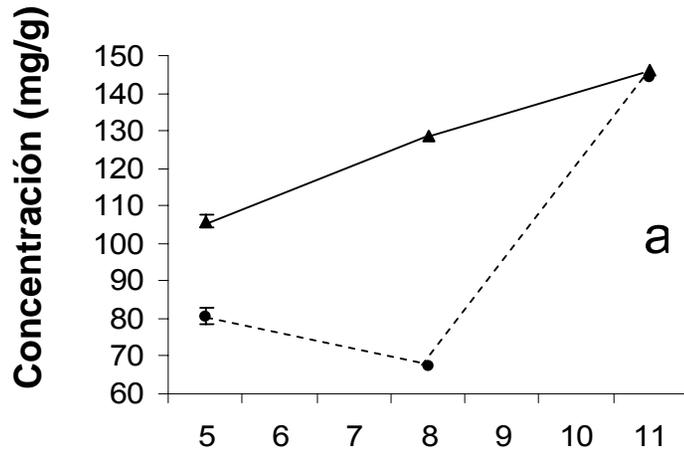
**Figura 22.** Efecto del medio de cultivo (f/2 y Enhance Algae), sobre la vida útil de los reactores, la concentración promedio y la producción promedio diaria de *Isochrysis galbana* a una tasa de recambio diario del 40%. Letras minúsculas entre medios de cultivo indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



**Figura 23.** Efecto del medio de cultivo (f/2 y Enhance Algae), sobre el total de células cosechadas, el volumen cosechado y la concentración de heterótrofas marinas en los cultivos de *Isochrysis galbana*, a una tasa de recambio diario del 40%. Letras minúsculas entre medios de cultivo indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 7.4.1 Contenido bioquímico de *Isochrysis galbana*, cultivada en medio f/2 y Enhance Algae

En la Figura 24 se muestran las variaciones en la concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos de *I. galbana*, cultivada a una tasa de recambio diario del 40%. Se aprecia una tendencia hacia el incremento en las proteínas y lípidos en medio f/2 y en los triglicéridos en Enhance Algae. Sin embargo, en las proteínas y lípidos de Enhance Algae, en los carbohidratos de ambos medios y en los triglicéridos de f/2, se observó un decremento en las concentraciones a la mitad del periodo de cultivo. Estos datos condensados en la Tabla XII indican que no hubo diferencias significativas en los promedios de estas biomoléculas ( $P > 0.05$ ), aunque se observa una mayor concentración promedio de proteínas en f/2 que en Enhance Algae. Las concentraciones de las cuatro biomoléculas fueron similares a las obtenidas en el tratamiento comparable del experimento anterior ( $8.9 \times 10^6$  cél/mL de inóculo y 40% de tasa de recambio diario, Tabla 11).



**Figura 24.** Variación en el contenido de proteínas (a), carbohidratos (b), lípidos (c) y triglicéridos (d) de *Isochrysis galbana*, cultivada en el sistema de flujo continuo de agua de mar enriquecida con los medios f/2 (▲—▲) y Enhance Algae (●---●).

**Tabla XII.** Concentración promedio de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos de *Isochrysis galbana* cosechadas durante la vida útil de los reactores de flujo continuo al 40% de tasa de recambio diario, empleando f/2 y Enhance Algae como medios de cultivo. Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n=3$ .

Medio de cultivo	Proteínas (mg/g)	Carbohidratos (mg/g)	Lípidos (mg/g)	Triglicéridos (mg/g)
f/2	126.7 $\pm$ 1.0	54.0 $\pm$ 0.8	62.7 $\pm$ 1.1	16.0 $\pm$ 0.3
Enhance algae	97.3 $\pm$ 1.5	61.8 $\pm$ 1.2	62.7 $\pm$ 1.5	16.8 $\pm$ 0.3

En la Tabla 12 se presenta el perfil de ácidos grasos de *Isochrysis galbana*, cosechadas de los reactores con f/2 y Enhance Algae, al 40% de tasa de recambio diario. Se identificaron los mismos 25 ácidos grasos reportados en el experimento anterior, ocho de los cuales eran saturados, cinco monoinsaturados, ocho poliinsaturados y los cuatro altamente poliinsaturados. Los ácidos mas concentrados fueron los mismos que en dicho experimento pero en este caso el 18:4 n3 estuvo mas concentrado que el 18:2 n6, seguidos por 14:0, 22:6 n3, 18:3 n3, 16:0 y el 18:1 n9. Solamente se obtuvo un efecto significativo ( $P<0.05$ ) del medio de cultivo sobre la concentración en los ácidos 18:0 y el araquidónico (20:4 n6). Sin embargo, se observó que las concentraciones de los ácidos grasos esenciales eicosapentanoico (EPA) (20:5 n3) y docosahexanoico (DHA) (22:6 n3) en Enhance Algae, fueron mas altas pero no significativas ( $P>0.05$ ) que en f/2. En términos porcentuales, el DHA representó el 10.7% con respecto al total de los aminoácidos.

**Tabla XIII.** Perfil de ácidos grasos obtenidos de la microalga *Isochrysis galbana* cultivada en reactores de flujo continuo de 200L de capacidad, a 1 nivel de recambio (40%) y dos nutrientes (Medio f/2 de Guillard y Enhance algae). Letras minúsculas diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los valores expresados en mg/g son la media  $\pm$  la desviación estándar  $n=3$ .

Ácido graso	Concentración (mg/g)		Porcentaje con respecto al total de aminoácidos		
	f/2 Guillard	Enhance algae	f/2 Guillard	Enhance algae	
Saturados	12:0	0.03 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 6.87	0.04	0.03
	14:0	12.05 $\pm$ 0.78	12.96 $\pm$ 2.96	14.44	13.96
	15:0	0.17 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.04	0.21	0.21
	16:0	5.06 $\pm$ 0.20	5.42 $\pm$ 1.31	5.88	5.82
	17:0	0.02 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.03	0.09
	18:0	0.10 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.13	0.09
	20:0	0.86 $\pm$ 0.12	0.99 $\pm$ 0.14	0.96	1.12
Monoinsaturados	22:0	0.04 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.05	0.06
	14:1	0.52 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.08	0.58	0.50
	16:1 n9	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.13	0.11
	16:1 n7	3.24 $\pm$ 0.14	3.49 $\pm$ 0.87	3.72	3.74
	17:1	0.13 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.03	0.17	0.17
	18:1 n9	4.58 $\pm$ 0.25	5.04 $\pm$ 0.97	5.47	5.69
	18:1 n7	0.47 $\pm$ 0.00	0.54 $\pm$ 0.11	0.55	0.60
	16:2 n6	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.12	0.12
PUFAS	16:2 n4	0.49 $\pm$ 0.06	0.53 $\pm$ 0.15	0.54	0.56
	17:2	0.14 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.04	0.15	0.17
	18:2 n6	11.05 $\pm$ 0.48	13.03 $\pm$ 2.78	13.75	14.55
	18:3 n6	2.07 $\pm$ 0.18	2.46 $\pm$ 0.54	2.32	2.70
	18:3 n3	8.55 $\pm$ 0.65	9.98 $\pm$ 2.23	9.41	10.96
HUFAS	18:4 n3	14.90 $\pm$ 2.15	17.54 $\pm$ 3.37	16.33	19.81
	20:4 n6	0.11 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.14	0.18
	20:5 n3	0.41 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.12	0.46	0.55
	22:5	0.52 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.11	0.60	0.71
	22:6 n3	7.46 $\pm$ 0.97	10.17 $\pm$ 2.39	8.74	10.77

## VII. DISCUSIÓN

La producción de microalgas es una actividad rutinaria en los laboratorios de cultivo intensivo de juveniles de organismos marinos y representa un porcentaje elevado de los costos totales de producción. No obstante, poco es el esfuerzo realizado para reducir costos, mediante el empleo de sistemas de producción mas eficientes como el que aquí se ha evaluado. Este sistema de flujo continuo está basado en el sistema británico Seacaps, el cual es usado en algunas partes del mundo. Sin embargo, no existe una evaluación de su funcionamiento ni del rendimiento en términos de la cantidad de células ni de su calidad. El único reporte que se ha encontrado es el de McKeon (1984) quien describe el sistema y brinda datos de crecimiento de la microalga *Skeletonema costatum* como alimento de larvas y juveniles de *Crassostrea gigas* en Guernsey Sea Farms. Su sistema empleaba reactores de 350 L de capacidad instalados en un invernadero a 18-22 °C, los cuales recibieron una iluminación combinada de luz solar durante el día y luz blanca fluorescente durante la noche. No se indican las intensidades aplicadas provenientes de ambas fuentes lumínicas. Los cultivos partieron de inóculos de 11.5 millones de cél/mL, y se empleó un medio de cultivo (Solución C) similar al f/2. Los resultados indican una producción de 1,580 L por cada reactor (4.5 veces el volumen del reactor) en los 17 días de cultivo, los cuales contenían un total de  $4.3 \times 10^{12}$  células de *Skeletonema costatum*. Las densidades celulares variaron entre  $0.2$  y  $10.2 \times 10^6$  cél/mL. Desafortunadamente, en esta evaluación además de desconocerse la intensidad lumínica empleada, el flujo no fue constante ya que éste se reguló cuando se

detectaron incrementos o decrementos en las concentraciones celulares. Además, no se reportan repeticiones ni se evaluó la calidad bacteriológica ni bioquímica de las microalgas. No obstante, por tratarse de la única información publicada, en la Tabla 14 se contrastan estos datos contra los máximos obtenidos en el presente trabajo. Aquí se puede observar que la cantidad de células producidas y el rango de densidades celulares fue mayor en nuestro sistema, a pesar del mayor volumen del reactor y de la concentración del inóculo del Seacaps. Posiblemente estas diferencias se deban a diferencias fisiológicas entre especies, pero también a una mayor penetración de la luz en los reactores de 200L en comparación a los de 350L, a una mayor temperatura en el sistema evaluado y al flujo irregular con que operaron el Seacaps.

Tabla XIV. Comparación del rendimiento del sistema "Seacaps" reportado por McKeon, (1984) contra el obtenido en el presente trabajo.

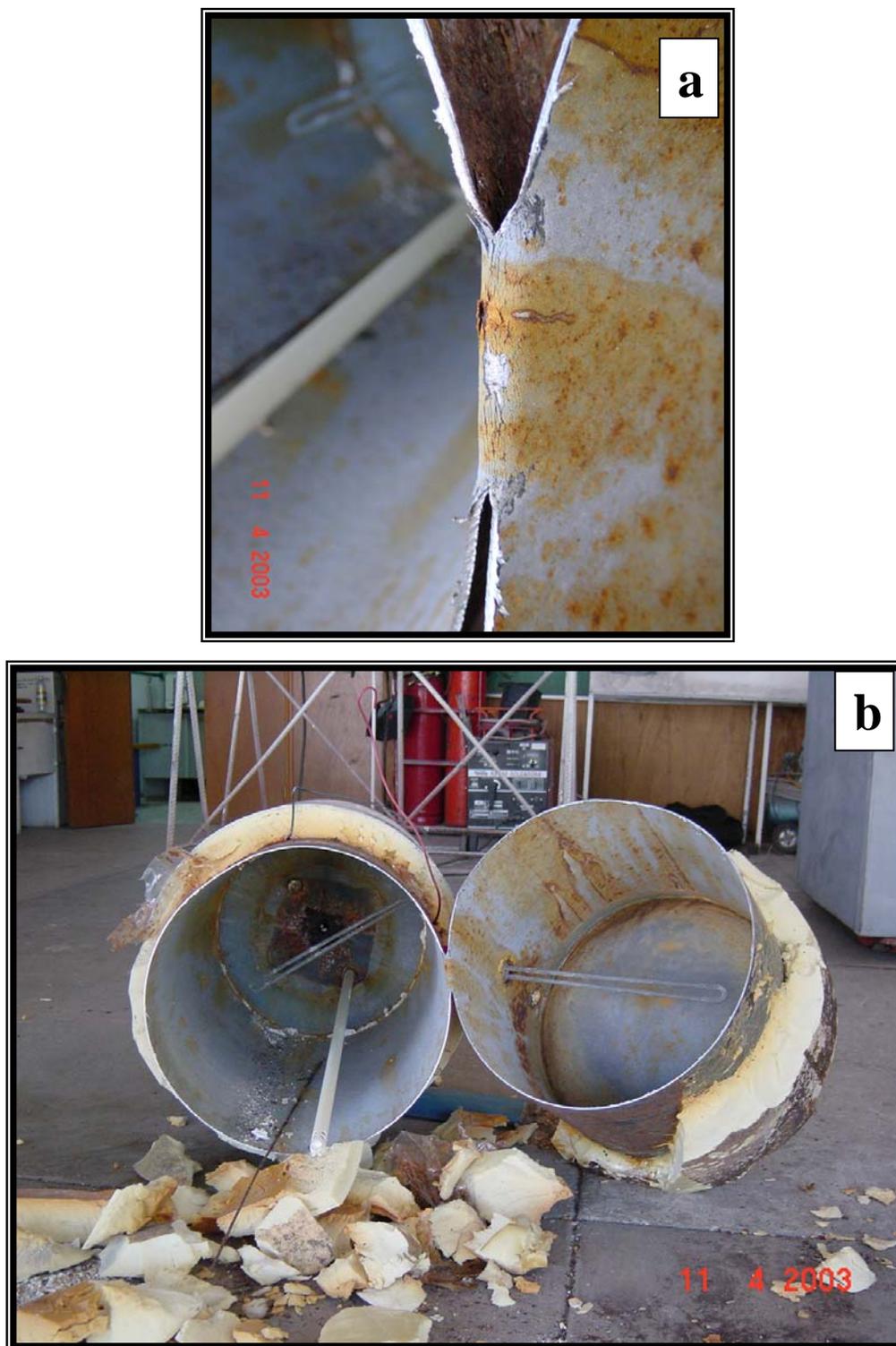
Referencia	Especie Microalgal	Volumen del reactor (L)	Concentración del inóculo (cél/mL x 10 <sup>6</sup> )	Vida media del reactor (días)	Rango de densidades celulares (x 10 <sup>6</sup> )	Células producidas (x 10 <sup>12</sup> )
McKeon (1984)	<i>Skeletonema costatum</i>	350	11.5	17	0.2 - 10.2	4.3
Este trabajo	<i>Isochrysis galbana</i>	200	10.5	19	2.1-15.1	5.9

En este trabajo se demostró la importancia de la concentración del inóculo como un factor clave para el éxito de los cultivos en reactores y se demostró que no es importante la cantidad de células inoculadas. En el tratamiento 10.5 x 10<sup>6</sup> donde se obtuvo el mejor rendimiento, los reactores se inocularon con solamente

2.2 L de cultivo conteniendo  $2.3 \times 10^{10}$  células (Tabla 2), mientras que en los tratamientos restantes éstos se inocularon con mas de 5.5 L y con mas del doble de células. La explicación a este fenómeno se encuentra en **CONSULTAR A KITTY XXXXX???** Y PEDIRLE BIBLIOGRAFÍA AL RESPECTO

En el presente trabajo se demostró la factibilidad de producir inóculos de buena calidad en garrafones de plástico desechables de 5L, los cuales usan las compañías que empañan agua potable. Estos garrafones con agua de mar y los nutrientes se esterilizaron en el horno de microondas por 20 min, tiempo que fue determinado en experimentos preliminares. Esta es una alternativa para aquellos laboratorios que no cuentan con autoclave y que no desean usar la clorinación-neutralización como método de esterilización. De acuerdo con los resultados de este trabajo, en los protocolos 1:10:10:10 se obtuvieron  $8 \times 10^6$  cél/mL en 12 días, las cuales serían insuficientes para inocular los reactores. La solución está en prolongar los cultivos en la etapa final de 5 L hasta el día 18, tal y como se hizo para producir los inóculos de  $10.5 \times 10^6$  cél/mL.

Con respecto al sistema de pasteurización, se mencionó el uso de un boiler doméstico para calentar el agua de mar a pesar de su propiedad altamente corrosiva. En experimentos preliminares se encontró que el tanque de estos aparatos está recubierto de un tipo de porcelana (Figura 25a) que evita la corrosión del tanque (Figura 25b). Este es un hallazgo importante porque evita la adquisición de boilers de alto costo que emplean calentadores de titanio.



**Figura 25.** Fotografías del interior de un boiler de uso doméstico usado para calentar el agua de un pasteurizador durante mas de un año en el CIBNOR. a). Se aprecia el recubrimiento anticorrosivo de la porcelana y en la parte inferior b), se muestra el interior del boiler con sus dos resistencias.

Uno de los problemas que presenta el sistema es la ruptura de las bolsas de polietileno. En este trabajo se reportaron algunos incidentes que no permitieron la continuación de los experimentos e incluso impidió que se generaran los datos de producción en el tratamiento  $10.5 \times 10^6$  cél/mL de inóculo a la máxima tasa de recambio diario (40%). Una alternativa que se debe explorar es la adquisición de polietileno de mayor calibre (800).

Otro de los problemas que se demostraron en la operación del sistema fue la elevación gradual de la temperatura, la cual fue de hasta  $3.5$  °C superior a la temperatura ambiente en el tratamiento de menor tasa de recambio. Sin embargo, cuando el operario está conciente de este fenómeno producido por la radiación de los focos, podría tomar la alternativa de bajar la temperatura del cuarto de cultivo, resultando en un mayor gasto de energía. La instalación del sistema en un invernadero tendría que evaluarse desde el punto de vista técnico pero también financiero.

Con respecto al pH se demostró la conveniencia de contar con un pH stat, ya que si el ajuste de pH se realiza manualmente se incrementará la amplitud de los valores de esta variable tan importante en la producción de microalgas.

En invertebrados, la fase crítica del desarrollo donde los organismos son altamente susceptibles a estas bacterias es la fase larvaria (Luna, 2003). Las bacterias patógenas con mayor virulencia para las larvas de moluscos son las del género *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, las cuales son bacterias mesofílicas aerobias cuyas formas de resistencia toleran una exposición a la temperatura máxima de  $54$  °C. En este trabajo se demostró una alta eficiencia del

pasteurizador para reducir y eliminar la carga bacteriana del agua que penetra al sistema. Los resultados de la evaluación fueron consistentes con lo encontrado mas tarde en los experimentos, donde en ninguna ocasión se detectaron bacterias TCBS+. Es importante señalar la elevación en las concentraciones de bacterias heterótrofas marinas de  $3 \times 10^3$  UFC/mL en la fase de inóculo, a  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL en algunos tratamientos en la fase de reactor. Las altas concentraciones bacterianas posiblemente limiten el crecimiento microalgal, pero sin embargo, se llegaron a registrar concentraciones de  $15 \times 10^6$  cél/mL. Es factible que la carga bacteriana asociada a los cultivos microalgales sea benéfica, ya que además de que no dejan nichos que pudiesen ocupar bacterias patógenas oportunistas, es posible que sirvan como alimento de larvas y juveniles bajo cultivo.

En cuanto a la comparación entre medios de cultivo, se registró un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la concentración celular con medio Enhance algae, lo cual impactó positivamente sobre la producción de células diarias y totales. No hubo diferencias significativas en los promedios de concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos y triglicéridos ( $P > 0.05$ ), aunque se observó una mayor concentración promedio de proteínas en f/2 que en Enhance Algae. Las concentraciones de EPA y DHA en Enhance algae, fueron mas elevadas que en f/2 aunque estas diferencias no fueron significativas ( $P > 0.05$ ). Una explicación a los mejores resultados con Enhance Algae está en una elevada concentración de los componentes de la fórmula en este medio (Anexo 1). Se observa que el Enhance Algae contiene 20.6 % mas nitrógeno, 10.5 % mas fósforo y cobre, 11.4

% mas zinc, además de una concentración mayor (2.5 %) de vitaminas (tiamina y biotina). Se ignoran los fundamentos en que se basaron los fabricantes de este producto de origen Chileno. Adicional al mejor desempeño, existe una ventaja económica del Enhance Algae sobre el f/2 preparado con reactivos analíticos. El medio f/2 cuesta 5.99 veces mas que el primero ya que un kilogramo de Enhance Algae con un costo de \$9.00 dólares norteamericanos permite nutrir 10,000 L de cultivo, mientras que el f/2 que cuesta \$4.65 dólares norteamericanos, da un rendimiento de 1,000 L (C. Aldana, Lab. de microalgas CIBNOR).

En cuanto al perfil de ácidos grasos, los resultados mostraron un total de 25 en ambos experimentos. Las concentraciones de dichos ácidos grasos, coinciden con lo reportado por Volkman, *et al.*, (1981) donde menciona como los más abundantes al ácido graso 14:0, 16:0, 18:1(n-9), 18:4(n-3) y al 22:6(n-3). Pillsbury (1985) reporta resultados similares. En el primer experimento del presente trabajo, donde se comparó el efecto de la tasa de recambio diario, se encontraron diferencias significativas principalmente en PUFAS (ácidos grasos poliinsaturados) y HUFAS (ácidos grasos altamente insaturados). Brown, *et al.*, (1989), mencionan que los cambios producidos en las condiciones del cultivo como la intensidad de la luz, nutriente suministrado, periodo de luz: ciclos oscuros y luminosos, suministro de CO<sub>2</sub> así como la temperatura, pueden llevar a cambios en la composición de los ácidos grasos. Sin embargo, en el experimento del presente trabajo, no se llevaron a cabo cambios en los parámetros mencionados anteriormente a lo largo del cultivo. Así, puede decirse que el tratamiento que más PUFA's y HUFA's presentó, fue el 20% de recambio

diario. Sobre éste factor, la bibliografía es escasa en cuanto a la obtención del perfil de ácidos grasos. Con respecto al segundo experimento donde se compararon dos tipos de nutrientes, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, La concentración del ácido graso saturado (18:0) y al ácido araquidónico (20:4 n6), fue más elevado en los cultivos nutridos con Enhance algae que los nutridos con f/2 de Guillard. Lo anterior, quizás sea debido al hecho de que el nutriente Enhance algae, se encuentre más concentrado en cuanto a los nutrientes esencialmente requeridos por la célula. Orcutt y Patterson (1984) mencionan que una variación en algún nutriente esencial, puede producir cambios en la concentración de los lípidos y ácidos grasos de la célula durante el cultivo. Kanazawa *et al.*, (1979), comenta que muchos animales marinos presentan una habilidad limitada para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS). Ejemplos donde estos PUFA's son considerados esenciales y de suma importancia comercialmente hablando, incluye a la mayoría de especies de moluscos bivalvos y gasterópodos (Langdon y Waldock, 1981) y larvas de peneidos (Kanazawa, 1985). Asimismo, Webb y Chu (1983) mencionan que, aunque algunos organismos no tengan necesidad esencial de ingerir estos PUFA's, los grados de crecimiento y supervivencia de las larvas, usualmente se incrementa cuando estos ácidos grasos son incluidos en la dieta. Con estos antecedentes queda demostrada la conveniencia del uso del sistema de flujo continuo aquí evaluado.

## VIII. CONCLUSIONES

- 1.- El pasteurizador tuvo una eficiencia del 94.8 % de eliminación de bacterias heterótrofas marinas y el 100% de eficiencia para las TCBS+.
- 2.- Las mayores concentraciones de inóculo ( $8 \times 10^6$  cél/mL) se obtuvieron en los protocolos con factores de dilución 1:10:10:10 y contenedores finales garrafón y bosa de 5,000 mL, en 12 días de cultivo.
- 3.- Se demostró la factibilidad de esterilizar con microondas (1000 Watts; 20 min) los contenedores y medio de cultivo de 5,000 mL para los inóculos.
- 4.- La vida útil de los reactores se incrementa cuando se emplean inóculos densos  $\geq 10.5 \times 10^6$  cél/mL.
- 5.- A pesar de la reducción en las concentraciones a las mayores tasas de recambio diario, la producción promedio diaria se incrementó significativamente conforme aumentó la tasa de recambio, debido a un mayor impacto del volumen cosechado, que el que tuvo la concentración celular.
- 6.- No se registraron bacterias TCBS+ en los cultivos.

7.- No se observó un patrón definido en la concentración de heterótrofas marinas debido a la tasa de recambio diario.

8.- Se registró un incremento de la temperatura en los tres tratamientos en debido a la radiación emitida por los focos.

9.- Se comprobó que el pH stat mantuvo este parámetro dentro de los valores deseados.

10.- Se encontró una relación inversa entre las concentraciones de las cuatro biomoléculas con las tasas de recambio diario, aunque solamente se encontró un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) en los triglicéridos.

11.- Veinticinco ácidos grasos fueron extraídos e identificados de *I. galbana*.

12.- Se observó una tendencia al incremento de las concentraciones de ácidos grasos esenciales eicosapentanoico (EPA) (20:5 n3) y docosahexanoico (DHA) (22:6 n3), conforme aumentó la tasa de recambio diaria.

13.- No hubo un efecto del tipo de medio de cultivo (f/2 vs. Enhance Algae), sobre la vida útil de los reactores, siendo ésta de 11 días en ambos tratamientos.

14.- Se registró un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) de la concentración celular, cuando se empleó Enhance Algae, y en consecuencia, la producción de células diarias y totales fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en ese medio.

15.- El sistema de producción continua de microalgas probado, tiene la capacidad de producir un total de  $5.9 \times 10^{12}$  células y 780 L de cultivo por reactor, libre de bacterias TCBS+, con  $9.8 \times 10^5$  UFC/mL de heterótrofas marinas, y a una concentración de  $7.6 \times 10^6$  cél/mL en 19 días. Para ello es necesario partir de inóculos a alta densidad  $\geq 10.5 \times 10^6$  cel/mL, a una tasa de recambio diario de 40%, pH menor a 8.6, 33 ups de salinidad y 24-26 °C de temperatura.

16.- El sistema evaluado representa una alternativa para la producción masiva de microalgas.

## IX. BIBLIOGRAFIA

Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J.P., Torres, E. y Herrero, C. 1985. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidad de La Coruña. p.p. 210.

Ballard, K. y Taub, F.B. 1972. Algal production for sheil fish feeds. Proc. Nat. Shellfish Ass. 62:1-2.

Becker, E.W.1994. Microalgae: Biotrchnology and Microbiology. Cambridge University Press. Cambridge, New York. 293 pp.

Behr, W. y 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.

Bradford, M.M. 1976. Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Brindley, C., Molina-grima, E., Acién-Fernández, F., Sánchez, J.A., Fernández, J.M., y M. G. Guerrero. 2002. Algal Biotechnology, a sea of opportunities: Book of Abstracts. Universidad de Almería, España.310 pp.

Brown, R.M., W.S. Jeffrey y D.C. Garland. 1989. Nutricional aspects of microalgae used in mariculture : A literatura review. CSIRO Marine Laboratories Report 205: 1-44.

Burlew, J.S. 1953. Current status of the large-scale culture of algae. En: Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant. Burlew, J.S., 3ed. No. 600, pp: 3-23, Carnegie Institution of Washington, Washington D.C.

Coll-Morales, J. 1983. Acuicultura: Marina Animal. Mundi-Prensa, Madrid, España.p. 237–371.

Coutteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks. Journal of Shellfish Research. 11: 249-256.

Darley, W.M. 1982. Algal Biology: A Physiological Approach. Wilkinson, J.W. (ed.), 168 pp. Blackwell Scientific Pub. Oxford.

De Pauw, N. y Persoone, G. 1988. Microalgae for aquaculture. En: Microalgal Biotechnology. Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 197-121. Cambridge University Press, Cambridge.

Droop, M. R. 1975. The Chemostat in mariculture. 10th European Symp. Mar.Biol. Ostend, Belgium. 17-23 septiembre 1:71-93.

Goldman, J.C. 1979. Outdoor alga-mass cultures. II. Photosynthetic yield limitations. Water. Res. 13:119-160.

Guillard, R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W. L. Smith y M. H. Chanley. Culture of marine invertebrates. Plenum Publishing Corporation. New York, 29-60 pp.

Guillard, R.L. y Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella sp* Hustedt, y *Dotonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.

Harder, R. y Von Witsch, H. 1942. Über Massenkultur von diatomeen. Ber. Bot. Ges. 60:142.

Herbert, D., Elsworth, R. y Telling, R.C. 1956. The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. J. Gen. Microbiol., 14: 601-622.

Kanazawa, A. 1985. Nutrition of penaid prawns and shrimps. In, Proc. Ist. Int. Conf. Cult. Penaid Prawns/shrimps, edited by Y. Taki *et al.*, South East Asian Fisheries Development Centre, Oloilo, Philippines, pp. 123-130.

Kanazawa, A., Teshima, S.I. y O. Kazuo, 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 63B, pp. 295-298.

Ketchum, B. H. y A.C. Redfield. 1938. A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, 75:165-169.

Laing, I. 1985. Factors affecting the large-scale production of four species of commercially important marine algae. *Aquaculture* 44:161-166.

Laing, I. y E, Jones. 1983. Large-scale turbidostat culture of marine microalgae. *Aquacult. Eng.* 2:203-212.

Langdon, C.J. y M.J. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, Vol. 61, pp. 431-448.

Lango-Alemán, J.A. 1999. Análisis de costos para la producción masiva de microalgas en un laboratorio comercial de postlarvas de camarón del Sur de Sonora, México. Tesis de Maestría en Ciencias. División de Ciencias Biológicas y

de la Salud. Depto. de invest. Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora, Hermosillo, México. 72pp.

Litchfield, J. H. 1983. Single-cell proteins. *Science* 219:740.

Luna, G.A. 2003. Susceptibilidad a *Vibrio alginolyticus* y Mecanismos de defensa de Moluscos Bivalvos. Tesis de Doctorado, CIBNOR. Méx. 106 pp.

Malek, I. 1978. The physiological state of microorganisms in continuous culture. p. 11-28 En: I. Malek (Ed.). Continuous cultivation of micro-organisms, a symposium. Czechoslovak Academy Sciences, Prague. 324pp.

Molina, G.E., García. C.F., Sánchez P.J., Fernández, S.J., Ación. F.F. y Contreras, G.A. 1994. A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* pp. 167-173.

Molina-Grima, E. "Biotecnología de Microalgas". *Biotecnología*. Febrero 2006. <http://www.ual.es/personal/jlguil/Investigacion/Composicion.htm>.  
Universidad de Almería, España. (12 de Agosto 2006).

Monod, J. 1950. La technique de culture continue., théorie et applications. *Annls Inst. Pasteur, Paris*, 79:390-410.

Myers, J. y Clark, L.B. 1944. Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. II. An apparatus for the continuous culture of *Chlorella*. J. Gen. Physiol. 28:103-112.

Mckeon, M.M. 1984. The hatchery and nursery stages of *Crassostrea gigas* cultivation at a location on Guernsey. B.Sci. Thesis. Department of Environmental Science. University of Southampton. U.K. 91p.

Nichiporovich, A.A., Semenenko, V.E., Vladimirova, M.G. y K.S. Spektorov. 1962. Some principles of intensification of photosynthetic productivity in unicellular algae. Istvesia Acad. Sci. USSR Ser. Biol. 2:163.

Orcutt, D.M. y G.W. Patterson. 1974. Effect of light intensity upon lipid composition of *Nitzschia closterium* (*Cylindrotheca fusiformis*). Lipids, Vol. 9, pp. 1000 – 1003.

Oswald, W.L. 1963. The high rate pond in waste disposal. Dev. Ind. Microbiol. 4:112-119.

Oswald, W.L. 1969. Growth characteristic of microalgae in domestic sewage: environmental effects on productivity. Proc. IBM/BP Technical Meeting.

Palmer, F.E., Ballard, K.A. y F.B. Taub. 1975. A continuous culture apparatus for the mass production of algae. *Aquaculture* 6:319-331.

Persoone, G. y C. Claus. 1980. Mass Culture of algae: a bottleneck in the nursery culturing of molluses. En: *Algae Biomass. Production and Use*. Shelef, G &.

Pillsbury, K.S. 1985. The relative food value and biochemical composition of five phytoplankton diets for queen conch, *Strombus gigas* (Linne) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 90:221-231.

Reynoso, G.T., Maeda, M.A., Roman, E.C. y S.P. Monsalvo.1990. Cultivos continuos de fitoplancton mediante un turbidostato de construcción simple. *Inv. Mar. CICIMAR. La Paz , B.C.S., México. Vol.5 No. Esp.1.*

Richmond, A. 1986. *Handbook of Microalgal Mass culture*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 528 pp.

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.

Ryther, J.H., Goldman, J.C., Gifford, E.E., Huguenin, H., Wing, A.S., Clarner, J. P., Williams, L.D. y B.E. Lapointe. 1975. Physical models of integrated wasted recycling: marine polyculture systemns. *Aquaculture* 5:163.

Sainz-Hernández, J.C. y A.N. Maeda-Martínez. 2005. Sources of *Vibrio* bacteria in mollusc hatcheries and control methods: a case study. *Aquaculture Research*. 36:1611-1618.

Sato, N. y N. Murata. 1988. Membrana Lipids. In: *Methods of Enzimology*: 167-267.

Saucedo-Lastra, P. 2001. Investigación aplicada al acondicionamiento gonadal y reproducción de la madre perla de Calafia Pinctada mazatlanica (Hanley, 1856) en el laboratorio. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México.186pp.

Schanz, F. y Zahler, U. 1981. Prediction of algal growth in batch cultures. *Schweiz. Z. Hydrobiol.* 43:103-113.

Semenenko, V.E., Vladimirova, M.G., Soglin L.N., Tauts, M.I., Phillipovskiy, L.N., Klyachko-Gurvich, G.L., Kuznetsov, E.D., Kovanova, E.S., y N.I. Raykov. 1996. Prolonged continuous directed cultivation of algae and physiological and

chemical characteristics of the productivity and efficiency of light energy utilization by *Chlorella*. *Upr. Biosynthesz.* 128:136.

Setlik, I., Veladimir, S. y I. Malek. 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.

Skinner, F.A. 1968. The Limits of Microbial existence. *Proc. Roy. Soc. B.* 171:77-89.

Soeder, C.J. 1976. The technical production of microalgae and its prospects for marine aquaculture. In: *Harvesting Polluted Waters*. Devik, O. (ed.), pp: 11, Plenum Press, New York.

Stein, J.R. 1973. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. 448 pp. Cambridge University Press. Cambridge.

Tamiya, H. 1957. Mass culture of algae. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 8:309-334.

Thronsen, J. 1985. *Introduction to the Identification of Marine Flagellates*. In: *International Phytoplankton Course*. Napoli, 1985.

Torres-Rodríguez, L.M. 1996. Uso de un fotobiorreactor para la producción masiva de microalgas para la acuicultura. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 66pp.

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 y Soeder, C. J. (Eds.). pp: 287-306. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.

Van-Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11:256-265.

Volkman, J.K., Smith, D.J., Eglinton, G., Forsberg, T.E.V. y E.D.S. Corner. 1981. Sterol and fatty acids composition of four marine Haptophycean algae. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, Vol. 61, pp. 509-527.

Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. y C.D, Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128:219-240.

Vonshak, J.B. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En: Handbook of Microalgae Mass Culture. Ruchmond, A. (ed.). pp: 117-145. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.

Walne, P.R. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. Fish. Invest., Lond., Ser. 2, 26(5):1-62.

Webb, K.L y F.L, Chu. 1983. Phytoplankton as a food source for algae. In, Proc. 2<sup>nd</sup>. Int. Aquaculture Nutrition, La. State Univ. Spec. Publ., No. 2, edited by G.D. Pruder et al., Worl Mariculture Society, Louisiana, pp. 272-291.

Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture 60:231-241.

Wynee, D. y G.Y. Rhee. 1986. Effects of light intensity and quality on the relative N and P requerement (the optimun N.P ratio) of marine planktonic algae. J. Plankton Res. 8:91-103.

Yúfera, M. y L.M. Lubián. 1990. Effects of Microalgal Diets on Gorwth and Development of Invertebrates in Marine Aquaculture. pp. 209-227. En: Akatsuka L. (Ed.), Introduction to Applied Phycology. SPB Academy Publishing bv, The Hague, The Netherlands.

Zöllner, N. y K. Kirsch. 1962. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Micromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulphosphovanillin.Reaktion.Z. ges.exp.Med., Bd 135, S. 545-561.