

*Nota de Investigación/Research Note*

Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri*  
cultivada en sistemas discontinuos y semicontinuos

Growth and biochemical profile of *Chaetoceros muelleri*  
cultured in batch and semicontinuous systems

N Lemus<sup>1</sup>, T Urbano<sup>1</sup>, B Arredondo-Vega<sup>2</sup>, M Guevara<sup>1\*</sup>, A Vásquez<sup>1</sup>, L Carreón-Palau<sup>2</sup>, N Vallejo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Acuicultura, ext. Plancton, Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Av. Universidad, Cerro Colorado. Apartado 6101, Sucre, Venezuela.

\* E-mail: miguevara2003@yahoo.es

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Apartado postal 128, La Paz, Baja California Sur, CP 23000, México.

**Resumen**

Se caracterizó bioquímica y poblacionalmente una cepa de *Chaetoceros muelleri* procedente de la Península de Araya (Venezuela), la cual se cultivó en condiciones de laboratorio ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $156 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y fotoperiodo 12:12) durante 13 días, bajo sistemas de cultivo discontinuo y semicontinuo con recambios diarios de 30% del volumen. Se evaluó la densidad celular y se determinó el tamaño celular. Se cuantificó el contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos grasos. La densidad celular tuvo poca variabilidad en el sistema semicontinuo en la fase de estabilización, obteniéndose en promedio  $1.3 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, mientras que en el discontinuo, este parámetro incrementó significativamente hasta alcanzar un máximo de  $3.5 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>. Proteínas, lípidos y carbohidratos no variaron significativamente en los cultivos semicontinuos, alcanzando promedios de  $21.4 \pm 0.8$ ,  $18.4 \pm 0.8$  y  $4.1 \pm 0.1$  pg cél<sup>-1</sup>, respectivamente. En el discontinuo, estas macromoléculas presentaron mayor variabilidad, con valores de proteínas entre 3.5 y 21.1 pg cél<sup>-1</sup>, lípidos entre 8.5 y 11.6 pg cél<sup>-1</sup> y carbohidratos entre 4.2 y 18.1 pg cél<sup>-1</sup>. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados mostraron valores superiores en los cultivos semicontinuos, con concentraciones de 47.5% y 34.8%, respectivamente. El contenido de ácidos grasos poliinsaturados fue mayor en el sistema discontinuo (31.4%), destacando la presencia del ácido eicosapentaenoico, 20:5 n-3 EPA, con una proporción de  $16 \pm 2\%$ . El tamaño celular medio de la microalga no varió en los dos sistemas de cultivo, observándose un ancho y largo medios de 5 y 7.5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. La cepa de *C. muelleri* puede suministrarse como alimento de larvas de organismos cultivables, siendo el sistema semicontinuo garantía de una calidad nutricional más estable.

*Palabras clave:* *Chaetoceros muelleri*, semicontinuo, Araya.

**Abstract**

We characterized the growth and biochemical composition of a *Chaetoceros muelleri* strain from the Araya Peninsula, Sucre, Venezuela. The microalga was cultured under laboratory conditions ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $156 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 12:12 photoperiod) during 13 days, using two culture methods: batch and semicontinuous culture with a daily renewal rate of 30%. Cell density was determined and cells from each treatment were measured. The protein, lipid, carbohydrate and fatty acid contents were quantified to compare the quality of the Araya strain in both culture systems. Cell density showed little variability in the semicontinuous system during the steady-state phase ( $1.3 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> on average), but increased significantly in the batch system, reaching  $3.5 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. Proteins, lipids and carbohydrates did not show significant variations in the semicontinuous system, with mean values of  $21.4 \pm 0.8$ ,  $18.4 \pm 0.8$  and  $4.1 \pm 0.1$  pg cells<sup>-1</sup>, respectively. In the batch system, however, these macromolecules showed greater variability: proteins 3.5–21.1 pg cells<sup>-1</sup>, lipids 8.5–11.6 pg cells<sup>-1</sup> and carbohydrates 4.2–18.1 pg cells<sup>-1</sup>. Higher levels of saturated (47.5%) and monounsaturated (34.8%) fatty acids were found in the semicontinuous system, whereas the content of polyunsaturated fatty acids (31.4%) was higher in the batch system, in particular of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) ( $16 \pm 2\%$  of total fatty acids). Cell size did not vary significantly in the two culture systems and the mean width and length were 5 and 7.5  $\mu\text{m}$ , respectively. The Araya strain of *C. muelleri* can be used as a food source for cultured larvae, the semicontinuous system providing a more stable nutritional quality.

*Key words:* *Chaetoceros muelleri*, semicontinuous, Araya, fatty acids, biochemical composition.

## Introducción

Las microalgas son esenciales como alimento para las primeras fases de desarrollo de la mayoría de las especies de moluscos, crustáceos y peces en cultivo, debido a su tamaño, fácil cultivo y probada calidad nutricional (Brown y Jeffrey 1992). Sin embargo, aunque varias especies de microalgas han sido utilizadas como alimento en maricultura, no todas producen un buen crecimiento y supervivencia en todas las especies cultivadas. Algunos de los factores que intervienen en el mayor o menor éxito en su uso son la talla, la digestibilidad y la composición bioquímica. Los componentes más importantes para la nutrición animal son las proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales, así como nutrientes específicos tales como aminoácidos y ácidos grasos esenciales, esteroides, azúcares y vitaminas (Brown *et al.* 1989).

La evaluación del valor alimenticio de varias especies de microalgas, medido en términos de crecimiento larvario de bivalvos y crustáceos, ha demostrado que especies del género *Chaetoceros* son uno de los mejores alimentos (Napolitano *et al.* 1990, Treece y Yates 1993, Mallo y Fenucci 2004).

En la búsqueda de mejores esquemas de manejo que permitan predecir el valor nutricional de las microalgas bajo condiciones controladas, se han ensayado diferentes estrategias de cultivo entre las que destacan la manipulación de las variables ambientales y los sistemas de cultivo. En el sistema de cultivo discontinuo o *batch*, no se añade ni se elimina medio de cultivo después de la inoculación, en el continuo se añade un suministro de nutrientes en forma continua al cultivo, manteniendo constante el volumen de cultivo, y en el semicontinuo se agrega medio de cultivo a una tasa de dilución constante.

En el presente estudio se planteó la caracterización de una cepa de *Chaetoceros muelleri* aislada del nororiente venezolano, de comprobada utilidad alimenticia en el cultivo de camarones peneidos (Núñez *et al.* 2002), como una forma de aumentar el número de estirpes autóctonas de microalgas con potencial para la maricultura, comparando los sistemas de cultivo discontinuo y semicontinuo.

## Materiales y métodos

### *Microorganismo seleccionado y condiciones de cultivo*

*Chaetoceros muelleri* cepa Araya (LAEP-35) se obtuvo del cepario del Laboratorio de Acuicultura, Extensión Plancton del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente, donde se mantiene a 37‰ en el medio Algal (Fábregas *et al.* 1984). Ésta fue aislada de los canales de suministro de agua para las lagunas artificiales de las salinas de Araya, estado Sucre, Venezuela.

Los cultivos se iniciaron con una densidad de  $2.3 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> en botellas de vidrio de 3 L de capacidad, conteniendo 1.5 L de agua de mar (37‰) filtrada con filtros GFC de 47 mm de diámetro y 1.2 µm de tamaño de poro, esterilizada en autoclave a 121°C, 15 psi, 15 min y enriquecida con medio Algal a

## Introduction

Microalgae are an essential food for the first developmental stages of most cultured mollusc, crustacean and fish species because of their size, easy cultivation and proven nutritional value (Brown and Jeffrey 1992). Nevertheless, though several microalgal species have been used as food in mariculture, not all have produced good growth and survival rates of the species being reared. Size, digestibility and biochemical composition are some of the factors that intervene in the greater or lesser success of their use. The most important components for the nutrition of animals are proteins, lipids, carbohydrates and minerals, as well as specific nutrients such as amino acids and essential fatty acids, sterols, sugars and vitamins (Brown *et al.* 1989).

Studies on the nutritional value of several microalgal species, measured in terms of the larval growth of bivalves and crustaceans, have shown that species of the genus *Chaetoceros* are one of the best food sources (Napolitano *et al.* 1990, Treece and Yates 1993, Mallo and Fenucci 2004).

In the search for better experimental procedures to determine the nutritional value of microalgae under controlled conditions, different cultivation strategies have been tested, including the manipulation of environmental variables and culture systems. In the discontinuous or batch method, culture medium is not added nor removed after inoculation, whereas in the continuous method, nutrients are supplied continuously, maintaining a constant culture volume, and in the semicontinuous method, culture medium is added at a constant dilution rate.

The purpose of this study was to characterize a strain of *Chaetoceros muelleri* from northwestern Venezuela, reported to be of nutritional value in the culture of penaeid shrimp (Núñez *et al.* 2002), in order to increase the number of autochthonous microalgal strains with maricultural potential, comparing the batch and semicontinuous culture systems.

## Material and methods

### *Microorganism and culture conditions*

*Chaetoceros muelleri*, Araya strain (LAEP-35), was obtained from the strain bank of the Aquaculture Laboratory of the Oceanographic Institute of Venezuela, Oriente University, where it is maintained at 37‰ in Algal medium (Fábregas *et al.* 1984). It was isolated from the channels supplying water to the artificial lagoons of the Araya saltworks, in the state of Sucre.

The cultures were initiated at a density of  $2.3 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> in 3-L glass bottles, containing 1.5 L of seawater (37‰) filtered through GFC filters (47-mm diameter, 1.2-µm pore size), sterilized by autoclave for 15 min at 121°C (15 psi), and enriched with Algal medium at a concentration of 8 mM NaNO<sub>3</sub> (Fábregas *et al.* 1984). They were maintained at a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , light intensity of  $156 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and photoperiod of 12:12, with constant aeration (200 mL min<sup>-1</sup>).

una concentración de 8 mM NaNO<sub>3</sub> (Fábregas *et al.* 1984). Se mantuvieron a 25 ± 1°C, intensidad luminosa de 156 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con fotoperiodo 12:12 y aireación constante (200 mL min<sup>-1</sup>).

Se emplearon seis botellas, tres para el sistema discontinuo y tres para el sistema semicontinuo, con recambios diarios del 30% del volumen, iniciados a partir de la fase de crecimiento logarítmica y hasta el día 13 del ensayo.

#### *Densidad poblacional y tamaño celular*

La densidad celular se determinó tomando diariamente durante el periodo de ensayo una alícuota de cada una de las botellas conteniendo la suspensión de algas, fijándola con una solución de Lugol al 1%. Los recuentos se realizaron con una cámara Neubauer. Al final del ensayo se determinó la longitud y el ancho de 100 células de cada cultivo, mediante mediciones en microscopio óptico con micrómetro ocular incorporado.

#### *Composición bioquímica*

Cuando se detectó la fase de equilibrio o de estabilización del cultivo semicontinuo y hasta el final del ensayo, se tomaron 5 mL, por triplicado, de ambos sistemas de cultivo y se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm. El precipitado resultante se mantuvo a -20°C para su posterior análisis bioquímico, que incluyó determinaciones de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos grasos.

Las proteínas se determinaron según el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951) modificado por Herbert *et al.* (1971). La extracción de los lípidos se realizó por el procedimiento de Bligh y Dyer (1959) y su determinación espectrofotométrica mediante el método de Marsh y Weinstein (1966). La cuantificación de los carbohidratos totales se realizó por el método fenol sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). Los estándares utilizados fueron albúmina bovina, tripalmitina y D-glucosa, para proteínas, lípidos y carbohidratos totales respectivamente.

La derivatización de los ácidos grasos se realizó según Sato y Murata (1988) y el análisis de los mismos se realizó en un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS) Hewlett Packard Series G1800B, adicionado con una columna Omegawax TM 250 de sílica fundida (Supelco) de 30 m × 0.25 mm de diámetro externo × 0.25 µm de diámetro interno. Los ácidos grasos presentes en las muestras se identificaron mediante la comparación de los espectros de masas con los espectros contenidos en la biblioteca de espectros de masas NIST98, NBS75K y una biblioteca creada con 28 estándares de ácidos grasos metil esterificados (Sigma Chemical Company). Adicionalmente, se confirmó la identificación de los ácidos grasos mediante la comparación de los tiempos de retención de las muestras con los registrados para mezcla comercial de metil-ésteres de ácidos grasos poliinsaturados (Sigma).

#### *Análisis estadísticos*

Para la evaluación del bioensayo se realizó un análisis de varianza de dos factores, considerando los sistemas de cultivos

Six bottles were used, three for the batch cultures and three for the semicontinuous cultures, with a daily renewal rate of 30% from the logarithmic growth phase to day 13 of the experiment.

#### *Population density and cell size*

Cell density was determined by taking a daily sample of one aliquot from each bottle containing the algal suspension and fixing it with Lugol's solution (1%). Cell counts were done using a Neubauer camera. At the end of the experiment, the length and width of 100 cells from each treatment were measured under an optical microscope fitted with an ocular micrometer.

#### *Biochemical composition*

On detecting the equilibrium or steady-state phase of the semicontinuous culture and until the end of the experiment, 5 mL (in triplicate) were taken from both culture systems and centrifuged for 15 min at 5000 rpm. The precipitate obtained was maintained at -20°C for the biochemical analysis, which included the determination of proteins, lipids, carbohydrates and fatty acids.

Proteins were determined by Lowry's method (Lowry *et al.* 1951), modified by Herbert *et al.* (1971). Lipid extraction was done according to Bligh and Dyer (1959) and determined spectrophotometrically following Marsh and Weinstein (1966). Total carbohydrates were quantified by the phenol-sulphuric method (Dubois *et al.* 1956). Bovine albumin, tripalmitin and D-glucose were used as standards for proteins, lipids and total carbohydrates, respectively.

The derivatization of fatty acids was done according to Sato and Murata (1988) and they were analyzed using a Hewlett-Packard (series G1800B) gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) equipped with an Omegawax TM 250 fused-silica column (Supelco) of 30 m × 0.25 mm external diameter × 0.25 µm internal diameter. The fatty acids found in the samples were identified by comparing the mass spectra with those contained in the NIST98, NBS75K mass spectral library and in a database created with 28 fatty acid methyl ester standards (Sigma Chemical Company). Additionally, the identification of the fatty acids was confirmed by comparing the retention time of the samples with those registered for a commercial mixture of polyunsaturated fatty acid methyl esters (Sigma).

#### *Statistical analysis*

To evaluate the bioassay, a two-factor analysis of variance was applied, considering the culture systems and the different sampling days as factors, following the recommendations of Sokal and Rohlf (1995).

y los diferentes días de muestreo como factores, siguiendo las recomendaciones de Sokal y Rohlf (1995).

## Resultados

### Densidad poblacional y tamaño celular

Las mayores densidades celulares de la microalga *C. muelleri* cepa Araya (LAEP-35) se registraron en el sistema discontinuo (fig. 1), alcanzando cifras de  $3.5 \pm 0.1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> al final del ensayo (día 13). La densidad celular se incrementó paulatinamente con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) hasta el día 11 y 12, para luego entrar en fase estacionaria. Los cultivos en el sistema semicontinuo alcanzaron su densidad celular máxima al sexto día ( $2.4 \pm 0.1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>), a partir del cual la densidad disminuyó como producto de las diluciones, para luego incrementarse ligeramente y mantenerse con poca fluctuación (entre  $1.8$  y  $2.2 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) y sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) durante los días 10–13, lo cual indica la fase de equilibrio o estabilización.

El tamaño celular de la microalga no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los dos sistemas de cultivo, observándose un ancho y un largo medios de  $5.3 \pm 1.2$  µm y  $7.5 \pm 0.3$  µm, respectivamente.

### Composición bioquímica

#### Proteínas

Las proteínas celulares disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) en los cultivos discontinuos desde  $21.1 \pm 2$  pg cél<sup>-1</sup> (día 10) hasta  $3.5 \pm 0.2$  pg cél<sup>-1</sup> (día 13). En el sistema semicontinuo, las concentraciones de estas macromoléculas se mantuvieron entre  $21 \pm 2$  y  $23 \pm 2$  pg cél<sup>-1</sup>, sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) durante los días de muestreo (tabla 1).

#### Lípidos

Los niveles de lípidos se incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ) en los cultivos discontinuos desde  $8.5 \pm 0.9$  pg cél<sup>-1</sup> (día 10) hasta  $12 \pm 3$  pg cél<sup>-1</sup> (día 13). En los cultivos semicontinuos, las concentraciones de lípidos fueron mayores que en los discontinuos y mostraron diferencias no significativas ( $P > 0.05$ ) en todos los muestreos, alcanzando concentraciones medias de  $18 \pm 4$  pg cél<sup>-1</sup> (tabla 1).

#### Carbohidratos

Los niveles de carbohidratos en los cultivos discontinuos variaron significativamente ( $P < 0.05$ ) en los diferentes días de muestreo, mostrando una tendencia a la disminución a medida que el cultivo se desarrollaba, con concentraciones desde  $18 \pm 1$  pg cél<sup>-1</sup> (día 10) hasta  $4.2 \pm 0.2$  pg cél<sup>-1</sup> (día 13). Por el contrario, en los cultivos semicontinuos estas macromoléculas mostraron bajas concentraciones ( $4.2 \pm 0.2$  pg cél<sup>-1</sup>) y sin

## Results

### Population density and cell size

The highest cell densities of the microalga *C. muelleri* (Araya strain LAEP-35) were recorded in the batch culture system (fig. 1), reaching  $3.5 \pm 0.1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> at the end of the experiment (day 13). The cell density increased gradually, with significant differences ( $P < 0.05$ ) until days 11 and 12, and then entered the stationary phase. The cultures of the semi-continuous system attained maximum cell density on day 6 ( $2.4 \pm 0.1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>), after which the density decreased as a result of the dilutions and then increased slightly, showing little fluctuation (between  $1.8$  and  $2.2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>) and no significant differences ( $P > 0.05$ ) from days 10 to 13, which indicates the steady-state phase.

The cell size of *C. muelleri* did not show significant differences ( $P > 0.05$ ) between the two culture systems. The mean width and length were  $5.3 \pm 1.2$  and  $7.5 \pm 0.3$  µm, respectively.

### Biochemical composition

#### Proteins

The cellular proteins decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in the batch cultures, from  $21.1 \pm 2$  pg cells<sup>-1</sup> (day 10) to  $3.5 \pm 0.2$  pg cells<sup>-1</sup> (day 13). In the semicontinuous cultures, the concentrations of these macromolecules remained between  $21 \pm 2$  and  $23 \pm 2$  pg cells<sup>-1</sup>, showing no significant differences ( $P > 0.05$ ) during the sampling days (table 1).

#### Lipids

In the batch cultures, the concentrations of lipids increased significantly ( $P < 0.05$ ) from  $8.5 \pm 0.9$  pg cells<sup>-1</sup> (day 10) to  $12 \pm 3$  pg cells<sup>-1</sup> (day 13). In the semicontinuous cultures, the

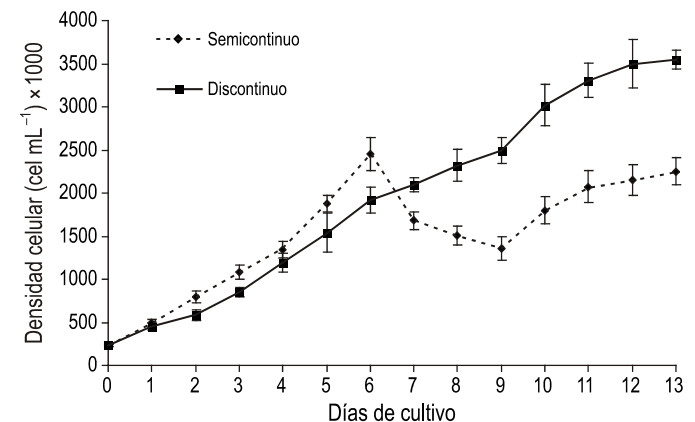


Figura 1. Curva de crecimiento (promedio  $\pm$  DS) de cultivos discontinuos y semicontinuos de *Chaetoceros muelleri*.

Figure 1. Growth curves (mean  $\pm$  SD) for batch and semicontinuous cultures of *Chaetoceros muelleri*.

**Tabla 1.** Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos totales (promedio  $\pm$  DS) de una cepa de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuo y semicontinuo.**Table 1.** Total protein, lipid and carbohydrate content of a strain of *Chaetoceros muelleri* (mean  $\pm$  SD) cultured in batch and semicontinuous systems.

	Días de cultivo			
	10	11	12	13
Proteínas totales (pg cél <sup>-1</sup> )				
Discontinuo	21.1 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	11.7 $\pm$ 2.8 <sup>c</sup>	4.2 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	3.5 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>
Semicontinuo	21.1 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	23.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	21.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	22.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
Lípidos totales (pg cél <sup>-1</sup> )				
Discontinuo	8.5 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	9.0 $\pm$ 4.0 <sup>c</sup>	10.0 $\pm$ 2.0 <sup>d</sup>	12.0 $\pm$ 3.0 <sup>e</sup>
Semicontinuo	19.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	17.0 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	18.0 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	19.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>
Carbohidratos totales (pg cél <sup>-1</sup> )				
Discontinuo	18.0 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	9.0 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>	5.2 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	4.2 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>
Semicontinuo	4.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>

Superíndices iguales en una misma fila indican diferencias no significativas ( $P > 0.05$ ).

diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) durante la fase de estabilización (tabla 1).

### Ácidos grasos

Los resultados de los ácidos grasos corresponden al día 12 del cultivo (cuarto día de la fase de equilibrio del sistema semicontinuo). El contenido total de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados fue superior en los cultivos semicontinuos, obteniéndose proporciones de 47.5% y 34.8%, respectivamente. Los ácidos grasos saturados que presentaron mayores concentraciones, en ambos sistemas de cultivo, fueron el C14:0 (mirístico) y el C16:0 (palmítico), mientras que de los monoinsaturados, el C16:1 n-7 fue el predominante (tabla 2).

El contenido total de los ácidos grasos poliinsaturados fue mayor en el sistema discontinuo (31.4%). Los ácidos grasos poliinsaturados que mostraron una mayor proporción en ambos sistemas de cultivos, fueron el C20:5 n-3, 16:3 n-4 y C20:4 n-6; en el sistema semicontinuo se observaron menores proporciones de los dos primeros ácidos grasos, mientras que el C20:4 n-6 presenta una mayor proporción en este sistema (tabla 2).

### Discusión

Nuestros resultados muestran que *C. muelleri* cepa Araya (LAEP-35) puede mantener una producción diaria de biomasa, con una composición bioquímica estable, durante la fase de equilibrio del régimen semicontinuo. Esta estabilidad de las macromoléculas y de la densidad celular puede deberse a la renovación de nutrientes, lo cual promueve en los cultivos una fisiología similar a la registrada durante la fase exponencial (Otero 1994, Fábregas *et al.* 1995).

La disminución de las proteínas y los carbohidratos, conjuntamente con el incremento de los lípidos en los cultivos

lipid levels were greater than in the former, and showed no significant differences ( $P > 0.05$ ) between treatments, with mean concentrations of  $18 \pm 4$  pg cells<sup>-1</sup> (table 1).

### Carbohydrates

The levels of carbohydrates in the batch cultures varied significantly ( $P < 0.05$ ) during the sampling days and showed a decreasing trend, from  $18 \pm 1$  pg cells<sup>-1</sup> (day 10) to  $4.2 \pm 0.2$  pg cells<sup>-1</sup> (day 13). On the contrary, in the semicontinuous cultures these macromolecules showed low concentrations ( $4.2 \pm 0.2$  pg cells<sup>-1</sup>) and no significant differences ( $P > 0.05$ ) during the steady-state phase (table 1).

### Fatty acids

The fatty acid results correspond to day 12 of the culture (fourth day of the steady-state phase of the semicontinuous system). The total content of saturated and monounsaturated fatty acids was higher in the semicontinuous cultures (47.5% and 34.8%, respectively). The saturated fatty acids that had the highest concentrations in both systems were C14:0 (myristic) and C16:0 (palmitic), while C16:1 n-7 was the predominant monounsaturated fatty acid (table 2).

The total content of polyunsaturated fatty acids was higher in the batch cultures (31.4%), and those with the highest levels in both culture systems were C20:5 n-3, 16:3 n-4 and C20:4 n-6. In the semicontinuous system, lower proportions were found of the first two, but higher of C20:4 n-6 (table 2).

### Discussion

Our results show that the Araya strain of *C. muelleri* (LAEP-35) can maintain a daily production of biomass, with a

**Tabla 2.** Composición de ácidos grasos (como porcentaje de los ácidos grasos totales) de una cepa de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuo y semicontinuo.

**Table 2.** Fatty acid composition (percentage of total fatty acids) of a strain of *Chaetoceros muelleri* cultured in batch and semicontinuous systems.

Ácido graso	Sistema discontinuo	Sistema semicontinuo
14:0	16.6 ± 1.0	19.0 ± 3.0
15:0	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1
16:0	18.7 ± 0.9	22.0 ± 3.0
17:0	0.1 ± 0.004	0.2 ± 0.01
18:0	2.8 ± 0.05	4.7 ± 0.4
20:0	0.1 ± 0.003	0.2 ± 0.02
22:0	0.36 ± 0.036	0.15 ± 0.011
<b>Σ Saturados</b>	<b>39.66</b>	<b>47.50</b>
16:1 n-7	27.0 ± 2.0	25.0 ± 2.0
16:1 n-5	0.6 ± 0.05	0.3 ± 0.01
18:1 n-9	0.2 ± 0.02	4.0 ± 0.3
18:1 n-7	1.1 ± 0.1	5.5 ± 0.4
<b>Σ Monoinsaturados</b>	<b>28.90</b>	<b>34.80</b>
16:2 n-7	3.0 ± 0.3	0.69 ± 0.04
16:2 n-4	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1
16:3 n-4	5.9 ± 0.4	2.5 ± 0.2
18:2 n-6	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
18:3 n-3	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01
20:4 n-6 (ARA)	3.5 ± 0.3	4.8 ± 0.5
20:5 n-3 (EPA)	16.0 ± 2.0	7.0 ± 1.0
<b>Σ Poliinsaturados</b>	<b>31.40</b>	<b>17.70</b>

discontinuos pareciera indicar el agotamiento de los nutrientes, principalmente nitrato, que tiene lugar a medida que el cultivo envejece (Brown *et al.* 1993). Diversos trabajos han reportado que la deficiencia de nitrógeno, necesario para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, conduce a una desviación del carbono fotoasimilado hacia la biosíntesis de productos de reserva, preferentemente lípidos (Myers 1980). Por el contrario, estas macromoléculas mostraron, en la fase de equilibrio de los cultivos semicontinuos, concentraciones similares a lo largo del periodo de muestreo, manteniendo el orden de concentración: proteínas > lípidos > carbohidratos. Lo anterior puede deberse al suministro diario de medio de cultivo fresco cargado de nutrientes, tal como lo indica Otero (1994) para cultivos semicontinuos de *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella autotrophica*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Phaeodactylum tricorutum*. Por otra parte, el crecimiento activo de *Chaetoceros muelleri* cepa Araya con una composición bioquímica estable en el régimen semicontinuo puede deberse a la tasa de dilución empleada (30%), tal como ha sido

stable biochemical composition, during the steady-state phase of the semicontinuous method. This stability of the macromolecules and of the cell density could be due to the renewal of nutrients, which promotes a similar physiology in the cultures as that found during the exponential phase (Otero 1994, Fábregas *et al.* 1995).

The decrease in proteins and carbohydrates, together with the increase in lipids in the batch cultures seems to indicate the depletion of nutrients, mainly nitrate, that occurs during the course of the culture (Brown *et al.* 1993). Several studies have reported that a lack of nitrogen, necessary for the synthesis of proteins and nucleic acids, results in the diversion of the photo-assimilated carbon to the biosynthesis of reserve products, particularly lipids (Myers 1980). In the steady-state phase of the semicontinuous cultures, however, the concentrations of these macromolecules were similar throughout the sampling period, maintaining the following order of concentration: proteins > lipids > carbohydrates. This may be due to the daily supply of fresh, nutrient-rich culture medium, as has been reported by Otero (1994) for semicontinuous cultures of *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella autotrophica*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* and *Phaeodactylum tricorutum*. On the other hand, the active growth of the Araya strain of *Chaetoceros muelleri* with a stable biochemical composition in the semicontinuous regime could be attributed to the dilution rate employed (30%), as has been indicated by Fábregas *et al.* (1995) for *D. tertiolecta* and by Bermúdez *et al.* (2004) for *Chroomonas* sp.

The semicontinuous method is therefore considered a useful tool for the cultivation of the Araya strain of *Chaetoceros muelleri*, producing a suitable nutritional quality for the normal development of cultured organisms. This supports the results reported by Núñez *et al.* (2002), who fed this microalga to shrimp, *Litopenaeus vannamei*, larvae and obtained a high rate of survival (70%). The use of this strain of *C. muelleri* as a food source for marine bivalve larvae is recommended since it can be easily ingested because of its size ( $5.25 \times 7.55 \mu\text{m}$ ), which is within the range suggested by Doroudi *et al.* (2003), though it is still necessary to determine its digestion and/or assimilation. Moreover, the polyunsaturated fatty acid content shown by this strain assures greater larval survival. Izquierdo (1996) and Koven *et al.* (2001) have indicated that a diet for fish larvae containing the fatty acids C20:4 n-6 and C20:5 n-3 would promote the development of the immune system and thus decrease the pathologies associated with the stress caused by the actual culture activities.

The potential of this microalga in the culture of bivalve larvae and other organisms other than penaeid shrimp should be assessed.

#### Acknowledgements

This study was financed by the research council of Oriente University through project CI-5-1802-1154/03.

English translation by Christine Harris.

señalado por Fábregas *et al.* (1995) para *D. tertiolecta* y Bermúdez *et al.* (2004) para *Chroomonas* sp.

El uso del régimen semicontinuo se convierte así en una herramienta útil para la producción de *Chaetoceros muelleri* cepa Araya con una calidad nutricional adecuada para el desarrollo normal de organismos sometidos a cultivo, lo cual se constató en los resultados obtenidos por Núñez *et al.* (2002) al alimentar con esta microalga larvas del camarón *Litopenaeus vannamei* y obtener una alta tasa de supervivencia (70%). Se sugiere la utilización de esta cepa de *C. muelleri* como alimento de larvas de bivalvos marinos, debido a su fácil ingestión por el tamaño que poseen ( $5.25 \times 7.55 \mu\text{m}$ ), el cual está dentro de los rangos sugeridos por Doroudi *et al.* (2003); no obstante, falta precisar su digestión y/o asimilación. De igual forma, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados que muestra esta cepa aseguraría una mayor supervivencia larvaria, tal y como lo señalan Izquierdo (1996) y Koven *et al.* (2001), quienes indicaron que una dieta para larvas de peces que contenga los ácidos grasos C20:4 n-6 y C20:5 n-3 promovería el desarrollo del sistema inmune, disminuyendo así las patologías relacionadas con el estrés propio de las actividades de cultivo.

Se recomienda evaluar la potencialidad de esta microalga en el cultivo de larvas de bivalvos y otros organismos cultivables diferentes a los peneidos.

## Agradecimientos

La presente investigación fue financiada por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente a través del proyecto CI-5-1802-1154/03.

## Referencias

- Bermúdez J, Rosales N, Loreto C, Briceño B, Morales E. 2004. Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20(2): 179–183.
- Bligh E, Dyer J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- Brown M, Jeffrey S. 1992. Biochemical composition of microlagae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 91–113.
- Brown M, Jeffrey S, Garland C. 1989. Nutritional aspect of microalgae used in mariculture; a literature review. *CSIRO Marine Laboratories Rep.* 205, 44 pp.
- Brown M, Garland C, Jeffrey S, Jameson I, Leroi J. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semicontinuous cultures of *Isochrhysis* sp. (clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.* 5: 285–296.
- Doroudi M, Southgate P, Lucas J. 2003. Variation in clearance and ingestion rates by larvae of the black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) feeding on various microalgae. *Aquacult. Nutr.* 9: 11–16.
- Dubois M, Gillies K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350–356.
- Fábregas J, Abalde J, Herrero C, Cabezas B, Veiga M. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207–245.
- Fábregas J, Patiño M, Arredondo-Vega B, Tobar J, Otero A. 1995. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 287–292.
- Herbert D, Phipps P, Stronce P. 1971. Chemical analyses of microbial cells. In: Norris J, Ribbons D (eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press (5B), pp. 209–344.
- Izquierdo M. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.* 2: 183–191.
- Koven W, Barr Y, Lutzky S, Ben-Atia I, Weiss R, Harel M, Behrens P, Tandler A. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4 n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193: 107–122.
- Lowry O, Rosebrough H, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Biochem.* 193: 265–275.
- Mallo J, Fenucci J. 2004. Alimentación de protozoas del langostino *Pleoticus muelleri* Bate utilizando diferentes microencapsulados y especies de microalgas. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 39(1): 13–19.
- Marsh J, Weinstein D. 1966. Simple charring method for the determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574–576.
- Myers J. 1980. On the algae: Thoughts about physiology and measurements of efficiency. In: Falkowski P (ed.), *Primary Productivity in the Sea*. Plenum Press, New York, pp. 1–16.
- Napolitano G, Ackman R, Ratnayake W. 1990. Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrhysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 21(2): 122–130.
- Núñez M, Lodeiros C, De Donato M, Graziani C. 2002. Evaluation of microalgae diets for *Litopenaeus vannamei* larvae using a simple protocol. *Aquacult. Int.* 10(3): 177–187.
- Otero A. 1994. Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato. Ph.D. Thesis, University of Santiago of Compostela, Spain, 545 pp.
- Sato N, Murata N. 1988. Membrane lipids. *Methods Enzymol.* 167: 251–259.
- Sokal R, Rohlf F. 1995. *Biometry*. 3rd ed. WH Freeman, New York, 887 pp.
- Treece G, Yates M. 1993. *Manual de laboratorio para el cultivo de larvas de camarón peneido*. Texas A&M University, Texas, 83 pp.

*Recibido en septiembre de 2005;  
aceptado en agosto de 2006.*