

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	9	115-129	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	---	---------	---	-------------------	----------------

Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica

Principles of Biotechnology and Bioengineering in microalgae cultures: importance, technological problems, culture types and systems, growth, limiting factors, selection, isolation, grading and biochemical characterization

Fecha de recepción y aceptación: 28 de diciembre de 2016 y 6 de febrero de 2017

J. García-Romeral¹, M. Pavía-Gómez², T. García Sanz³, J. Chirivella-Martorell¹ y Á. Serrano-Aroca^{2*}

¹ Grupo de Recursos Acuáticos. Institute of Environment and Marine Science Research (IMEDMAR). Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

² Grupo de Bioingeniería y Terapia Celular. Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnológicas. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

³ Grupo de Biología Marina. Institute of Environment and Marine Science Research (IMEDMAR). Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnológicas. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. *E-mail*: angel.serrano@ucv.es



RESUMEN

El cultivo masivo de microalgas para la producción de biocombustible alternativo al petróleo, compuestos de valor añadido (CAVA) con aplicaciones químicas o farmacéuticas y como fuente de alimento para una población mundial creciente, sigue siendo uno de los campos más prometedores de la bioingeniería y biotecnología. Sin embargo, todavía queda mucho trabajo por realizar en investigación y desarrollo para optar a todas las magníficas posibilidades que ofrece esta fuente renovable. De este modo, en esta revisión se pretende mostrar los principios referentes al cultivo de microalgas: su importancia, los problemas tecnológicos que todavía quedan por solucionar, todos los aspectos relacionados con sus tipos y sistemas de cultivo, las fases del crecimiento, las ecuaciones de la cinética de duplicación celular, características importantes referentes a la selección y aislamiento de cepas, escalado, métodos de caracterización bioquímica (determinación de clorofilas, proteínas, lípidos, carbohidratos, sílice, etc.) y, finalmente, las especies de microalgas más relevantes.

PALABRAS CLAVE: *microalgas, caracterización bioquímica, cultivo, aislamiento, selección.*

ABSTRACT

Massive cultivation of microalgae for the production of alternative biofuels, value added compounds with chemical or pharmaceutical applications and as a food source for a growing world population remains one of the most promising fields of bioengineering and biotechnology. However, much work must be done still in research and development to achieve all the possibilities offered by this renewable source. Thus, this review intends to show the principles concerning the cultivation of microalgae: its importance, technological problems still to be solved, all aspects related to their types and systems of cultivation, growth phases, kinetics equations for cell duplication, important aspects related to the selection and isolation of strains, scaling, biochemical characterization methods (determination of chlorophylls, proteins, lipids, carbohydrates, silica, etc.) and finally the most relevant microalgae species.

KEYWORDS: *microalgae, biochemical characterization, culture, isolation, selection.*



INTRODUCCIÓN

Las microalgas son los productores primarios de la cadena alimenticia del ecosistema marino, en el cual se encuentran organismos de gran importancia económica y que se hallan sujetos a la disponibilidad de alimentos del ambiente en el que se desarrollan [1]. Se trata de microorganismos acuáticos que dependen de la energía lumínica del sol para realizar la fotosíntesis. Esta energía solar la captan a través de pigmentos fotosintéticos y carotenoides, y así producen metabolitos a partir de compuestos sencillos como el dióxido de carbono, sales inorgánicas y metales solubles en el agua de mar [2].

La primera microalga aislada y mantenida en condiciones axénicas fue la *Chlorella vulgaris* en 1890, pero no fue hasta los años cuarenta cuando se iniciaron los estudios sobre la fisiología y bioquímica de estos organismos para su caracterización. Así mismo, es cuando se intenta explotar su cultivo a gran escala para una mayor producción. Las primeras microalgas en ser cultivadas fueron las diatomeas, pero los estudios llevados a cabo al aire libre en una planta piloto fueron de *C. vulgaris* [3-4].

En las microalgas se combinan propiedades tales como la capacidad de crecimiento rápido en cultivo líquido, simplicidad de requerimientos nutritivos, plasticidad metabólica, tolerancia a condiciones extremas, capacidad de sintetizar y secretar algunos metabolitos y potencialidad de manipulación genética, lo que les confiere mucho interés biotecnológico [5].

IMPORTANCIA DE LAS MICROALGAS EN LA BIOTECNOLOGÍA ACTUAL

Dentro del campo de la biotecnología actual, las microalgas están consideradas como organismos muy interesantes para la obtención de productos naturales con fines energéticos, principalmente para la obtención de biocombustibles como el bioetanol o el biometano, biodiésel, principalmente como fuentes de calor y electricidad. Otras aplicaciones comerciales importantes de las microalgas buscan obtener productos de alto valor añadido con aplicaciones en la nutrición y salud humana, incluyéndose como suplemento en pastas, vino, refrescos, cereales, etc., así como en la cosmética y acuicultura.

Otras aplicaciones están enfocadas a sistemas de tratamiento de aguas, pudiendo retirar metales pesados y macronutrientes del medio acuático [6].

Los cultivos de microalgas, a su vez, son esenciales en acuicultura como fuente de alimentación en el cultivo integral de moluscos, de estados larvados de crustáceos y peces. Se utilizan también para el cultivo de especies intermedias (rotíferos, artemia y copépodos), formando parte de la cadena alimentaria que tiene lugar en cualquier criadero convencional. Parte de la producción se emplea asimismo en la alimentación de peces tropicales y en acuicultura para incrementar la pigmentación [7].

La utilización de microalgas como producto de interés alimentario se vio inducida por la calidad de su biomasa, principalmente por la ausencia de tejidos y su bajo contenido en materiales estructurales, ya que en su composición destaca particularmente un contenido elevado de proteínas, con valores superiores al 50 % del peso seco y un perfil de aminoácidos similar al de la harina de soja o pescado y al estándar de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), siendo solo ligeramente deficiente en aminoácidos azufrados y lisina.

Los estudios de digestibilidad llevados a cabo con distintas especies de microalgas han mostrado resultados muy positivos, comparables con cualquiera de los piensos de uso frecuente para animales, según los parámetros internacionales de nutrición.

El interés alimentario de la biomasa de microalgas reside no solamente en su riqueza proteica, sino también en su contenido en lípidos esenciales, pigmentos, carbohidratos, vitaminas, minerales, etc., siendo la concentración de ácidos nucleicos (5-10 %) de las más bajas encontradas en microorganismos [7-8].

En la actualidad, la principal alternativa viable para desarrollar con éxito el cultivo de especies marinas de interés se basa en el adecuado cultivo y suministro de fitoplancton como alimento [9]. La mayor parte de los criaderos marinos intensivos siguen un modelo simplificado de la cadena trófica existente en el ambiente natural y disponen de instalaciones para la producción de fitoplancton. Con este objetivo, se llevan a cabo cultivos monoespecíficos de microalgas marinas que se utilizan como alimento de moluscos bivalvos y primeros estadios larvarios de crustáceos. Por otro lado, constituyen el alimento de especies zooplánctónicas, tales como rotíferos, copépodos y artemias, que a su vez servirán como presas para larvas de peces y estadios larvarios avanzados de crustáceos.



Las características principales que debe reunir una especie de microalga para servir de alimento vivo en acuicultura son tener un tamaño celular adecuado al sistema de filtración de los animales que lo consumen (2-20 μm), facilidad de digestión, composición bioquímica idónea con relación a los requerimientos nutritivos de cada especie y nula toxicidad. También son deseables ciertas propiedades para su cultivo, tales como altas tasas de crecimiento, mínimos requerimientos nutritivos, altas densidades celulares, resistencia a variaciones ambientales, ausencia de bacterias y/o otros parásitos, etc. Estas características pueden buscarse mediante un estudio sistemático de las posibilidades que ofrece la naturaleza para distintas especies y variedades geográficas, o bien mediante la inducción y selección de mutantes apropiados.

Con los métodos convencionales de cultivo de microalgas se puede producir fitoplancton de una especie determinada, o mediante una mezcla de especies (cultivos mixtos), conocidas y controladas, que ofrecen la posibilidad de un mayor control biológico sobre el sistema producción. Estas circunstancias han llevado a desarrollar una tecnología específica de producción de microalgas, orientada particularmente a la alimentación en acuicultura marina [10], y estas técnicas de cultivo masivo son muy conocidas en la actualidad. Cuando se satisfacen los requerimientos físicos y nutritivos se pueden llegar a alcanzar productividades de biomasa comprendidas entre 5 y 30 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$, dependiendo de la especie utilizada, las condiciones ambientales (luz, temperatura, salinidad, pH) y los sistemas de cultivo.

PROBLEMAS DE BIOINGENIERÍA PENDIENTES DE RESOLVER EN EL USO DE MICROALGAS

Antes de que la tecnología de microalgas pueda llegar a ser verdaderamente rentable y sea posible la producción de una amplia gama de compuestos a menor coste, numerosos aspectos de bioingeniería deben ser desarrollados para abrir el camino a una producción eficaz de bajo coste. Muchos de estos problemas técnicos son la necesidad, a través de la selección de cepas y técnicas de modificación genética, de aumentar la productividad al menos en dos veces en la cantidad de biomasa y del producto objetivo.

Otra necesidad fundamental por medio del cultivo y la investigación en bioingeniería es la reducción de costes que permitan el cultivo de monocultivos, prevenir invasiones de herbívoros de zooplancton y reducir el coste de los equipos de producción clave, tales como estanques, fotobiorreactores, clarificadores y digestores. Es necesario también permitir mediante investigación en bioingeniería la recolección efectiva de microalgas y la recuperación de productos de interés sin secar la biomasa [11].

Una forma de acelerar el desarrollo con éxito de tecnologías de microalgas, a pesar de estos obstáculos, es intentar emplear cepas de microalgas que tengan atributos fisiológicos o propiedades físicas que reduzcan al mínimo o eviten algunos de los problemas centrales mencionados anteriormente. Uno de los factores más importantes en el desarrollo con éxito de estas tecnologías es el acceso a cepas resistentes que crezcan rápidamente, estén adaptadas para el entorno de sistema de cultivo planificado, y naturalmente, que produzcan altos niveles de un producto o productos deseados. Igualmente los procesos encaminados a la valorización de las distintas fracciones de la biomasa (proteínas, carbohidratos y lípidos) actualmente no están bien establecidos técnicamente. El problema aparece a nivel económico, ya que el coste asociado a la producción y recuperación de la biomasa, sumado al coste del propio proceso de aprovechamiento de la biomasa, hace que el proceso en su conjunto no sea viable desde el punto de vista económico [11-12].

CULTIVO DE MICROALGAS

Históricamente las colecciones de cultivos de microalgas se han utilizado principalmente para la investigación y la enseñanza. El rápido desarrollo de aplicaciones comerciales de las microalgas actualmente requiere aumentar dichas colecciones y diversificar los protocolos de control de calidad. La función principal de las colecciones actuales es la preservación de poblaciones de microalgas de identidad conocida y de calidad, y el suministro de pequeños volúmenes de estas cepas a los usuarios que las soliciten a un coste reducido.

Los administradores de los cultivos utilizan protocolos microbiológicos estándar, tales como las técnicas asépticas y observaciones microscópicas para el manejo de las microalgas, teniendo en cuenta sus necesidades especiales para la luz y el dióxido de carbono. Las colecciones de cultivos intentan incluir la mayor diversidad posible debido al amplio interés



científico y comercial que representan. Sin embargo, ninguna colección mantiene una representación equitativa de todos los grupos importantes debido a que algunas microalgas son difíciles de mantener en cultivo y algunos grupos representan un mayor valor que otros.

Las colecciones de agua dulce generalmente mantienen un número desproporcionado de cianobacterias, algas verdes y diatomeas, ya que estos grupos son los más intensamente utilizados en la investigación científica, y son los más ampliamente explotados comercialmente. Las colecciones de cultivos de algas marinas pueden ser más diversas, incluyendo, por ejemplo, algas del grupo de las criptofitas, dinoflagelados y algas haptofitas [13].

TIPOS DE CULTIVO

El desarrollo de un método de cultivo de microalgas depende de los requerimientos y exigencia de la calidad de los elementos mencionados en las diversas etapas en las que deben ser suministrados. El método empleado en el cultivo según la forma de cosecharlo se clasifica en cultivo discontinuo, continuo y semicontinuo. En el cultivo discontinuo o por lotes, la población va pasando por las distintas fases de crecimiento, ajustándose generalmente a una función logística, produciéndose cambios fisiológicos de la población a medida que transcurre el tiempo de cultivo. Los procesos discontinuos operan en sistemas cerrados de manera que el sustrato se añade al comienzo del proceso y los productos son retirados solo al finalizar este. Generalmente el uso de estos cultivos es para fines de bioensayo o bien para transferencia a volúmenes mayores. Estos tipos de cultivo tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular. El cultivo continuo es aquel en el que se mantiene la fase exponencial durante un largo periodo de tiempo, y las características químicas del medio, la temperatura y la luz son sostenidas en un valor constante. La ventaja de estos cultivos es que las muestras tomadas a distintos tiempos son idénticas. Para ello hay que añadir continuamente nutrientes en la misma medida que son retirados del medio, para mantener los parámetros de crecimiento y población celular a nivel constante. Para mantener cultivos continuos, todos los factores de crecimiento deben mantenerse constantes y la densidad del cultivo se controla manteniéndola a concentración constante. Sin embargo, el cultivo semicontinuo es la combinación de los dos métodos anteriores. En este tipo de cultivo, parte del volumen se recoge para su utilización, generalmente al final de la fase exponencial, y la cantidad que se retira se reemplaza con medio de cultivo fresco. En sistemas de energía lumínica eficiente se puede recoger tres veces por semana hasta el 90 % del volumen de cultivo a altas concentraciones celulares [14-15].

SISTEMAS DE CULTIVO

Hoy en día se han desarrollado diferentes sistemas de cultivos microalgales: sistemas abiertos y sistemas cerrados. En los sistemas abiertos, el cultivo está expuesto a la atmósfera y los parámetros físico-químicos son difícilmente controlables. En cambio, en los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, existe un mínimo o ningún contacto con la atmósfera. Estos reducen el riesgo de contaminación y mejoran la reproducibilidad de las condiciones de cultivo entre otras ventajas [16]. Los fotobiorreactores son dispositivos técnicos cerrados diseñados para producir microorganismos fotosintéticos en colaboración con los requerimientos óptimos de luz, pH, CO₂, mezclado, temperatura, etc. Además, existen diferentes diseños para este, adoptando así una gran variedad de configuraciones y modos de operación. Dentro de los más comunes se encuentran los de placa delgada y los tubulares, encontrando dentro de estos los horizontales e inclinados [17]. Son muchos los factores que van a influir en el crecimiento del cultivo, y muchas de las variables son susceptibles a ser modificadas, como son: la temperatura, la salinidad, el pH, el grado de exposición a la luz, la longitud de onda, la cantidad de aireación, turbulencia y mezclado, así como el suministro externo de CO₂ y la cantidad de nutrientes y vitaminas del medio de cultivo [16]. Los fotobiorreactores se consideran ventajosos frente a sistemas abiertos debido a la facilidad para cosechar la biomasa, el mantenimiento del cultivo sin contaminación y el control de las condiciones de cultivo. Entre las principales desventajas de estos sistemas cerrados resaltan el elevado coste inicial en la inversión del capital, el mantenimiento y la limpieza. Por tanto, dependiendo del posterior uso que se le quiera dar a los cultivos, se opta por un sistema u otro [18].



Para el cultivo de cualquier especie a escala comercial, debe realizarse una caracterización inicial completa de estas para la puesta a punto de su cultivo, teniendo en cuenta valores como el tamaño, la tasa de crecimiento, los valores nutricionales y su contenido en pigmentos. Esta caracterización ha de ser realizada previamente a escala de laboratorio con un menor volumen de cultivo (1-3 litros). El mantenimiento de las colecciones de estirpes tipo y el adecuado cultivo de los inóculos que garantizan su pureza y asepsia representan el primer nivel en esta estrategia de producción, siendo especialmente importante la buena calidad de estos inóculos para obtener una producción masiva óptima en fases posteriores con un alto rendimiento y calidad en su composición bioquímica. La composición de cada especie (proteínas, carbohidratos, ácidos grasos esenciales, pigmentos, etc.) varía mucho de unos grupos a otros, aunque ciertas características dependen más de las condiciones de cultivo que de la especie, observándose que dentro de esta especie las variaciones en composición celular durante el crecimiento pueden ser mayores que las encontradas entre distintas especies cultivadas en condiciones similares [1]. Otro factor que hay que tener en cuenta es el modo de cultivo (discontinuo o por lotes, continuo o semicontinuo).

FASES DE CRECIMIENTO

Las fases de crecimiento de un cultivo típico de microalgas son cinco, que se definen por el número de células presentes en un tiempo (edad) determinado y por las condiciones generales del cultivo: fase de latencia, fase de adaptación o inicial, fase exponencial o desarrollo logarítmico, fase de declinación de la fase exponencial, fase estacionaria y la fase de declinación o muerte [19]. En las fases de latencia, adaptación o inicial el incremento o densidad celular es poco, ya que es una fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones del medio. Muchas enzimas metabólicas llegan a ser inactivas y las concentraciones de materiales celulares caen a niveles que afectan a la división de la célula, y por ello antes de reanudar el crecimiento las microalgas necesitan un corto periodo de tiempo para aclimatarse a su medio acuático. Otro factor que contribuye a la fase inicial es el requerimiento de alcanzar los niveles máximos de compuestos específicos antes de que la fase exponencial comience. Esta fase puede durar entre 1 y 3 días, dependiendo del tamaño y del estado del inóculo. En la fase exponencial o desarrollo logarítmico, la división celular se incrementa en función del tiempo. El incremento de la población existente se debe a que las células están asimilando los nutrientes en el medio y su proceso de reproducción asexual es activo. La fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio. En la fase de declinación de la fase exponencial, como su nombre indica, la división celular es lenta cuando los nutrientes han sido consumidos y su carencia limita el crecimiento, por lo que puede llegar a durar de uno a dos días, en los que la edad del cultivo alcanza su valor máximo. En la fase estacionaria el factor limitante (carencia de nutrientes) y la velocidad de crecimiento están equilibrados, es decir, las densidades celulares se mantienen relativamente constantes por un periodo relativamente prolongado. Esta fase es muy corta en grupos de cultivo donde los nutrientes son consumidos y no reemplazados. Por último, en la fase de declinación o muerte, las células sufren la completa limitación por escasez de nutrientes y la densidad celular comienza a caer rápidamente liberando azúcares, proteínas y lípidos, los cuales son aprovechados en algunos casos por bacterias oportunistas que se alimentan de ellos desplazando a la población que se mantiene viva pero que rápidamente colapsa.

FACTORES LIMITANTES EN EL CULTIVO DE MICROALGAS

Un cultivo microalgal solo crecerá en un medio de cultivo si contiene todos los nutrientes necesarios en una forma disponible y si son adecuados el resto de los factores ambientales. Para el estudio de la cinética microalgal el método de cultivo más simple es el cultivo discontinuo, en el que el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento. En un sistema discontinuo el cultivo pasará por una serie de fases provocadas por dichos factores limitantes [19]. Claramente, los factores ambientales, como la luz, la temperatura, el estado de los nutrientes y la salinidad, no solo afectan a la fotosíntesis y a la productividad de la biomasa celular sino también al patrón, la ruta y la actividad del metabolismo celular y la composición celular de forma dinámica. Los efectos sobre el metabolismo tienen implicaciones de largo alcance y consecuencias biotecnológicas [20].



Dada la naturaleza fotosintética de las microalgas, los factores que afectan a la fotosíntesis afectarán del mismo modo a la composición bioquímica de estas, ya sea en respuesta de un factor limitante o al uso excesivo de algún otro. Se ha demostrado que la exposición continua de las microalgas a la luz tiene un efecto inhibitorio sobre su capacidad fotosintética y también se ha descubierto que existe una interacción de la temperatura con la luz para que se presente este fenómeno. Sin embargo, las microalgas necesitan de un periodo de luz y oscuridad, es decir, el tiempo de exposición a la luz es más importante que su intensidad [21]. Frecuentemente los regímenes de luz y oscuridad son usados dentro de un orden para simular las condiciones más usuales en la naturaleza y obtener una sincronización en la división celular, lo que repercute también en los ritmos bioquímicos y por lo tanto en la producción de nutrientes. El efecto de la luz sobre la composición bioquímica de algas fotosintéticas está controlado en gran parte por el proceso de fotoaclimatación. En este proceso, las células de las microalgas se someten a cambios dinámicos en su composición, junto a alteraciones en las propiedades ultraestructurales, biofísicas y fisiológicas para aumentar la fotosíntesis y el crecimiento de las microalgas [20].

La temperatura es un factor ambiental muy importante por su gran influencia en el desarrollo de las microalgas. La mayor parte de los organismos del fitoplancton tienen un rango de crecimiento óptimo de 18 a 25 °C, pero existen especies que crecen a temperaturas alejadas de este rango. El efecto de la temperatura sobre la composición bioquímica afecta principalmente a dos mecanismos distintos: la tasa de dependencia de la temperatura de las reacciones químicas y bioquímicas, y la dependencia de la temperatura para la fijación fotosintética de carbono en varios tipos de macromoléculas, como por ejemplo las proteínas, los hidratos de carbono y los lípidos [22].

El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo microalgal. Las membranas plasmáticas no son libremente permeables a los iones hidrógeno e hidroxilo, y por tanto las concentraciones de hidrogeniones intracelulares y extracelulares no están necesariamente equilibradas y existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana. Las microalgas representan una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta a él. Independientemente, cada microalga presenta un pH óptimo para su crecimiento (7-8) y un descenso suele ser letal. En cambio, las microalgas suelen soportar mejor, hasta cierto límite, los incrementos del pH [23].

Por otra parte, la salinidad o presencia de sales inorgánicas disueltas en el medio en el cual se desarrollan las microalgas puede afectar potencialmente al crecimiento de estas, ya sea por su composición elemental, ya sea por la presión osmótica ejercida por dichas sales. A pesar de todo, las microalgas tienen la capacidad de adaptarse a la presión osmótica del medio ajustando su concentración interna de solutos y, de esta manera, ponerse en equilibrio con su medio externo [22]. Una suficiente agitación del medio de cultivo es necesaria e incide directamente en el cultivo. Cuando las condiciones ambientales son satisfactorias, la agitación constituye el requisito más importante para la obtención de altos rendimientos de biomasa microalgal. La agitación produce el movimiento del agua, lo que implica una serie de efectos positivos tales como una distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, una mejora de la distribución de la luz en las células que asegura que permanezcan fotosintéticamente activas, y que estas sedimenten en el fondo del recipiente de cultivo, produciendo una estimulación general del metabolismo celular; por último, se previene una estratificación termal [20].

SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO, AISLAMIENTO Y ESCALADO

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales que permitan resultados constantes en contraste con los resultados tan variables que brinda el uso del agua de aquel, que entre otros factores depende del lugar donde se colecta esta y del tiempo de su almacenamiento. Por lo tanto, la utilización del medio de cultivo basado en la fórmula de Guillard F/2, optimizado para el cultivo de microalgas unicelulares (fitoplancton), es muy común porque los medios artificiales brindan resultados constantes [24].

El uso de la micropipeta permite ser selectivo en cuanto a que se aislen las especies que uno mismo elige. Es la técnica más directa para obtener una cepa monoespecífica y se utiliza para obtener cultivos clonales, o sea, cultivos iniciadores con una sola célula o entidad microalgal [25]. Cuando no se cuenta con pipetas capilares, una manera de preparar micropipetas es colocar en la llama de un mechero la parte final de la pipeta Pasteur y, con la ayuda de una pinza, alargar esta hasta obtener una fina pipeta capilar. Una vez obtenido un número suficiente de micropipetas, se coloca sobre un portaobjeto una gota de medio estéril a la cual se le agrega una pequeña gota de la muestra de agua original con una micropipeta. Por observación al microscopio, se lo-



caliza la zona con la menor cantidad de células y se aspira con la micropipeta una pequeña cantidad del líquido para traspararlo a una nueva gota de medio estéril, “lavando” de esta forma el cultivo y haciéndolo menos denso. Posteriormente, se repite esta misma operación hasta que en toda la gota se vea que existe solo una célula, aspirándola totalmente del portaobjeto y transfiriéndola a una placa multipocillo con 350 μ l de cultivo estéril y colocándolo en condiciones favorables para el crecimiento. Tras una semana de crecimiento se lleva a cabo un escalado al 25 % del volumen desde tubos de ensayo de 10 ml hasta Erlenmeyers de 100 ml y 250 ml, y finalmente hasta balones de laboratorio de 1.000 y 3.000 ml, esperando 7-10 días para el crecimiento en cada escalado. Cada recipiente se llena con medio de cultivo con un volumen igual al inóculo tomado para el escalado.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR

La densidad celular (células/ml) puede evaluarse de forma sencilla empleando la técnica de contaje directo [19] a través del microscopio óptico mediante un hematocitómetro o cámara de Neubauer. Por lo tanto, el cálculo de la velocidad de crecimiento celular se puede representar gráficamente mediante el logaritmo neperiano de la concentración celular ($\ln X$) en función del tiempo, como se indica en la ecuación (1):

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (1)$$

Donde X es el número de células, μ la velocidad de crecimiento y t el tiempo. A partir del cálculo de la velocidad de crecimiento celular se puede calcular el tiempo de duplicación o t_d a partir de la ecuación (2) siguiente.

$$t_d = (\ln 2)/\mu \quad (2)$$

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LAS MICROALGAS

La biomasa de fitoplancton se puede estimar mediante la determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos en una muestra de cultivo transfiriéndose a una cubeta y realizando una medida espectrofotométrica, según la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) en los Métodos Estándares para el examen de agua y aguas residuales [26]. La lectura de la densidad óptica a 664, 647 y 630 nm se utiliza para determinar las clorofilas a, b y c, respectivamente, la absorción a 750 nm es una corrección para la turbidez, la absorción a 650 nm mide la fluorescencia variable, y la absorción a 510 y 480 nm determina los carotenoides, de modo que se obtienen unos valores de absorción adicionales dentro de la banda de absorción de todas las clorofilas.

Para realizar la cuantificación de la biomasa en base seca, partiendo de una densidad celular de 2×10^6 cel/ml en el caso de las microalgas haptófitas, como *Isochrysis galbana*, o de 4×10^6 cel/ml, en el caso de las diatomeas, se procede a la realización de la liofilización de un litro de cultivo madre para cada especie, previa centrifugación con agua destilada para la eliminación de la sal presente en el medio de cultivo. Una vez obtenido el liofilizado se procede a pesar la muestra en una balanza de precisión [27].

Normalmente, para la determinación de proteínas primero se realiza un proceso de extracción, el cual consiste en un tratamiento con hidróxido de sodio a una concentración específica en un baño de agua con una temperatura conocida. De este modo, se pretende solubilizar las proteínas particuladas por medio de la ruptura de la pared celular [27]. La cuantificación se realiza por el método descrito por Lowry, que consiste en la interacción que se produce entre la proteína y los iones cobre en disolución alcalina, lo que provoca la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu y cuyo rango de detección es de 0 a 100 μ g de proteína [28-29]. El estándar de proteínas recomendado para realizar la curva de calibrado es la albúmina de bovino, a partir de una disolución patrón de 100 μ g/ml. Se realizan disoluciones diluidas a una concentración de 75, 50, 25, 10, 5 y 0 μ g/ml, y se coloca 1 ml de cada una de las disoluciones diluidas y de la disolución patrón en siete tubos por quintuplicado. Finalmente, hay que realizar una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta, tomando como variable dependiente la concentración de proteína y como independiente la absorbancia.



Los carbohidratos se suelen extraer de una disolución de ácido tricloroacético al 5 %, y posteriormente se procede a la cuantificación por medio del método de Dubois, que consiste en la formación de compuestos furfural en medios fuertemente ácidos que con el fenol forman un complejo colorido medible. Al igual que en el caso de las proteínas se determina el factor de dilución, aunque para este componente se considera un rango entre el 20 y 30 % de carbohidratos [30]. La dilución se realiza adicionando los mililitros de ácido tricloroacético y se calienta la muestra en un baño de agua a una temperatura de 80-90 °C durante tres horas y se deja enfriar. La metodología que debe seguirse consiste en colocar en un tubo de centrífuga de 1 ml del extracto que contiene la muestra de carbohidratos y 1 ml de la disolución de fenol al 5 %, y se deja reposar 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregan de forma continua 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejando que el ácido se deslice lentamente por las paredes del tubo y se homogeneice con la ayuda de una varilla de vidrio. Se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 3.000 rpm durante 30 minutos. Finalmente, se lee la producción de color a una longitud de onda de 490 nm. El estándar de carbohidratos recomendado para la curva de calibrado es glucosa anhidra a partir de dos disoluciones patrón de 40 y 10 µg/ml. Se realizan disoluciones diluidas a una concentración de 15, 7,5, 5, 2,5, 1,5, 0,5 y 0 µg/ml y se coloca 1 ml de cada una de las disoluciones diluidas y de la disolución patrón en 9 tubos por quintuplicado. Finalmente, se realiza una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta tomando como variable dependiente la concentración de carbohidratos y como independiente a la absorbancia.

Los lípidos de las algas se clasifican en neutros (triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, esteroides, ceras, ésteres de esteroides y hidrocarburos) y líquidos polares (principalmente fosfolípidos, glicolípidos, carotenoides y clorofilas). La complejidad de los lípidos algales requiere métodos específicos para el fraccionamiento, purificación y determinación de clases individuales y de especies moleculares de lípidos. Los métodos más populares para determinar la fracción de lípidos de las microalgas son la extracción y determinación gravimétrica mediante el método de Floch [31], el método de Bligh-Dyer [32], el método de Bigogno [33] y el método de extracción por Soxhlet adaptado del método de Franz Soxhlet para muestras algales [34].

El sílice se suele cuantificar mediante extracción en diatomeas a partir de 0,1 g de cultivo microalgal liofilizado. En primer lugar, se transfiere la muestra a una mufla hasta alcanzar una temperatura de 550 °C, y posteriormente, una vez enfriada la muestra, se añade una disolución de NaOH al 50 % hasta evaporar la disolución. Después de que la muestra se enfríe a temperatura ambiente, se añaden 25 ml de agua destilada y se deja en reposo por una noche. Finalmente, el contenido se afora a 50 ml. Una vez extraído el sílice, se procede a la cuantificación por medio del método de Elliott y Snyder, el cual consiste en la reacción del ácido silícico con el ácido molíbdico, lo que genera ácido silicomolíbdico con la forma oxidada de coloración amarilla y la reducida de color azul. La forma reducida se obtiene al tratar la muestra con ácido sulfóniconaphthol-amino [35-36]. La metodología que se suele seguir consiste en 5 ml de alícuota, a los que se le añaden 29 ml de ácido acético al 20 %, 10 ml de disolución de molibdato de amonio (54 g/l), 5 ml de ácido tartárico al 20 %, 1 ml de disolución reductora formada por 2 g de sulfito de sodio y 0,4 g de ácido sulfónico-naphthol-amino, aforados a 25 ml con agua destilada y 25 g de bisulfito sódico disueltos en 200 ml de agua destilada. Estas dos disoluciones se mezclan y se aforan a 250 ml. Después de añadir la disolución reductora, se afora de nuevo a 50 ml con ácido acético al 20 %, y se espera cinco minutos entre la adición del molibdato de amonio y el ácido tartárico. Las muestras se mezclan y se dejan en reposo durante 30 minutos para que finalmente se pueda determinar la absorbancia en un espectrofotómetro a 650 nm de longitud de onda. El estándar de sílice recomendado para realizar la curva de patrón es SiO₂ grado reactivo y se realiza a partir de una disolución patrón de 10 mg/l de sílice. Se preparan disoluciones diluidas a una concentración de 1,8, 1,2, 0,6 y 0 mg/l y se coloca 1 ml de cada una de las disoluciones y la disolución patrón en 5 tubos por quintuplicado. Finalmente se realiza una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta, tomando como variable dependiente la concentración de sílice y como independiente la absorbancia.

Para la extracción y determinación del contenido de clorofilas totales de la biomasa se utiliza el método espectrofotométrico propuesto por Hansmann [37] y se realizan los cálculos según la fórmula siguiente (ecuación (3)), propuesta por Jeffrey y Humphrey [38].

$$Chl\ a\ \mu\frac{g}{l} = \frac{11.85 \cdot A_{664} - A_{750} - 1.54 \cdot A_{647} - A_{750} - 0.08 \cdot A_{630} - A_{750} \cdot v}{V} \quad (3)$$



Donde A_{640} , A_{647} , A_{630} y A_{750} es la densidad óptica medida a las longitudes de onda indicadas en nm, v es el volumen del extracto y V el volumen de agua filtrada en litros. La metodología de este método consiste en medir un determinado volumen de muestra a través de un filtro de microfibras de vidrio (GF/F). Se introduce el filtro en el tubo donde se realizará la extracción y se añade en el tubo con el filtro una cantidad aproximada de 5 ml de disolución de acetona al 90 %. Se tapan los tubos con papel de aluminio para mantenerlos en oscuridad y se colocan los tubos en baño de agua y hielo sonicando 30 segundos. Posteriormente se realiza una pausa de 10 segundos y se vuelve a sonicar otros 30 segundos. Se debe mantener en frío, entre 0 y 4 °C, y en oscuridad durante 12-24 horas, pudiendo agitarse el tubo un par de veces. Finalmente se centrifuga durante 5-10 minutos a 3.000 rpm y se mide después con el espectrofotómetro. Es importante utilizar cubetas de vidrio y llenarlas con el extracto hasta $\frac{3}{4}$ partes para medir la absorbancia a 630, 647, 664 y 750 nm. Por último, se aplica la ecuación (3) para obtener los resultados de clorofilas.

MICROALGAS IMPORTANTES EN BIOTECNOLOGÍA AZUL

Las microalgas marinas constituyen la base de la cadena nutritiva en el cultivo de moluscos, peces y crustáceos. Además, sirven de alimento a especies intermediarias utilizadas como presas vivas en acuicultura [1]. Otras aplicaciones comerciales de las microalgas buscan obtener productos con aplicaciones en el campo de la nutrición o la salud humana.

Dentro del género *Isochrysis* (Reino Chromista, División *Haptophyta*, Clase *Coccolithophyceae*, Orden *Isochrysidales*, Familia *Isochrysidaceae*), encontramos *Isochrysis galbana*, una especie de microalga unicelular de color pardo amarillento con forma ovoide y con diámetros de entre 3 y 6 μm . Presenta formas móviles provistas de dos flagelos móviles y formas inmóviles. *Isochrysis galbana* es muy importante en la industria de la acuicultura, ya que se utiliza como alimento de larvas de moluscos bivalvos y larvas de camarón, dados sus altos valores de crecimiento y contenido de proteínas (26-47,2 %) y lípidos, especialmente el ácido graso docosahexanoico (DHA). Su contenido de carbohidratos y lípidos se incrementa con el desarrollo del cultivo, mientras que las proteínas se incrementan únicamente en las últimas fases y los ácidos grasos poliinsaturados alcanzan sus valores más altos en la fase estacionaria tardía [21].

En el grupo de las diatomeas destacan las diatomeas del género *Chaetoceros* (Reino Chromista, División *Bacillariophyta*, Clase *Mediophyceae*, Orden *Chaetocerotales*, Familia *Chaetocerotaceae*) tales como *Chaetoceros calcitrans* y *Haetocerus gracilis*, ambas diatomeas céntricas de vida solitaria y de tamaños de 4 a 6 μm sin incluir las setas. Las características principales de este género son la presencia de plastos marrones o amarillos cargados de fucoxantina o beta-caroteno y su cubierta celular compuesta de sílice y formada por dos valvas (frústulos), las cuales se separan para formar células nuevas durante la división vegetativa [2]. En cuanto a su composición bioquímica, *Chaetoceros calcitrans*, por ejemplo, presenta un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (EPA y AA, no tiene DHA) y altas vitaminas C y E. Por este motivo, esta microalga ha sido utilizada en acuicultura marina como alimento vivo, dado su valor nutritivo, principalmente para moluscos y crustáceos. Además, en cultivos tiene la capacidad de generar buenas densidades celulares, lo que la hace una especie muy ideal para una producción a gran escala [39].

Otras especies que destacan por ser de las más cultivadas con fines de alimentación en acuicultura son *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis gaditana* y *Dunaliella salina*, debido a sus propiedades nutricionales y a su facilidad para mantener su cultivo, lo que también permite una producción masiva de tales especies.

El género *Tetraselmis* (Reino *Plantae*, División *Chlorophyta*, Clase *Chlorodendrophyceae*, Orden Chlorodendrales y Familia Chlorodendraceae) incluye un conjunto de microalgas unicelulares flageladas y móviles de color verde (a causa de la presencia de clorofila a y b). *Tetraselmis* está considerada como el alga flagelada marina más fácil de cultivar a gran escala y se utiliza como alimento para larvas de moluscos y crustáceos con un valor nutritivo considerable. Las células tienen forma comprimida elíptica, casi esférica. El extremo anterior presenta una invaginación de la cual salen 4 flagelos iguales en 2 pares opuestos. La célula contiene un único cloroplasto en forma de copa (muy raramente 2 cloroplastos), en general con un pirenoide central. Solo presenta una mancha ocular, situada en uno de los lados aplanados de la célula y su posición varía dependiendo de la especie. La división es asexual en la fase no móvil y se realiza por división celular binaria, momento en el cual las células pierden el estado móvil y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de la liberación de la teca [20]. *Tetraselmis chuii* y *Tetraselmis suecica* presentan características que pueden considerarse prácticamente iguales para la realiza-



ción de sus cultivos y posterior explotación. Ambas presentan un uso extenso en el cultivo de crustáceos, moluscos y, como eslabón primario en la cadena alimentaria, larvas de peces que, como la dorada, son criados en piscifactorías. Las microalgas de distintas especies se comercializan actualmente en algunos países como complementos alimenticios y como ingredientes de diferentes alimentos (pasta, sopa, pan, arroz, bebidas, cereales y condimentos). Estudios recientes han demostrado que *T. suecica* y *T. chuii* pueden ser utilizadas para el consumo humano, tal y como ocurre en otras especies, fundamentalmente con *Chlorella sp.*, cuyo consumo es una práctica extendida en Norteamérica. Se ha realizado de forma comparativa el perfil de aminoácidos que contienen las especies de microalgas *T. chuii*, *T. suecica* y *Chlorella pyrenoidosa*, mostrando un contenido de aminoácidos similar. Además, se realizó un análisis de contenido microbiológico patógeno para confirmar que, en el caso de las especies de *Tetraselmis*, se encontraban debajo del límite establecido por la Unión Europea para los productos alimenticios, que se sitúa en <10 ufc/g [40]. *T. suecica* presenta una forma generalmente oval, con 4 flagelos isodinámicos que salen de una invaginación apical que se observa en la porción anterior de la célula y que está ubicada en la misma dirección en la que avanza. Su tamaño celular es de 8 a 10 μm de diámetro [41]. *T. suecica* es una de las especies más utilizadas en acuicultura y es considerada una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga [42]. Esta especie se emplea para alimentar rotíferos y cultivos planctónicos y larvas de teleosteos marinos [43]. En cultivos heterotróficos, *T. suecica* tiene una composición celular proximal de proteína del 10,5 %, 51,9 % de carbohidratos y 14 % de lípidos [44]. Cuando se aplican diferentes tasas de renovación (del 10 al 50 %), el contenido de proteína varía desde un 13 a un 22 %, el de carbohidratos desde un 6 a un 42 % y el de lípidos se mantiene más constante, con un contenido que va desde 8,9 hasta el 10,8 % [45]. Otros autores que han producido biomasa de esta microalga en cultivo semicontinuo obtuvieron una composición del 45 % de proteína, 13 % de carbohidratos y 32 % de lípidos [45], observándose además que el contenido de los ácidos grasos alcanzaba un promedio del 4,6 % del peso celular, donde el 2 % corresponde a ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) [46]. *T. suecica*, además de ser rica en proteínas, lípidos y carbohidratos, contiene α -tocoferol (vitamina E), carotenoides (como fucoxantina y β -caroteno) y, como toda planta verde, clorofila. La cantidad de todos estos componentes también variará en función de las condiciones y el sistema de cultivo [47]. *T. chuii* fue aislada por primera vez en el año 1959 por Butcher en las costas de Gran Bretaña y posteriormente ha sido aislada en diferentes partes del mundo, incluida la Bahía de Cádiz. *T. chuii* presenta una morfología muy similar a *T. suecica*. Presenta un pirenoide intraplasmático, el polo anterior lobulado y cuatro flagelos apicales iguales dispuestos en parejas enfrentadas. Son células ovoides de 12-14 x 9-10 μm con estigma y vacuolas pulsátiles [48]. Su contenido en proteínas, hidratos de carbono y minerales es alto y las proteínas contienen ácido glutámico, ácido aspártico y leucina como aminoácidos más abundantes, y todos los aminoácidos esenciales. El calcio es el elemento más abundante en el liofilizado dentro del grupo de los minerales, siendo también abundantes los cloruros y el sodio. Las grasas representan el 6,7 % del liofilizado, y aproximadamente el 50 % de los ácidos grasos son poliinsaturados (PUFA), siendo el ácido linoléico el más abundante. Los resultados para la cantidad de hidratos de carbono totales en porcentaje rondan el 31,6 % [40].

El género *Dunaliella* (Reino *Plantae*, División *Chlorophyta*, Clase *Chlorophyceae*, Orden Chlamydomonadales, Familia Dunaliellaceae) incluye un conjunto de microalgas unicelulares que difieren extraordinariamente en tamaño y forma. Sus dimensiones oscilan entre 8 y 25 μm de largo y entre 5 y 15 μm de ancho. Pueden ser ovoides, alargadas o esféricas, con una papila apical bien definida cuando se trata de individuos pequeños y ovoides, o elípticas con un estrechamiento en la parte central y una papila apical muy pequeña o ausente cuando las células son grandes. Son móviles, debido a la presencia de dos flagelos apicales de igual longitud [49]. La célula contiene un gran cloroplasto en forma de copa con un pirenoide simple embebido en la pared basal. Este pirenoide está rodeado de gránulos de polisacáridos que son el producto de reserva. Su principal característica morfológica es la ausencia de una pared celular rígida de polisacáridos que hace que el alga seca sea fácil y completamente digerible para los animales y humanos. La célula está incluida en una delgada y elástica membrana plasmática y una envuelta mucídica. Por tanto, es capaz de responder rápidamente a cambios osmóticos, alterando su forma y volumen celular. Esta falta de pared celular rígida incrementa su sensibilidad a fuerzas de tensión externa e impone algunas limitaciones a la manipulación de los cultivos. Independientemente de su tamaño, se reproducen por división longitudinal, manteniendo la movilidad celular durante el proceso de división. También pueden reproducirse de manera sexual. Además, el número de células grandes aumenta gradualmente durante la fase logarítmica de crecimiento que alcanza su máximo en la fase estacionaria. Los cistos son células redondeadas, de color rojo y gran tamaño que pierden los flagelos y por tanto su movilidad [50]. Estos cistos vegetativos tienen lugar en



cultivos en fase estacionaria, con reducida salinidad, ausencia de nitrógeno y presencia de sulfatos. La intensidad luminosa no parece ejercer ningún efecto. Sin embargo, la baja temperatura aumenta su formación [51]. Especies de este género se cultivan para su utilización como fuente de alimento en acuicultura debido a su alta composición celular en proteínas, carbohidratos y lípidos, así como su tolerancia a los diferentes medios de cultivo [52]. *Dunaliella salina* es la fuente algal más rica en beta-caroteno y glicerol [53]. Esta alga es halotolerante y suele ser cultivada en estanques abiertos, donde la temperatura es moderada y la irradiación, elevada. Estos parámetros propician condiciones de alta salinidad perfectas para el crecimiento óptimo de *Dunaliella salina*, entre un 6 y un 12 % de NaCl. Esta alta concentración de sal reduce el número de especies predatoras, lo que limita el fallo del cultivo o exterminio de este. Puesto que *D. Salina* sobrevive en un medio inorgánico simple, el crecimiento de organismos no fotosintéticos, tales como bacterias y hongos que no se puedan alimentar de la propia alga, está seriamente limitado [52]. *D. Salina* tiene una composición celular aproximada de 50-60 % de proteínas, 30-40 % de carbohidratos y 6-8 % de grasas, aunque esta composición cambia con el medio y las condiciones de cultivo. El contenido en proteínas es mayor en los primeros estadios del crecimiento. Sin embargo, las células rojas, ricas en carotenoides, tienen solo un 30 % de proteínas, un 11 % de carbohidratos y un 18 % de lípidos [54]. *Dunaliella* contiene, además de clorofila a y b, una amplia variedad de carotenoides y xantofilas: alfa caroteno, beta-caroteno, cys-landa caroteno, luteína, anteraxantina, biolaxantina, zeaxantina y neozantina, siendo el beta-caroteno y la luteína los más abundantes. En condiciones de crecimiento seleccionadas, *D. salina* acumula grandes cantidades masivas de beta-caroteno (aproximadamente el 10 % del peso seco del alga) además de glicerol (20-40 %). Aparte de las altas concentraciones de pro vitamina A (b-caroteno), *Dunaliella* contiene tiamina, pirodoxina, rivo flavina, ácido nicotínico, biotina y tocoferol, siendo alguna de estas vitaminas excretadas al medio [55]. Esta alga presenta una considerable capacidad de adaptación a distintas concentraciones de sal, crece en distintos medios y contiene desde 50 mM de NaCl (menos salinos que el agua de mar) hasta casi 5,5 M de NaCl (límite de saturación de esta sal), considerándose el organismo eucarionte conocido de mayor tolerancia a la sal. El mecanismo por el cual se adapta a estas variaciones se denomina osmorregulación. El crecimiento óptimo se da a concentraciones aproximadas de 2 M de NaCl.

Nannochloropsis (Reino *Chromista*, División *Ochrophyta*, Clase *Chrysophyceae*, Orden Eustigmatales, Familia Monodopsidaceae) se considera un género con gran potencial en la industria debido a su facilidad para acumular altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados. Además muestra características prometedoras que pueden permitir la manipulación genética dirigida a la mejora genética de las cepas actuales. Actualmente se emplea como una fuente de alimento rico en energía para rotíferos y larvas de peces [56-57]. Este género incluye un conjunto de microalgas unicelulares tanto de aguas dulces como salobres. Presentan forma esférica de un diámetro de 2 a 3 μm , y una ultraestructura muy simple con elementos estructurales reducidos en comparación con otros taxones [58], no siendo móviles y no presentando ninguna característica morfológica distintiva. Por ello, es muy complejo distinguir cualquiera de las especies por microscopía óptica o electrónica. La caracterización se realiza principalmente por el gen *rbcl* y el análisis de las secuencias del ADN ribosómico de 18S [59]. Presentan clorofila a pero carecen totalmente de la b y c. Sin embargo, contienen una alta gama de pigmentos accesorios tales como la astaxantina, zeaxantina y cantaxantina [60]. *Nannochloropsis gaditana* es una especie picoplanctónica marina con células pequeñas (2-4 μm de diámetro) esféricas un poco ovoides y no flageladas. El cloroplasto sin pirenoides ocupa la mayor parte de la célula, contiene una serie de laminillas paralelas formadas por tres tilacoides cada una y carece de laminilla envolvente [55]. El cloroplasto y el retículo endoplasmático son continuos con la envoltura nuclear. *N. gaditana* se aisló de muestras de agua de la Bahía de Cádiz y desde entonces se mantiene en cultivo en las condiciones especificadas por Lubian [61]. El tamaño y forma de las algas es susceptible de variación dependiendo de las condiciones de cultivo y a lo largo de su crecimiento. Las células de *N. gaditana* presentan una forma elipsoidal de 3,5-4 x 2,5-3 μm cuando la población algal está en fase de crecimiento activo y en estas circunstancias pueden distinguirse de las de *N. oculata* y *N. salina*. Las restantes características morfológicas son similares en las tres algas. Son inmóviles, desprovistas de flagelos y poseen un cromatóforo sencillo parietal de color verde pálido que ocupa gran parte de la célula. El citoplasma es fuertemente basófilo y presenta una gran acumulación de lípidos. Además, se observa frecuentemente la presencia de un glóbulo extraplastidial, de color rojo, sobre todo en cultivos envejecidos. La pared celular es lisa y formada de una sola pieza, aunque en *N. gaditana* esta es más gruesa y resistente que en otras especies. En ningún caso se han detectado zoosporas ni formas de resistencia y la reproducción se realiza exclusivamente mediante fisión binaria de las células [62]. *N. gaditana* presenta clorofila a, b-caroteno, violaxantina como carotenoide mayoritario y vaucheriaxantina.



Estos pigmentos, junto a otros carotenoides secundarios, entre los que se encuentran la cantaxantina y la astaxantina, también son comunes en *N. oculata* y *N. salina*. La diferencia fundamental entre ellas concierne a la presencia constante de alfa caroteno en *N. gaditana*, mientras que las otras dos especies carecen de este pigmento [63]. Los cultivos de estos organismos tienen color verde durante la fase exponencial del crecimiento pero conforme envejecen se vuelven amarillentos y llegan a ser de color naranja-rojo. Este cambio ocurre más rápidamente en ausencia de nitrógeno o frente a una alta radiación lumínica y es entonces cuando se hace especialmente patente en las células el glóbulo coloreado. *N. gaditana* es autótrofa y no requiere vitaminas para su crecimiento. Si se le suministra nitrato, nitrito, amonio o urea como fuentes de nitrógeno a una concentración en el medio de cultivo de 0,5 mg de N/litro, se obtiene un crecimiento óptimo con los tres primeros compuestos, mientras que este es sensiblemente menor con urea. Además de fosfato inorgánico, pueden utilizar glicerofosfato como fuente alternativa de fósforo, ya que poseen actividad fosfatásica alcalina [64]. Frente a factores como la salinidad, temperatura e intensidad lumínica, se puede afirmar que toleran un amplio rango de salinidad y que la intensidad saturante de luz es bastante baja en comparación con otras algas. Esto se debe probablemente a la presencia de una sola clorofila, lo que confiere una menor estabilidad al aparato fotoquímico en presencia de altas intensidades de luz [64].

Las cianobacterias del género *Arthrospira* (Reino Eubacteria, División *Cyanophyta*, Clase *Cyanophyceae*, Orden *Oscillatoriales*, Microcoleaceae) se conocen como Espirulina cuando se comercializan como suplemento dietético. Son organismos de estructura filamentosa multicelular (alga verde azulada) formados por células cilíndricas de 6-12 µm de diámetro [65]. Esta especie de microalga está suponiendo una revolución en la industria alimentaria debido a su uso junto con otras especies como una fuente de sustancias con alto valor nutritivo de ácidos grasos, aminoácidos esenciales y vitaminas que son complementos excepcionales para la alimentación humana y pueden aportar grandes beneficios para las personas. Por este motivo, cada vez se suscita mayor interés en su investigación, y su aplicación se dirige al campo de la biotecnología aplicada a la alimentación. Las especies *Arthrospira* (*Espirulina*), *Chlorella* spp., *Dunaliella salina* y *Aphanizomenon* están aprobadas para uso humano en países como China, Estados Unidos, Alemania o Australia, principalmente en suplementos alimenticios o aditivos. Los géneros de microalga (*Chlorella* y *Arthrospira*) tienen un alto valor nutritivo que les hace importantes candidatos para ingredientes activos para alimentos que puedan reforzar las carencias nutricionales de colectivos deficitarios en defensas, tales como niños, ancianos, o en situaciones especiales de estrés o enfermedad para otros colectivos poblacionales. La espirulina es una microalga que puede alcanzar un alto contenido proteico del 70 %, además de ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas. Es fácil de multiplicar, su producción es económica y está considerada un superalimento consumido por atletas de nivel olímpico y alimento de los astronautas. Sesenta gramos bastan para alimentar a una persona por día, con 10 gramos diarios se puede sobrevivir [66]. La industria de la alimentación está invirtiendo mucho en investigación y desarrollo en este campo. De hecho, actualmente en España ya se pueden encontrar recetas de alta cocina con *espirulina* y *chlorella* como ingredientes. Pueden comprarse pastillas de alto valor nutricional de estas especies, así como galletas y todo tipo de alimentos realizados con estas microalgas. Todos estos avances indican claramente una gran expansión de esta industria y otorga al campo del cultivo de microalgas un futuro cada vez más prometedor como fuente nutricional.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con la ayuda de los proyectos internos de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir PRUCV2015/640-CO2-01 y PRUCV 2015/162-001.

REFERENCIAS

- [1] M. Brown, S. Jeffrey, J. Volkman, G. Dunstan, Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture* **151** (1997) 315-331.
- [2] G. Treece, M. Yates, *Laboratory manual for the culture of Penaeid shrimp larvae*, Marine Advisory Service Sea Grant Collage Program, Texas A&M University, 1993.

- [3] Y. Liang, N. Sarkany, Y. Cui, Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, *Biotechnology Letters* **31** (2009) 1043-1049
- [4] H. Harder Rvon Witsch *Über Massenkultur von Diatomeen*. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 1st ed, 1942.
- [5] M. Borowitzka, High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J Appl Phycol* **25** (2013) 743-756.
- [6] Geoffrey W. Garnham, Geoffrey A. Codd, Geoffrey M. Gadd, Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green microalga *Chlorella salina* immobilized in alginate microbeads, *Environmental Science & Technology*, **26** (1992) 1764-1770
- [7] A. Richmond, *CRC Handbook of microalgal mass culture*, Boca Raton, Fla, CRC Press, 1986.
- [8] J. Callegari, Feu vert pour les microalgues, *Biofem* **76** (1989) 25-40.
- [9] L. Torrentera Blanco, FAO, *La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura: una diagnosis.*, Italia (2016).
- [10] E. Becker, *Microalgae*, Cambridge: Cambridge University Press (1994).
- [11] W. Barclay, K. Apt, The microalgae cell with reference to mass cultures: Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications. En: Richmond A, Hu Q, editores. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. 2a ed. Wiley Blackwell, (2013) 69-79.
- [12] T. J. Lundquist, I. C. Woertz, N. W. T. Quinn, J.R. Benemann, *A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel*, Production, Energy Bioscience Institute, University of California, Berkeley, California, USA, (2010) 1-153.
- [13] J. J. Brand, R. A. Andersen, D.R. Nobles, The microalgae cell with reference to mass cultures: Maintenance of microalgae in culture conditions. En: Richmond A, Hu Q, editores. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. 2a ed. Wiley Blackwell, (2013) 9-89.
- [14] P. M. Doran, *Bioprocess engineering principles.*, London, Academic press limited, 2013.
- [15] Q. Hu, *The microalgae cell with reference to mass cultures: Environmental effects on cell composition*. En: Richmond A, Hu Q, editores. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. 2a ed. Wiley Blackwell, (2013) 114-121.
- [16] B. Valdivia, J. Benavente-Valdés, J. Montañez, C. Aguilar, A. Méndez-Zavala, Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores, *Acta Química Mexicana* **7** (2012)
- [17] A. Carvalho, L. Meireles, F. Malcata, Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances, *Biotechnol Prog* **22** (2006) 1490-1506.
- [18] J.C.M. Pires *et al.*, Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept, *Renewable and sustainable energy reviews* **16** (2012) 3043-3057.
- [19] M. I. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, Brock: *biología de los microorganismos*, 10a ed, Madrid, Pearson educación, (2003).
- [20] T. Torzillo, A. Vonshak, *The microalgae cell with reference to mass cultures: Environmental stress physiology with reference to mass cultures*, En: Richmond A, Hu Q, editores. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. 2a ed. Wiley Blackwell, (2013) 90-113.
- [21] L. A. Velasco, J. Barros-Gómez, G. H. Ospina, C. A. Trujillo, Effect of light intensity, temperature and salinity on the growth of *Isochrysis galbana*, *Intropica* **4** (2009) 93-99.
- [22] J. Fernandez Sevilla, Cultivos por lotes, continuos y semicontinuos. Disponible en: www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1-generalidades/1-5-modos-de-cultivo.html. [Último acceso: 2017].
- [23] R. Butcher, *Introduction and chlorophyceae*, London, H.M.S.O., 1959.
- [24] R. L. Guillard, *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. En: Smith PB, editor. *Culture of Marine Invertebrates*, New York, Plenum Press (1995) 26-60.
- [25] V. M. Trujillo, *Manual de técnicas de aislamiento de cepas de microalgas*, Informe Técnico, Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura. 1997; 29.
- [26] American Public Health Association (APHA). *Standards methods for the examination of water and wastewater*. 22a ed., 2012.
- [27] J. A. López-Elías, C. Báez, N. Huerta, Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. *Cictus* **5** (1995) 47.
- [28] J. R. Clayton, Q. Dorteh, S. S. Thoresen, S. I. Ahmed, Evaluation of methods for the separation and analysis of proteins and free amino acids in phytoplankton samples, *J Plankton Res*, **10** (1988) 341-58.



- [29] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265-275.
- [30] M. K. A. Dubois, J. K. Gilles, P. A. Hamilton, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analyt. Chem.* **28** (1956) 6-350.
- [31] J. Folch, M. Lees & D. H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue, *J. Biol. Chem.* **226** (1957) 497-509.
- [32] E. G. Bligh & W. J. Dyer, A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** (1959) 911-917.
- [33] C. Bisogno, I. Khozin-Goldberg, S. Boussiba, A. Vonshak & Z. Cohen, Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochlorosis incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* **60** (2002) 497-503.
- [34] Yuan-Kun Lee, Wei Chen, Hui Shen, Danxiang Han, Yantao Li, Howland D. T. Jones, Jerilyn A. Timlin, and Qiang Hu. *Basic culturing and analytical measurement techniques*. En: Richmond A, Hu Q, editores. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. 2a ed. Wiley Blackwell, (2013) 37-68.
- [35] V. J. Kilmer, *Silicon*. En: Methods of soil analysis. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy. Black CA, editor. Vol 2. Madison, WI, (1965) 959-962.
- [36] C.L. Elliott, G.H. Snyder. Autoclave-induced digestion for the colorimetric determination of silicon in rice straw. *J. Agric. Food Chem.* **39** (1991) 118-119.
- [37] E. Hansmann, *Pigment Analysis*. En: Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements. Stein J, editor. Cambridge Press, 1973.
- [38] S. W. Jeffrey, G.F. Humphrey, New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton, *Biochem. Physiol. Pflanz.* **167** (1975) 191-194.
- [39] A. Villa, D. Herazo, A. C. Torregroza, Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (clon c-cal) en cultivos estáticos, *Intropica* **9** (2014) 111-117.
- [40] Comité Científico. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de la microalga marina *Tetraselmis chuii* en el marco del Reglamento (CE) N.º 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios, 2013.
- [41] T. Morineau, P. Legentilhomme, P. Jaouen, B. Lépine, Y. Rince, Influence a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*, *Biotechnology Letters*, **23** (2001) 1539-1545.
- [42] J. Fábregas, A. Otero, A. Domínguez, M. Patiño, Growth Rate of the Microalga *Tetraselmis suecica* Changes the Biochemical Composition of *Artemia* Species, *Marine Biotechnology*, **3** (2001) 256-263.
- [43] R. Ulloa Mercado, *Inducción de productos bioactivos en el alga Tetraselmis suecica*, Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, 2011.
- [44] M. Azma, R. Rahim, R. Mohames, A. Aria, Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and biofuel production. Lecture presented at International Advanced of Technology Congress. Malaysia, 2009.
- [45] G. Chini Zittelli, L. Rodolfi, N. Biondi, M. Tredici, Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns, *Aquaculture* **261** (2006) 932-943.
- [46] P. Seixas, M. Rey-Méndez, L. Valente, A. Otero, Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture* **283** (2008) 83-91
- [47] E. C. Carballo-Cárdenas, P. Tuan, M. Janssen, R. Wijffels, Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering* **20** (2003) 139-147.
- [48] Gobierno de España, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. ID-TAX, Fitoplancton. Disponible en: www.eportal.magrama.gob.es/id_tax/clave/inicio/2. [último acceso 2017].
- [49] P. Leonardi, E. Caceres, Comparative analysis os the fine structure of young and adult individuals of *Dunaliella Salina* (Polyblepharidaceae, Chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus, *Journal of Phycology* **30** (1994) 642-653.
- [50] M. Borowitzka, J. Huisman, The Ecology of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Volvocales): Effect of Environmental Conditions on Aplanospore Formation, *Botanica Marina* **36** (1993) 233-244.
- [51] H. Montoya, A. Olivera, *Dunaliella salina* from saline environments of the central coast of Peru, *Hydrobiologia* **267** (1993) 155-161.
- [52] H. Davis, R. Guillard, *Relative value of ten genera of micro-organisms as foods for oyster and clam larvae*, Washington, D.C.: U.S. G.P.O., 1958.



- [53] A. San Pietro, *Biochemical and photosynthetic aspects of energy production*, New York, Academic Press, 1980.
- [54] L. Borowitzka M. Borowitzka, *Micro-algal biotechnology*. Cambridge [Cambridgeshire]: Cambridge University Press,
- [55] A. Carlucci A, P. Bowes, Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture, *Journal of Phycology* **6** (1970) 393-400.
- [56] Y. C. T. B. Assaf Sukeni, Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp, *Journal of Phycology* **25** (1989) 686-692.
- [57] S. Boussiba, A. Vonshak, Z. Cohen, Y. Avissar, A. Richmond, (1987). Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*, *Biomass* **12** (1987) 37-47.
- [58] R. Kandilian, E. Lee, L. Pilon, Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra. *Bioresource Technology* **137** (2013) 63-73
- [59] R. Andersen, R. Brett, D. Potter, J. Sexton, Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 18S rDNA, with Emphasis on *Nannochloropsis*, *Protist.* **149** (1998) 61-74.
- [60] L. M. Lubian *et al.*, *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments, *Journal of Applied Phycology* **12** (2000) 249-255.
- [61] L. Lubian, Ultraestructura y pigmentos de algunas Chlorophyceae y Eustigmatophyceae planctónicas de morfología similar, *Collectanea Botanica* **13** (1982) 873-880.
- [62] L.M. Lubián, *Nannochloropsis gaditana* sp. nov, una nueva Eusiigmatophyceae marina, *Larazoa* **4** (1982) 287-293.
- [63] L. Lubian, Factores que afectan al crecimiento en cultivo del alga planctónica *Nannochloropsis* sp., *Inf Tc Ins Inv Pesq.* **67** (1981) 1-14.
- [64] L. L. Establiher R., Estudio comparativo de la composición de pigmentos en varias cepas de *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), *Inv Pesq.* **46** (1982) 379-389.
- [65] A. Belay, *Biology and Industrial Production of Arthrospira (Spirulina)*. En: Richmond A, Hu Q, editores. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. 2a ed. Wiley Blackwell, p. 339-358, 2013.
- [66] E. P. López, *Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo*. Volumen 31, N.º 1. IDESIA (Chile) Enero-Abril, (2013) 135-139.



