

Artículo original

**CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO DE LA MICROALGA
NANNOCHLOROPSIS OCULATA (EUSTIGMATALES:
MONODOPSIDACEAE) EN ENSILADO BIOLÓGICO DE PESCADO
MIXOTROPHIC GROWTH OF THE MICROALGAE
NANNOCHLOROPSIS OCULATA (EUSTIGMATALES:
MONODOPSIDACEAE) ON BIOLOGICAL FISH ENSILAGE MEDIUM**

Heidi Sánchez-Torres^{1,3}, Juan Juscamaita¹ & Jessie Vargas²

¹ Laboratorio de Biorremediación. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.
Av. La Molina s/n, Lima 12, Perú. (511) 349-5647.

² Laboratorio de Acuicultura. Facultad de Pesquería, Universidad Nacional Agraria La Molina.
Av. La Molina s/n, Lima 12, Perú. (511) 349-5647.

³ correo electrónico: heidi.isabel@gmail.com.

ABSTRACT

Nannochloropsis oculata was grown in batch culture during 12 days until stationary phase, under constant temperature and illumination 24 h per day, using three different culture media (T1 – Guillard F/2, T2 – Yashima and T3 –biological fish ensilage). We found that *N. oculata* reached high cellular densities in treatment T3, although it showed low chlorophyll concentrations per biomass unit, which is inconsistent with autotrophic growth. It suggests that *N. oculata* could growth mixotrophically in biological fish ensilage.

Key words: fishing residue, Mixotrophy, microalgae, *Nannochloropsis oculata*, organic medium.

RESUMEN

Se cultivó a *Nannochloropsis oculata* en lote durante 12 días hasta alcanzar la fase estacionaria, con temperatura e iluminación constante las 24 h del día utilizando tres diferentes medios de cultivo (T1 – Guillard F/2, T2 – Yashima y T3 –ensilado de pescado). Se encontró que *N. oculata* alcanzó altas concentraciones celulares en el tratamiento T3, aunque presentó bajas concentraciones de clorofila por unidad de biomasa, lo que es inconsistente con un crecimiento autotrófico. Esto sugiere que *N. oculata* es capaz de crecer mixotroficamente sobre el ensilado biológico de pescado.

Palabras clave: medios orgánicos, Mixotrofia, microalgas, *Nannochloropsis oculata*, residuos pesqueros.

INTRODUCCIÓN

En la industria acuícola es cada vez más frecuente el uso de medios de cultivo alternativos a los medios químicos tradicionales (puros y químicamente definidos, como el medio F/2 Guillard). Estos medios alternativos están basados mayormente subproductos de otras industrias, en cuya composición se encuentra fuente de C, N, P, microelementos y otros nutrientes. En la actualidad son utilizadas diversas harinas (de pescado, soya, lombriz de tierra, girasol), gallinaza, extractos de excretas de vaca, gas oil, melaza de caña, exudados gomosos de *Acacia macracantha*, extractos de macroalgas, bokashi y residuales pesqueros (De la Cruz & Alfonso 1975, Granados & Bückle 1983, Paniagua & Bückle 1983, Chinchayan 1996, Leal et al. 2004, Veral et al. 2006). En ensilado biológico de pescado ha sido probado eficazmente como medio de cultivo para la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1981 en condiciones de autotrofia (Sánchez-Torres 2007).

Muchas microalgas, entre ellas *N. oculata* 1981, son capaces de utilizar compuestos orgánicos para su crecimiento (Hu & Gao 2003). Los diversos tipos de nutrición organotrófica en microorganismos fotosintéticos están relacionados con la utilización de energía luminosa y CO₂, además de los compuestos orgánicos asimilados. En el caso que utilice simultáneamente para su crecimiento luz y sustratos orgánicos, la microalga manifiesta una capacidad mixotrófica. Los cultivos mixotróficos producen una elevada cantidad de biomasa comparada a las obtenidas en autotrofia y heterotrofia, y ello se debe posiblemente al efecto energético de la luz y del sustrato orgánico (Moronta et al. 2006).

En este trabajo se analiza la posibilidad de que *N. oculata* se desarrolle en mixotrofia, considerando que los medios basados en ensilado biológico de pescado contienen grandes cantidades de carbono orgánico, especialmente ácido láctico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los cultivos se realizaron en el Laboratorio de Acuicultura, en el área de Alimento Vivo de la Facultad de Pesquería y en el Laboratorio de Biorremediación, de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

Organismos

Se utilizó una cepa de microalga *N. oculata* proveniente del Laboratorio de Microalgas del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), que fue reaislada a partir de un cultivo masivo mediante la técnica de rayado en placa y el método de la pipeta capilar para obtener un cultivo axénico.

Medios y condiciones de cultivo

Se utilizó agua de mar natural con salinidad reducida de 40‰ a 20‰ con agua destilada, y se filtró posteriormente con un papel filtro de paso lento, para finalmente ser esterilizada por autoclavado. Se compararon tres tratamientos. Los dos primeros medios de cultivo fueron usados como controles. El tratamiento 1 (T1, Guillard), consistió en agua de mar natural 20‰ enriquecida con solución Guillard F/2 (composición final por litro: 75 mg KNO₃, 5,65 mg NaH₂PO₄·2H₂O, 4,360 mg EDTA·Na₂, 3,150 mg FeCl₃·6H₂O, 0,010 mg CuSO₄·5H₂O, 0,022 mg ZnSO₄·7H₂O, 0,010 mg CoCl₂·6H₂O, 0,180 mg MnCl₂·4H₂O, 0,006 mg Na₂MoO₄·2H₂O, 2 g cianocobalamina cristalina (B₁₂), 0,100 mg tiamina clorhídrica (B₁) y 0,001 mg biotina cristalina). El tratamiento 2 (T2, Yashima), en agua de mar natural 20‰ enriquecida con solución Yashima (composición final por L: 100 mg sulfato de amonio para agricultura 21 %, 15 mg superfosfato de calcio para la agricultura 21 %, 15 mg urea para la agricultura 21 % y Clewat 32, 30-50 g). La solución Clewat 32 es usada como fuente de micro-nutrientes y está compuesta por FeCl₂ 3,85g·L⁻¹, ZnCl₂ 1,66g·L⁻¹, MnCl₂ 7,75g·L⁻¹, CoCl₂ 0,17g·L⁻¹, CuSO₄

0,07g·L⁻¹, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 6,32g·L⁻¹, H₃BO₃ 24,70g·L⁻¹ y EDTA·Na₂ 0,05g·L⁻¹.

El tratamiento 3 (T3, Ensilado de pescado) se preparó a partir de ensilado biológico de pescado filtrado (en papel Whatman N°1). El ensilado se obtuvo del Laboratorio de Bioremediación de la Universidad Nacional Agraria La Molina, el cual fue preparado mediante ensilaje de residuos de pescado por fermentación con bacterias ácido-lácticas con melaza como fuente de carbono. La composición del ensilado biológico de pescado se muestra en la Tabla 1. El pH del ensilado fue de 4,2. El medio de cultivo consistió en agua de mar natural 20‰ enriquecida con la solución de ensilado en una concentración de 1mL·L⁻¹ (T6).

El cultivo fue en lote (batch) durante 12 días, tiempo en el cual todos los tratamientos alcanzaron la fase estacionaria del crecimiento. El cultivo del *N. oculata* se realizó a una temperatura 21°C±1°C, que fue controlada diariamente. La aireación fue de 0,5 vvm (15L·h⁻¹) con aire no enriquecido con CO₂. El pH no fue controlado, pero se verificó diariamente con un pHmetro digital que se mantuviera dentro del rango óptimo de crecimiento de *N. oculata* (pH 7,0-9,0). La

iluminación recibida fue artificial proveniente de fluorescentes cilíndricos las 24 h del día, con una iluminancia total de aproximadamente 1000 lux.

Monitoreo del crecimiento

Cada 24 h se midió con una cámara de Neubauer la densidad celular de cada uno de los tratamientos. Además se cuantificó diariamente la concentración de clorofila *a*, metabolito primario que funciona como un buen indicador de la biomasa de microalgas (Olvera *et al.* 2003). Para determinar la concentración de clorofila *a* esta se extrajo con metanol al 90% según los métodos descritos por Azov (Olvera *et al.* 2003). Las muestras para la determinación de clorofila se tomaron a la misma h en la que se realizó el conteo celular de microalgas desde el tercer hasta el séptimo día, tomando una muestra conjunta de las tres repeticiones de cada tratamiento. Los datos de densidad celular fueron convertidas a biomasa (húmeda) considerando que *N. oculata* tiene forma esférica, un diámetro aproximado de 4 μm y densidad protoplásmica de 1,05 kg·L⁻¹ (Tam *et al.* 2000), obteniéndose una biomasa para *N. oculata* de 2,11 × 10⁻¹³ kg·célula⁻¹.

Tabla 1. Composición del ensilado biológico de pescado utilizado.

| | Concentración (mg·L ⁻¹) |
|------------------------------|--|
| N total | 134,00 |
| P total | 3,85 |
| K total | 8,31 |
| Ca total | 7,36 |
| Mg total | 1,58 |
| Na total | 2,28 |
| B | 12,00 |
| Cu | 2,60 |
| Zn | 7,20 |
| Mn | 2,50 |
| Fe | 64,60 |
| M.O en solución (g/L) | 499,00 |

Tabla 2. Composición química de los medios utilizados en los tres tratamientos.

| | T1 | T2 | T3 |
|------------------------|----------------------------|-------|--------|
| Macronutrientes | | | |
| | (mg·L⁻¹) | | |
| N | 10,76 | 28 | 134,00 |
| P | 1,12 | 3,15 | 1,68 |
| K | 28,96 | - | 6,90 |
| Ca | - | 4,06 | 7,36 |
| Micronutrientes | | | |
| Mg | - | - | 1,58 |
| Na | 1,42 | - | 2,28 |
| B | - | 0,219 | 0,012 |
| Cu | 0,003 | 0,001 | 0,003 |
| Zn | 0,005 | 0,040 | 0,007 |
| Mn | 0,050 | 0,169 | 0,003 |
| Fe | 0,652 | 0,085 | 0,065 |

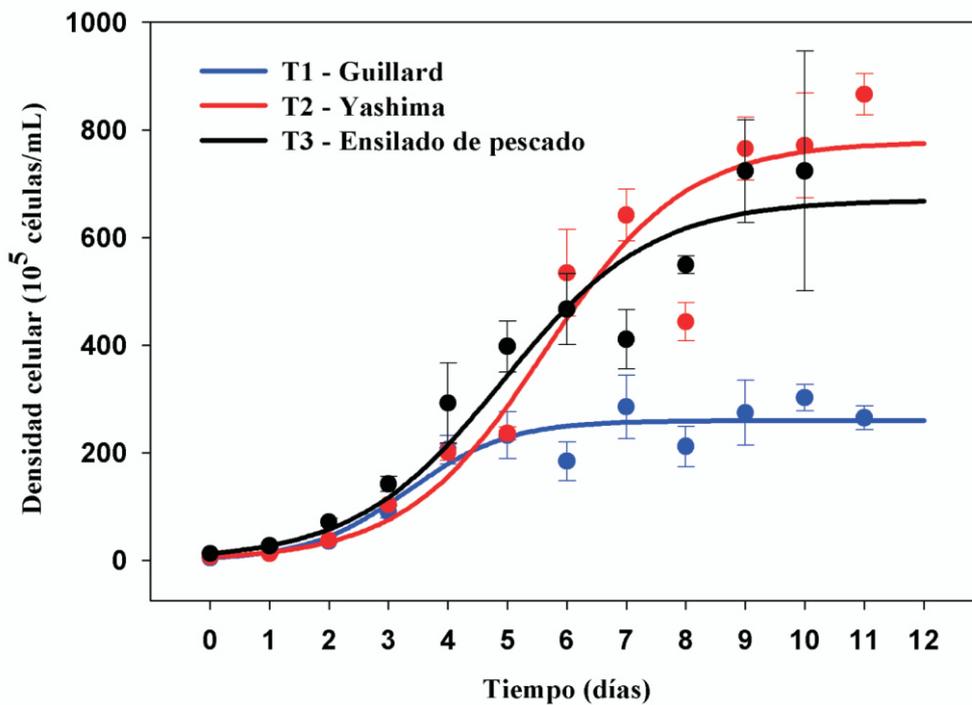


Figura 1. Densidad celular (10⁵ cel·mL⁻¹) durante el cultivo de *N. oculata* (días 0-11, n=3).

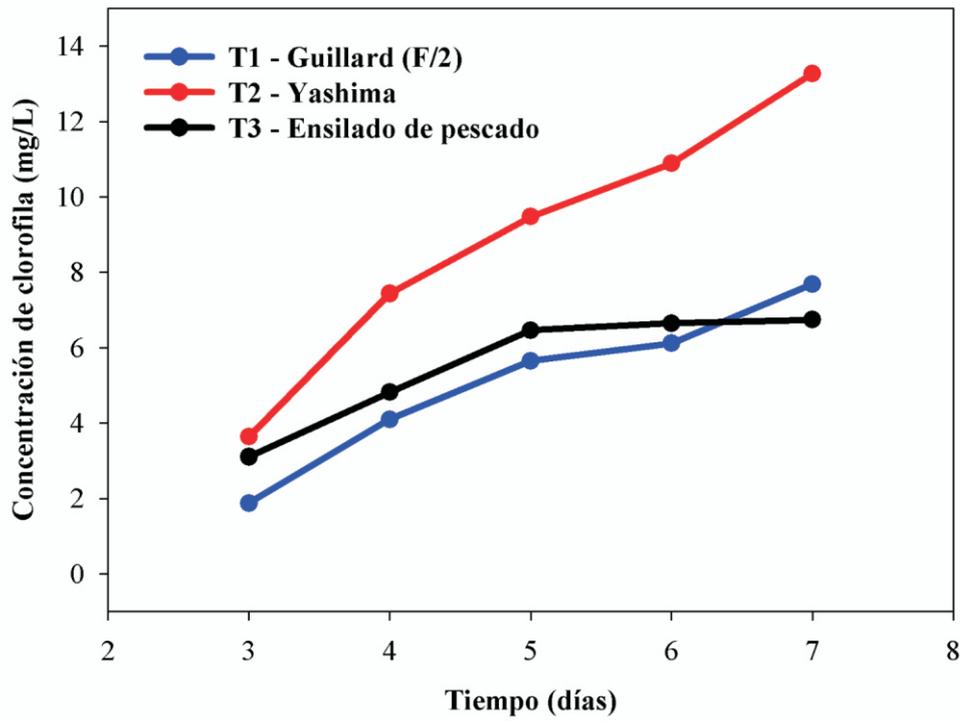


Figura 2. Concentración de clorofila ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante el cultivo de *N. oculata* (días 3-7).

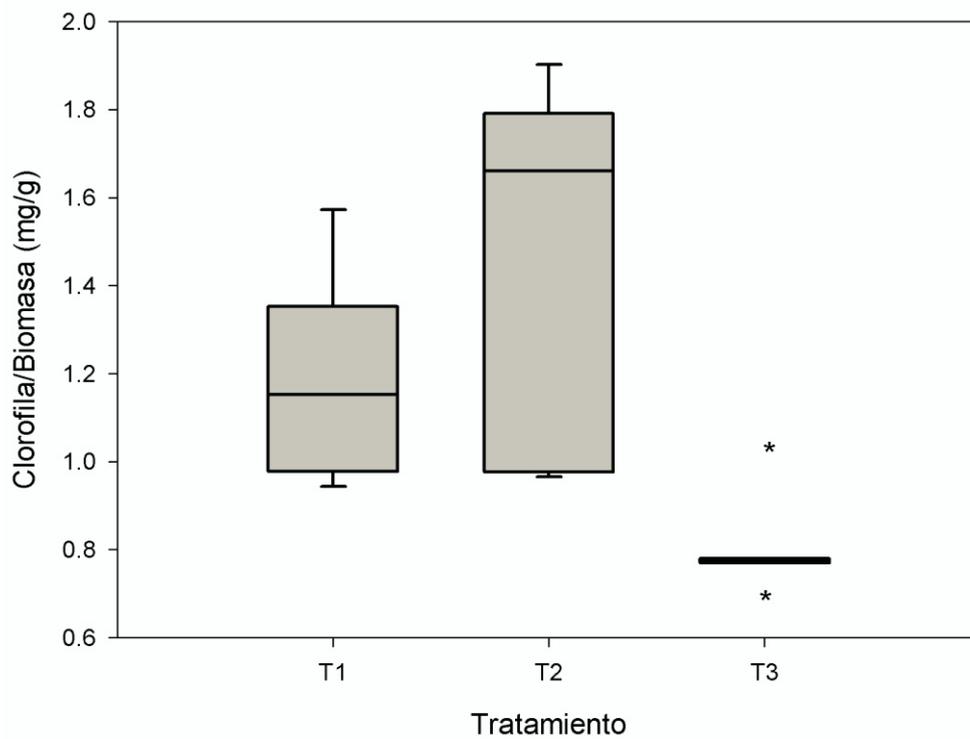


Figura 3. Concentración de clorofila ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) durante el cultivo de *N. oculata* (días 3-7, n=5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las curvas de crecimiento se muestran en la Fig. 1. Se observa que la mayor densidad celular ($865,8 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) se alcanzó con el T2 (Yashima), seguida de cerca ($723,3 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) por el T3 (Ensilado de pescado). La densidad más baja ($302,5 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) se obtuvo con el tratamiento 3, pues a pesar de ser el medio más utilizado para el cultivo de microalgas no está orientado a la producción masiva, sino a cultivos a nivel de laboratorio (Darley 1987). Estos resultados son consistentes con la concentración de nutrientes presente en cada uno de los medios (Tabla 2), en donde se observa la mayor concentración de T2 y T3 frente a T1. Sin embargo, en T2 se obtienen mayores densidades celulares a pesar de tener menor concentración de nutrientes, lo que se debe a un mejor balance N:P (Darley 1987) de T2 (20:1) frente a T3, con mayor balance de nitrógeno (177:1).

La concentración de clorofila fue medida como indicador del estado fisiológico de las microalga en relación al medio de cultivo utilizado (Fig. 2). Los resultados son consistentes con las curvas poblacionales obtenidas en los tratamientos T1 y T2, por lo que se puede afirmar que los medios utilizados lograron suministrar condiciones adecuadas para el desarrollo de *N. oculata*, pues de lo contrario se hubieran observado perturbaciones en las curvas de clorofila, especialmente cuando existe una fuerte limitación de nitrógeno o fósforo. En el T3, se observa que a partir del día 5, la concentración de clorofila en el cultivo se mantiene constante aunque como se puede ver en las curvas de crecimiento (Fig. 1), la biomasa siguió incrementándose. En condiciones normales, la concentración de clorofila *a* es un buen indicador de la evolución de la biomasa (Darley 1987).

Se determinó la concentración de clorofila *a* por unidad de biomasa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), en donde se observa que la media del tratamiento 3 fue menor a las de los otros tratamientos (Fig.

3), a la vez que presentó una menor dispersión. Esto sugiere la posibilidad de que el crecimiento en el T3 fuera mixotrófico, pues creciendo autotróficamente no se hubiera podido mantener el crecimiento observado al estar limitada su velocidad de crecimiento por la concentración relativa de clorofila. La poca dispersión en la concentración de clorofila por unidad de biomasa también apoya esta hipótesis del crecimiento mixotrófico, pues la concentración relativa de clorofila *a* tiende a incrementarse durante la fase exponencial (Darley 1987), aumentando su dispersión. En condiciones de mixotrofia no es necesario incrementar la concentración relativa de biomasa pues se dispone de otra fuente de carbono para sostener el crecimiento. Esta sería una cualidad importante a resaltar en el ensilado biológico de pescado como sustrato para *N. oculata* pues cuando se alcanzan altas concentraciones celulares, la disponibilidad de luz es limitante en el cultivo y el crecimiento mixotrófico puede atenuar esta limitación.

Se sugiere para futuros experimentos evaluar el potencial de *N. oculata* para crecer en condiciones de heterotrofia sobre ensilado biológico de pescado, así como analizar las condiciones de cultivo que permitirían obtener una mayor producción.

CONCLUSIONES

Nannochloropsis oculata es capaz de crecer mixotróficamente en medios basados en ensilado biológico de pescado.

El cultivo en ensilado biológico de pescado podría ser una alternativa para mejorar la producción de cultivos de microalgas, dado que se obtienen mayores producciones en condiciones de mixotrofia.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el laboratorio de Biorremediación (Facultad de Ciencias, UNALM) y el laboratorio de Acuicultura (Facultad de Pesquería, UNALM). Queremos agradecer al técnico

Eberth Vicente Armas y a los asistentes de investigación del Laboratorio de Biorremediación de la UNALM por el apoyo en el trabajo de laboratorio. También agradecemos a los técnicos Edwin Pinto, Carlos Arango y José Ortega del Instituto del Mar del Perú por sus consejos y apoyo, y al M.Sc. Ricardo Oliveros Ramos por sus valiosas sugerencias en la discusión de los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chinchayan, M. 1996. *Cultivo de la microalga Nannochloropsis oculata y su consumo por el rotífero Brachionus plicatilis (línea S)*. Tesis (Biólogo). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias. 104 p.
- Darley, W. 1987. *Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico*. México, Editorial Limusa. 236 p.
- De la Cruz, S. A. & Alfonso, E. 1975. Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. *Ciencias*, 8:1-25.
- Granados, C. & Bückle, L. 1983. Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. *An. Inst. Cienc. del Mar. Limnol.*, 11: 241-256.
- Hu, H. & Gao, K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnol. Lett.*, 25: 421-425.
- Leal, S.; Delgado G. & Almaguer, Y. 2004. Efecto de cinco tipos de productos zeolíticos sobre el crecimiento de la microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Invest. Mar.*, 25: 241-244.
- Moronta, R.; Mora, R. & Morales, E. 2006. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Rev. Fac. Agron-Luz*, 23:28-43.
- Olvera, R.; Ríos, E. & Vicente, V. 2003. *Manual de técnicas para el cultivo y extracción de Bioproductos a partir de Microalgas*. México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB). Instituto Politécnico Nacional (IPN). 70 p.
- Paniagua, J. & Bückle, L. 1983. Cultivo en condiciones controladas de *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con extractos de macrofitas marinas (fitoplancton). *An. Inst. Cienc. del Mar. Limnol.*, 12: 59-70.
- Sánchez-Torres, H. 2007. *Optimización de la producción de la microalga Nannochloropsis oculata (Droop) Hibberd como alimento vivo en acuicultura por enriquecimiento con ensilado biológico de pescado*. Tesis (Biólogo). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias. 115 p.
- Tam, J.; Vera, G.; Pinto, E. & Melgar, R. 2000. Modelo de simulación de los efectos ecotoxicológicos del cadmio sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve. *Inf. Prog. Inst. Mar Perú*, 130:3-12.
- Veral, A.; Martínez, M.; Morillo, K. & Montes, S. 2006. Cultivo discontinuo de *Chlorella* sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*. *Bol. Centro Inv. Biol.*, 38: 109-111.

Fecha de recepción: 02 de junio del 2008.
Fecha de aceptación: 13 de septiembre del 2008.