



Universidad Austral de Chile
Escuela de Acuicultura y Pesquerías

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOLÓGICOS DE LA MICROALGA
ISOCHRYSIS AFF. GALBANA: COMPARACIÓN DE UN FOTOBIOREACTOR
CONTINUO VERSUS UN CULTIVO *BATCH***

**Tesis para Optar al Título de
Ingeniero en Acuicultura**

Profesor Patrocinante:

Dra. Ana Farías M.

Instituto de Acuicultura

MARÍA KAHRINE ESSMANN PRIETO

PUERTO MONTT

2011

Dedicado con todo mi amor ...

a ni familia

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi familia, por su comprensión y apoyo durante el desarrollo de mi tesis, a mi padre que además me enseñó a ser mejor persona y a cómo enfrentar el mundo; y a mi madre y abuelitos que a pesar de la distancia estuvieron siempre pendientes de mí y mi avance.

A la Dra. Ana Farías, por la confianza depositada en mi persona, darme las herramientas del conocimiento y enseñarme que la prolijidad y entereza en el desarrollo de cada tarea permiten un resultado óptimo.

A Pamela y Jessica, quienes además instruirme en el manejo de equipos y técnicas en el laboratorio, fueron un gran apoyo y grandes amigas.

También a todo el personal del hatchery y laboratorio de microbiología, especialmente a Viviana, Lorena y Geraldine, quienes muchas veces me ayudaron y con quienes pase gratos momentos.

A mis amigos, a pesar de que no nos vemos mucho, siempre están cuando se necesitan, Miguel, Gaby, Pedro, Nitza y Juan Eduardo que aunque ya no esté presente, me ha hecho compañía.

A mis profesores José Luís Iriarte, Iker Uriarte y Valentín Guiraldes, porque fueron un gran aporte a los cimientos y desarrollo de esta tesis.

Y finalmente al proyecto “DESARROLLO CIENTÍFICO-TECNOLÓGICO PARA PRODUCCIÓN INTENSIVA DE SEMILLA DE CHORITO (MYTILUS CHILENSIS) MEJORADA GENÉTICAMENTE” INNOVA 07CN13-PPD240, por el apoyo económico.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. EL USO DE LAS MICROALGAS COMO ALIMENTO	3
1.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS	4
1.3. DEFINICIÓN DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO	6
1.3.1. DEFINICIÓN Y VENTAJAS DE UN FOTOBIOREACTOR (FBR) PARA LA PRODUCCIÓN MICROALGAL EN UN HATCHERY.	6
1.4. HIPÓTESIS	9
1.5. OBJETIVOS	9
1.5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. SISTEMAS DE CULTIVO	10
2.1.1. FBR SEMICONTINUO	10
2.1.2. <i>BATCH</i>	10
2.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN AMBOS SISTEMAS DE CULTIVO.	12
2.2.1. OBTENCIÓN DE CONCENTRACIONES MICROALGALES	12
2.2.2. VERIFICACIÓN DE CALIDAD MICROALGAL	12
	IV

2.2.3 TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO μ	12
2.2.4 TIEMPO DE DUPLICACIÓN	13
2.2.5 CONCENTRACIÓN MÁXIMA	13
2.2.6 BIOMASA TOTAL COSECHADA	13
2.2.7 OBTENCIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA PROXIMAL EN FBR Y <i>BATCH</i>	13
2.2.8 LÍPIDOS	14
2.2.9 PROTEÍNAS	14
2.2.10 CARBOHIDRATOS	14
2.2.11 ENERGÍA	15
2.2.12 CENIZA	15
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
3. RESULTADOS	17
3.1. COMPORTAMIENTO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO Y PARÁMETROS DE PRODUCTIVIDAD	17
3.2. COMPOSICIÓN PROXIMAL Y ENERGÉTICA EN LAS DIFERENTES FASES DE AMBOS SISTEMAS DE CULTIVO.	22
4. DISCUSIÓN	26

4.1. COMPORTAMIENTO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO Y PARÁMETROS DE PRODUCTIVIDAD	26
4.2. COMPOSICIÓN PROXIMAL Y ENERGÉTICA EN LAS DIFERENTES FASES DE AMBOS SISTEMAS DE CULTIVO	34
5. CONCLUSIÓN	36
6. REFERENCIAS	38
7. ANEXOS	46

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Fases de crecimiento de un cultivo microalgal cerrado.	4
Fig. 2: <i>I. aff. galbana</i> . Curva de crecimiento en sistema de cultivo semicontinuo FBR.	19
Fig. 3: <i>I. aff. galbana</i> . Curva de crecimiento en sistema de cultivo <i>batch</i> .	20
Fig. 4: <i>I. aff. galbana</i> . Bioquímica proximal: proteína, lípido y carbohidratos en porcentaje del peso seco de la microalga en las fases logarítmicas y estacionarias para cada sistema de cultivo.	23

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>I. aff. galbana</i> . Parámetros de productividad de la microalga cultivada en FBR y <i>Batch</i> .	21
Tabla 2: <i>I. aff. galbana</i> . Desempeño productivo de la microalga cultivada en FBR y <i>batch</i> .	22
Tabla 3: <i>I. aff. galbana</i> (Clon T-Iso). Composición bioquímica expresada en porcentaje de proteína, lípidos, carbohidratos y cenizas del peso seco de la microalga.	25
Tabla 4: Condiciones de cultivo para <i>I.aff. galbana</i> descritas en literatura.	32
Tabla 5: Continuación tabla 4, condiciones de cultivo y parámetros productivos descritos en literatura.	33

RESUMEN

Es conocido que las microalgas pueden cambiar su composición proximal a lo largo de su curva de crecimiento, lo que afecta la calidad nutricional a la hora de utilizarlas como alimento. En el presente trabajo, un cultivo semicontinuo, en un fotobioreactor tubular elíptico, y un cultivo *batch* de *Isochrysis aff. galbana* se realizaron para la comparación de la composición proximal y el rendimiento productivo de la microalga cultivada en ambos tipos de sistemas. Los experimentos se hicieron en 2 etapas, en la primera se estudió la curva de crecimiento y se evaluaron parámetros. Luego en la segunda etapa se evaluó la composición proximal y energética. Respecto a la curva de crecimiento, se encontró que *I. aff. galbana* podía presentar varias fases de crecimiento exponencial en el sistema semicontinuo al agregar medio de cultivo nuevamente, a diferencia del sistema *batch*, y que además obtuvo una densidad celular y una producción 4,5 veces mayor que el segundo sistema de cultivo. Al evaluar la composición proximal se obtuvo que el porcentaje de proteína en la fase exponencial fue significativamente mayor en la microalga cultivada en el sistema *batch*, sin embargo, en la fase estacionaria disminuyó a menos de un tercio mientras que en el sistema semicontinuo se mantuvo relativamente constante, mientras que los lípidos tendieron a aumentar a partir de la fase exponencial y los carbohidratos no variaron, lo que ocurrió en ambos sistemas de cultivo. Para mejorar la productividad obtenida, se recomienda aumentar la velocidad del flujo del sistema semicontinuo, iniciar los cultivos con la mitad de la luminosidad y aumentar el volumen de cultivo en el FBR para equiparar la producción del sistema de cultivo *batch* en una sola cosecha.

ABSTRACT

It is known that algae can change their chemical composition, along its growth curve, which affects the nutritional quality when used as food. In this paper, a semicontinuous culture in a tubular photobioreactor elliptical and a batch culture of *Isochrysis aff. galbana* were conducted to compare the proximate composition and production performance of the microalgae grown in both types of systems. Experiments were done in 2 stages, first, It was studied the growth curve and parameters were evaluated. Then, in the second stage was assessed the proximate composition and energy. Regarding the growth curve, it was found that *I. aff. galbana* could present various stages of exponential growth in the semicontinuous system by adding culture medium again, unlike the batch system, and also earned a production and a cell density 4,5 times greater than the second culture system. In assessing proximate composition was obtained that the percentage of protein in the exponential phase was significantly higher in the microalgae grown in batch system, however, in the stationary phase decreased to less than one third while in the semicontinuous system remained relatively constant, whereas lipid tended to increase after the exponential phase and carbohydrates did not change, which occurred in both culture systems. To improve the productivity gained, it is recommended to increase the speed flow of the semicontinuous system, start the cultures with half of the light and increase the volume of culture in the FBR to match production in the *batch* culture system in a single harvest.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL USO DE LAS MICROALGAS COMO ALIMENTO

Los principales grupos de consumidores de microalgas son los moluscos filtradores como almejas, ostras, mitílidos y ostiones; el zooplancton que forma parte de algunas de las cadenas alimentarias en la acuicultura (Borowitzka, 1997; Abalde *et al.*, 1995) y larvas, juveniles tempranos de abalones, camarones peneideos y de peces que poseen un tracto digestivo inmaduro al momento de eclosionar (Stottrup & Mcevoy, 2003; Guillaume *et al.*, 2005).

En ciertos casos de larvas de peces y camarones, las microalgas podrían ser totalmente reemplazadas por alimentos micro encapsulados u otros, pero a diferencia de estos animales los moluscos filtradores dependen solo de microalgas, por lo que su desarrollo está muy afectado por la calidad de ésta (Laing & Millican, 1986), y así como por el tamaño de la célula (Yúfera & Iribar, 1990) y la biomasa producida. Persoone y Claus (1980) identificaron como exitosas para el cultivo de moluscos bivalvos las microalgas *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* sp. (T.ISO), *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Pseudoisochrysis paradoxa*, *Chaetoceros calcitrans* y *Skeletonema costatum*.

Sin embargo, el contenido proximal y de micronutrientes de las microalgas dependen de muchos factores tales como la irradiancia (Reboloso Fuentes *et al.*, 2000), tasa específica de crecimiento (Fernández *et al.*, 1998; Otero & Fabregas, 1997), composición del medio de cultivo (Fabregas *et al.*, 1985), pH y la etapa en la que se realiza la cosecha (Brown *et al.*, 1993), cambiando así su valor nutricional por diferentes causas (Enright *et al.*, 1986a y Brown *et al.*, 1997).

1.2. Curva de crecimiento de las microalgas

La fase de latencia, adaptación o *lag* es la primera fase que suele presentarse (figura 1a), donde la tasa de crecimiento exponencial es significativamente menor que en la fase siguiente (exponencial), pudiendo deberse a un periodo de ajuste fisiológico a los cambios en los nutrientes del medio o condiciones de cultivo. También, puede ocurrir si el inóculo posee células no viables, provenientes de la fase estacionaria o cercanas a la senescencia (Lee & Shen, 2004), debido a que la edad fisiológica de la célula afecta su capacidad de multiplicación (Becker, 1994).

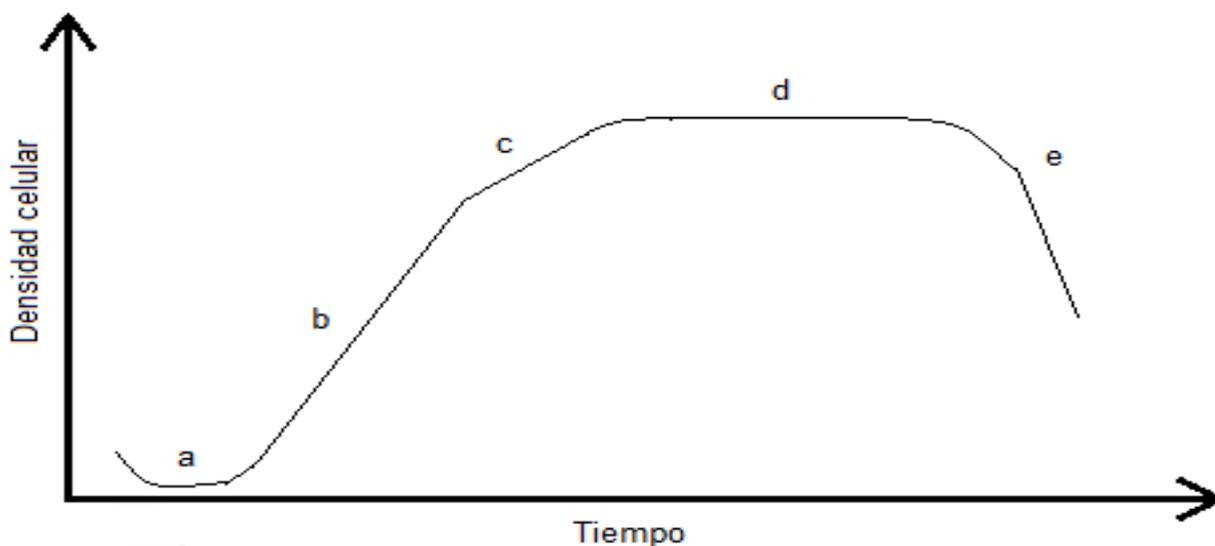


Figura 1: Fases de crecimiento de un cultivo microalgal cerrado. Donde las letras **a**, **b**, **c**, **d** y **e** corresponden a la fase *lag*, crecimiento exponencial, crecimiento lineal, estacionaria y senescencia, respectivamente (tomado de Becker, 1994).

Luego, se inicia una aceleración del crecimiento para entrar a la fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica (figura 1b), ya que las células crecen y se dividen en función exponencial del tiempo, en este periodo ningún nutriente ni la luz son factores limitantes para la multiplicación de las células (Lee & Shen, 2004; Becker, 1994).

Al final de la fase de crecimiento exponencial, las células se han multiplicado de tal manera que comienzan a “hacerse sombra” unas a otras, limitando el acceso a la luz, además la concentración de algún nutriente disminuye pasando a ser un limitante del crecimiento (Lee & Shen, 2004; Becker, 1994), una vez que esto ocurre, la tasa de crecimiento empieza disminuir llegando a la fase de crecimiento lineal o desaceleración (figura 1c) dando paso a una etapa donde se comienzan a acumular desechos tóxicos de la propia célula y sumado a los factores anteriores, el cultivo alcanza su máxima concentración celular, estancándose en crecimiento en la fase estacionaria (Figura1d). Finalmente la viabilidad de las células disminuye y comienzan a morir liberando sustancias inhibitorias del crecimiento al medio, lo que es causado por las condiciones ambientales desfavorables, disminuyendo la concentración celular en forma abrupta, lo que es llamado fase de muerte o senescencia (figura 1e).

Es conocido, que las microalgas pueden variar su composición bioquímica dependiendo de la fase de su ciclo de vida en que se encuentren debido a los grandes cambios fisiológicos a las que están sometidas (Enright *et al.*, 1986a; Brown *et al.*, 1997), por lo que un sistema de cultivo donde se puedan controlar independientemente estas condiciones, sería ideal para modificar la composición proximal de las microalgas, y así satisfacer de mejor manera las necesidades nutricionales de estados larvales, juveniles tempranos y filtradores en general.

1.3. Definición de los sistemas de cultivo

Las microalgas han sido cultivadas en diversas formas, ya sea como un florecimiento de fitoplancton en lagunas artificiales, monocultivos en estanques de cemento, bolsas plásticas o en complejos sistemas automatizados e incluso computarizados, llamados fotobioreactores.

A pesar de esta gran variedad de sistemas de cultivos, estos se pueden clasificar en dos principales grupos, el sistema cerrado o *batch* y el sistema continuo. Un sistema cerrado es aquel que una vez puestos los elementos básicos: el agua, el inoculo microalgal y el abono, estos no se renuevan, siendo finalmente cosechado al alcanzar su concentración máxima o al finalizar su fase exponencial (Vonshak, 2000).

En cambio el sistema continuo implica una constante dilución del medio de cultivo, es decir, se cosecha la microalga, se renueva el medio abonado en forma constante y la periodicidad de dilución puede variar de segundos a días (Vonshak, 2000;(Lee & Shen, 2004).

1.4. Definición y ventajas de un Fotobioreactor (FBR) para la producción microalgal en un Hatchery.

La constante necesidad de producción de microalgas para la alimentación de animales como zooplancton, moluscos filtradores, larvas de crustáceos y algunas larvas de peces, hacen que los costos de producción sean relativamente altos, variando entre el 20 al 50% de los costos de operativos de un hatchery (Coutteau & Sorgeloos, 1992) debido a que, en general, se utilizan sistemas de cultivo *batch*, implicando una gran cantidad de ciclos de sembrado y limpieza. Sin embargo, estos costos de producción

pueden verse disminuidos mediante un sistema de cultivo continuo, reduciéndose los requerimientos de mano de obra y a que se puede mantener por mucho más tiempo un mismo cultivo, disminuyendo así los ciclos de limpieza y sembrado.

Un aumento en la producción y la disminución del volumen utilizado, son las principales ventajas de un sistema de cultivo continuo, siendo el mejor ejemplo un fotobio reactor o FBR. Un FBR se define como un sistema donde se pueden controlar la mayoría factores ambientales como temperatura, luminosidad, pH, salinidad y cantidad de nutrientes, además de evitar fuentes de contaminación y mantener fácilmente monocultivos (Suh & Lee, 2003). Indiscriminadamente, puede manejarse como un sistema de cultivo continuo (o semicontinuo) o cerrado, dependiendo de las necesidades del productor.

Un FBR puede ubicarse en el exterior de las dependencias de un hatchery o en el interior, donde el primero es utilizado para producción de grandes volúmenes, pero aún es afectado por las condiciones climáticas no controladas, a diferencia de aquellos ubicados en el interior de algún recinto, donde se puede controlar todos los factores que afecten el crecimiento o la producción de algún subproducto en particular que se quiera obtener a partir de la microalga.

El término de FBR, ha sido tópicos de varios autores: Lee (1986), Chaumont (1993), Prokop & Erickson (1995), Torzillo (1997), Tredici & Chini Zittelli (1997), Pulz & Scheibenbogen (1998) y Tredici (1999). Estos FBRs constan principalmente de un recipiente de cultivo, el cual puede tener forma rectangular, cilíndrica y/o tubular, donde estos últimos han sido destacados por varios autores (Chaumont *et al.*, 1988; Tredici &

Materassi, 1992; Pulz, 1994; Borowitzka, 1996 y Hu & Richmond., 1996) ya que al parecer tienen ventajas de producción por sobre otros modelos. En específico, un FBR tubular helicoidal diseñado por Biotechna Ltd (the Biocoil™ – Robinson *et al.*, 1988) ha probado ser uno de los más efectivos en términos de productividad en estudios de laboratorio y escala piloto en exteriores en UK y Australia (Chrismadha & Borowitzka, 1994; Borowitzka, 1996; Watanabe & Hall, 1996) y ha sido utilizado para el cultivo de microalgas como *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Chaetoceros*, *Pavlova*, *Nannochloropsis*, *Spirulina*, *Chlorella*, entre otras.

En el presente estudio, se trabajará con *I. aff galbana* (clon T-ISO), la que será cultivada en 2 tipos de FBRs, continuo y cerrado (tipo *batch*), evaluando comparativamente, las concentraciones alcanzadas y analizando su composición proximal y energética.

1.5. HIPÓTESIS:

La producción de la microalga *I. aff. galbana* en un FBR semicontinuo genera mayor biomasa y presenta una composición proximal más estable que la producción de la misma microalga en cultivo cerrado o *batch*, ya que el aporte periódico de medio de cultivo del FBR semicontinuo permiten tener una mayor tasa de crecimiento y evitar la variación de composición proximal que se da en un cultivo *batch*.

1.6. OBJETIVOS:

1.6.1. GENERAL:

Evaluar comparativamente el rendimiento productivo y los parámetros biológicos de un FBR semicontinuo frente a cultivo *batch*.

1.6.2. ESPECÍFICOS:

- i. Determinar y comparar los parámetros productivos de *I. aff galbana* cultivada en sistema *batch* frente a un sistema semicontinuo.
- ii. Evaluar y comparar la composición proximal y energética de *I. aff galbana* cultivada en sistema *batch* frente a un sistema semicontinuo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de esta tesis se llevó a cabo en las dependencias del HIM (Hatchery de Invertebrados Marinos) en la Sede de Puerto Montt de la Universidad Austral de Chile y bajo el apoyo del proyecto “DESARROLLO CIENTÍFICO-TECNOLÓGICO PARA PRODUCCIÓN INTENSIVA DE SEMILLA DE CHORITO (*MYTILUS CHILENSIS*) MEJORADA GENÉTICAMENTE” INNOVA 07CN13-PPD240. La especie *I. aff. galbana* (clon T-ISO) se obtuvo del cepario del HIM.

2.1. SISTEMAS DE CULTIVO

El desarrollo de los experimentos se realizó en 2 sistemas de cultivo:

2.1.1. FBR SEMICONTINUO: Consistió en un sistema de producción intensiva al que se le agregó medio de cultivo en igual proporción al volumen cosechado de forma periódica.

Esto se realizó en un sistema tubular elíptico de 7 l, cuyas características no serán descritas por ser resultado confidencial del proyecto INNOVA 07CN13-PPD240.

2.1.2. BATCH: El segundo sistema correspondió a cilindros de acrílico transparentes e incoloros con una capacidad de 200 l con una llave de cosecha en la parte inferior, donde solamente en el inicio se abonó con nutrientes y fue cosechado una vez que alcanzó la fase exponencial de crecimiento.

Ambos sistemas estuvieron sometidos a temperatura constante de 25°C, fotoperiodo 24 hrs luz y monitoreo diario del pH. La luminosidad máxima a la que se sometieron el

sistema FBR y el *batch* fue de 4.000 y 2500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente, la que fue medida en la superficie más directa y frente a la fuente luminosa de cada sistema.

Los cultivos se iniciaron siempre con un inóculo de $3,5 \cdot 10^4$ células·ml⁻¹ de T-ISO en todos los experimentos y sistemas.

Los experimentos realizados se dividieron en 2 etapas fundamentales,

Primera etapa: donde el FBR funcionó, al igual que el sistema *batch*, como un cultivo cerrado sin cosechas, para comparar la efectividad y rendimiento productivo de ambos sistemas. Para esto se utilizó la siguiente metodología: una vez alcanzada la máxima tasa de crecimiento (μ) por alguno de los cultivos, se les abonó medio Walne a todos de igual forma. Esto se repitió hasta que al menos un cultivo no volviera a crecer.

Segunda etapa: En esta etapa se realizaron cosechas al alcanzar la máxima μ , entendiendo por *cosecha* retirar un determinado volumen del cultivo. Este volumen fue de 4,5 L., lo que correspondió a 1/3 del volumen total del fotobioreactor. El volumen cosechado fue restituido (con agua de mar abonada) en el sistema semicontinuo y no en el cerrado, respetando así su funcionamiento por definición. El procedimiento de cosecha se realizó hasta acabar con el volumen total de cosecha del sistema cerrado o *batch*.

En ambas etapas se verificaron los parámetros productivos que se describen en la sección 2.2.

2.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN AMBOS SISTEMAS DE CULTIVO.

2.2.1. OBTENCIÓN DE CONCENTRACIONES MICROALGALES

Diariamente, se midió a la misma hora la concentración microalgal de ambos sistemas de cultivo mediante la toma de muestras, siguiendo una rutina de desinfección con alcohol y la utilización de material esterilizado para evitar la contaminación de la muestra. El conteo se efectuó en un contador y analizador de partículas *Coulter Z2* para finalmente registrar la concentración diaria en $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.2.2 VERIFICACIÓN DE CALIDAD MICROALGAL

La calidad de los cultivos se observó diariamente utilizando el criterio para definir la calidad microalgal descrito por Uriarte *et al.* (2001).

2.2.3. TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO μ

Para la determinación de la tasa específica de crecimiento (μ) se utilizó la concentración diaria registrada y posteriormente se ajustó una regresión exponencial en la fase de crecimiento exponencial de cada cultivo.

La expresión para calcular la tasa de crecimiento específico fue la siguiente:

$$N = a \cdot e^{(\mu \cdot t)}$$

Donde t es el tiempo en días, a es una constante, μ es la tasa específica de crecimiento y N es la concentración celular en cualquier momento t .

1.1.1. TIEMPO DE DUPLICACIÓN

El tiempo de duplicación se obtuvo una vez conseguida μ mediante la siguiente fórmula:

$$TD = Ln(2) \cdot \mu^{-1}$$

Donde **TD** es el tiempo de duplicación, **Ln(2)** es una constante y μ es la tasa específica de crecimiento.

1.1.2. CONCENTRACIÓN MÁXIMA

Mediante el registro diario de las concentraciones en ambos sistemas de cultivo se estableció la concentración máxima alcanzada antes de iniciar la cosecha.

1.1.3. BIOMASA TOTAL COSECHADA

La biomasa final obtenida por ambos sistemas se obtuvo de la siguiente forma:

$$BTC: Vol_t \cdot [cél \cdot ml^{-1}]_{máx} \cdot 0,03 \cdot 10^{-6}$$

Donde **BTC** es la biomasa total cosechada en miligramos; **vol** es el volumen (ml); $[cél \cdot ml^{-1}]_{máx}$ es la concentración máxima de células por mililitro durante el cultivo y **0,03** es el peso de 1 millón de microalgas (T-ISO) en miligramos.

2.3. OBTENCIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA PROXIMAL EN FBR Y BATCH

Para determinar la composición proximal y energética de las microalgas, se realizaron muestreos en cada fase exponencial y estacionaria de ambos sistemas a partir de la

segunda etapa de los experimentos. Mediante estos muestreo se obtuvo la biomasa microalgal necesaria mediante la centrifugación del suspendido algal a 1500 RPM, por 20 minutos a 4°C, retirando el sobrenadante. En seguida el pellet de microalgas obtenido se reservó a -5°C, para luego ser liofilizado por 48 hrs y vuelto a conservación en frío (-5°C) hasta su posterior procesamiento.

2.3.1. LÍPIDOS

Los lípidos totales de la células microalgales fueron extraídos por el método de Folch *et. al.* (1957) y evaluados gravimétricamente.

2.3.2. PROTEÍNAS

Las proteínas totales fueron determinadas por analizador elemental de marca Leco, CHN 900, convirtiendo en nitrógeno la proteína (N· 6,25) (Kjeldahl).

2.3.3. CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos solubles fueron cuantificados por el método de Dubois *et. al.* (1956), modificado por Hellebust & Craige (1978).

2.3.4. ENERGÍA

La energía de la microalga T-ISO en ambos sistemas será determinada por calorimetría indirecta, es decir la adición de las cantidades de energía bruta aportada por cada uno de los componentes orgánicos (Guillaume *et al.*, 2004), lo cual se consiguió de la siguiente forma:

$$\mathcal{E}_{total} : \mathcal{E}_{protéica} (\mathbf{g. proteína \cdot 23,7 \text{ kJ g}^{-1}}) + \mathcal{E}_{lipídica} (\mathbf{g. lípidos \cdot 39,5 \text{ kJ g}^{-1}}) + \mathcal{E}_{glucídica} (\mathbf{g. glúcidos \cdot 17,2 \text{ kJ g}^{-1}})$$

2.3.5. CENIZA

Para la obtención de la materia inorgánica o ceniza de las microalgas, se filtraron 5 ml de suspensión algal de concentración conocida, las que fueron calcinadas en mufla 500°C por 5 horas, enfriadas en desecador y finalmente pesadas en la Ultra micro balanza Mettler Toledo XP2U.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los parámetros productivos μ , **TD**, **BTC** y concentración máxima al igual que los índices de composición proximal se les realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el software STATISTICA 8.0 y para el diseño de los gráficos SigmaPlot 11.0

3. RESULTADOS

3.1 COMPORTAMIENTO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO Y PARÁMETROS DE PRODUCTIVIDAD

La fase *Lag* se observó solo en un 80% de los cultivos en fotobioreactor y en ningún cultivo realizado en los sistemas *batch* (ver Anexo 4).

La fase exponencial para ambos sistemas de cultivo tuvo una duración promedio de $3,9 \pm 0,6$ días, la cual se dio en forma repetida en los cultivos semicontinuos (FBR) presentando en promedio 3 fases de crecimiento exponencial, mientras que el cultivo *batch* solo 1 para todas sus réplicas. La tasa de crecimiento exponencial μ y el tiempo de duplicación o generación TD obtenidos en este periodo no presentaron diferencias entre ambos sistemas de cultivo ($p = 0,5582$ y $0,6242$ respectivamente) (tabla 1).

En la fase exponencial del sistema FBR se pudo observar en diferentes intensidades el decantamiento de las células, formando capas heterogéneas en la manguera de cultivo (Anexo 3, a).

La fase estacionaria se alcanzó con un máximo de $4,09 \cdot 10^6 \pm 0,75 \cdot 10^6$ cél·ml⁻¹ para el cultivo *batch* mientras que la máxima concentración celular alcanzada por el FBR fue 4,4 veces mayor que ésta (tabla 1). Luego, no se observó diferencia en el número de días que tardaron ambos tipos sistemas en alcanzar su máxima concentración ($p = 0,1039$). Se pudo observar que la duración de la fase estacionaria se mantuvo de 4 a 25 días en el cultivo *batch* y en el FBR fue de 1 a 3 días (figura 3, 4 y Anexo 4).

La BTC (biomasa total cosechada) del FBR fue de $7,37 \pm 1,46$ g en 13,5 L de cultivo, mientras que el sistema *batch* produjo $19,4 \pm 2,51$ g en 167 L del volumen cultivado. En cuanto a la eficiencia, esta fue mayor en el sistema FBR, que presentó $546,0 \pm 108,2$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ó bien $0,56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ($H(1, N=9) = 6,0$ $P=0,0143$) y ($H(1, N=9) = 6,0$ $P=0,0143$), siendo estas producciones alrededor de 4,4 veces más que lo obtenido en el sistema de cultivo *batch* (tabla 2).

En todos los experimentos realizados, en el FBR solo fue posible una cosecha, luego de la cual los cultivos alcanzaban una concentración menor a la que fueron cosechados y decaían rápidamente hasta su muerte (figura 3).

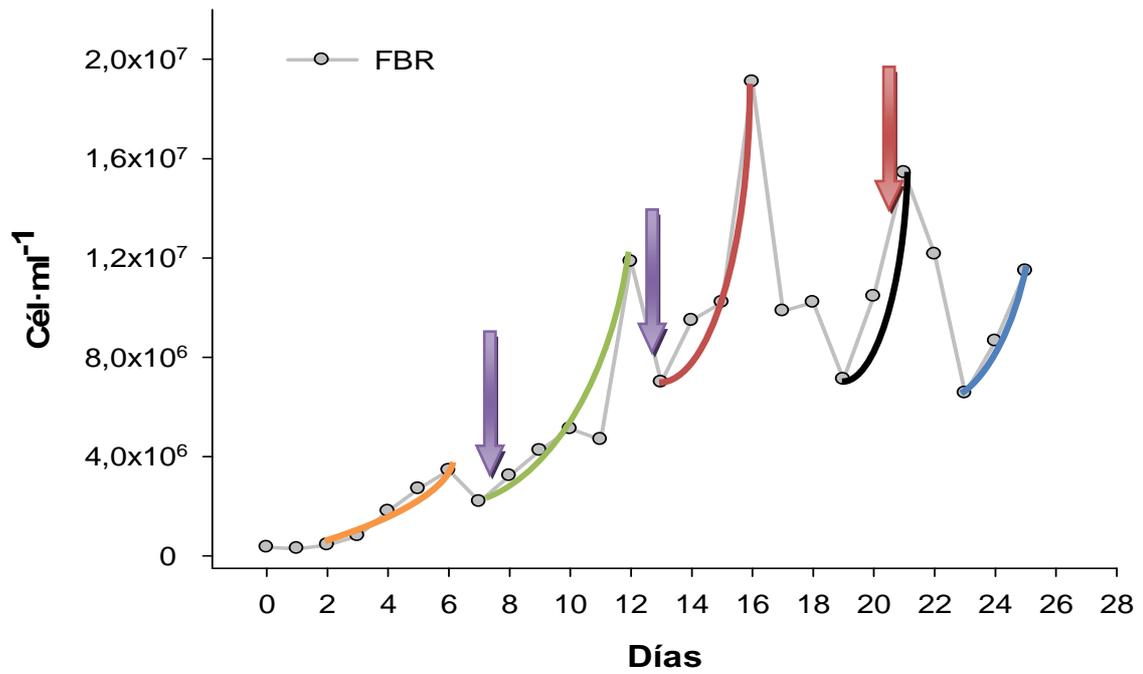


Figura 2: *I. aff. galbana*, sistema de cultivo semicontinuo FBR. Líneas de color naranja, verde, rojo, negra y celeste remarcan las diferentes fases exponenciales presentes a lo largo del cultivo. Flechas moradas representan el abono a los cultivos en los días 7 y 13, y la flecha roja indica proceso de cosecha.

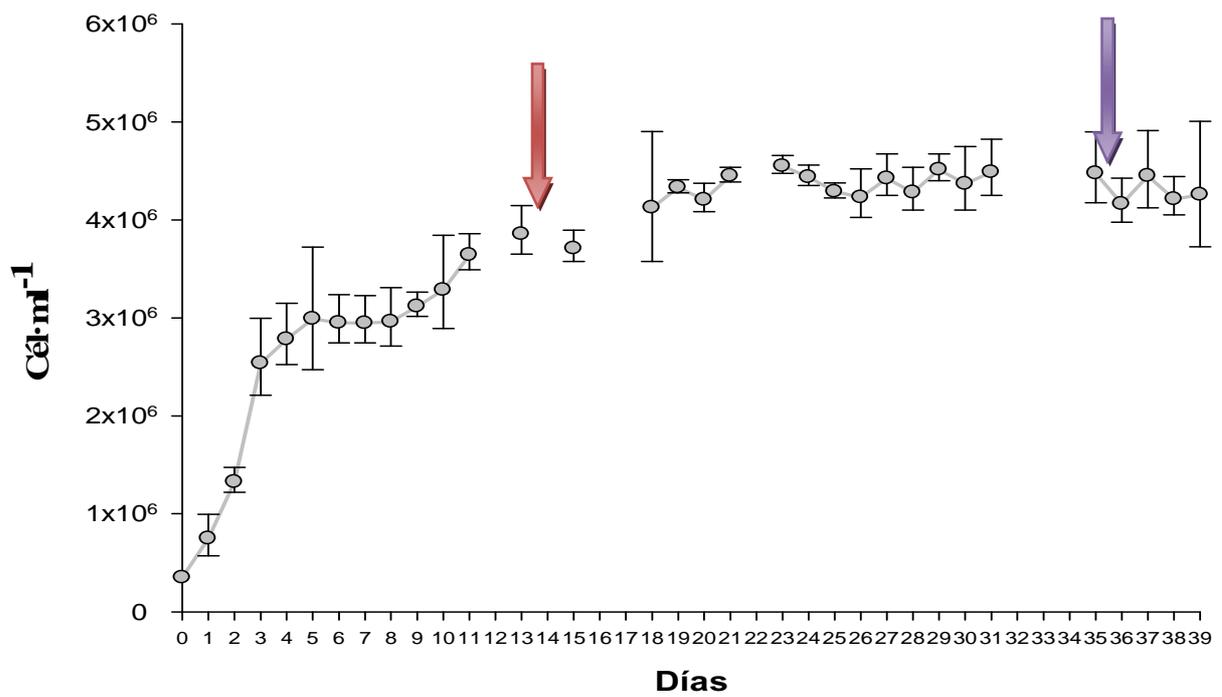


Figura 3: *I. aff. galbana*, sistema de cultivo *batch*. Flecha roja y morada indican día de muestreo considerado como fase estacionaria temprana y tardía respectivamente.

Tabla 1: *I. aff. galbana*. Parámetros de productividad de la microalga cultivada en FBR y *Batch*. Presentando de izquierda a derecha el volumen total del cultivo (ml), Concentración máxima del cultivo [máx] (cél·ml⁻¹), El número de días en alcanzar la concentración máxima del cultivo, la máxima tasa de crecimiento exponencial μ (día⁻¹), el número de fases log (exponenciales), el porcentaje de correlación de μ , la duración de cada fase logarítmica (días) y el tiempo de duplicación TD (días). Valores promedio \pm error estándar.

Sistema	Vol. Cultivo (ml)	[máx] ($\cdot 10^6$ cél·ml ⁻¹)	Nº días para [máx]	μ (día ⁻¹)	Nº de fases log	Correlación (%)	Duración fase log (días)	TD (Días)
FBR	13.500	18,2 \pm 1,61 ^a	11,80 \pm 1,11 ^a	0,79 \pm 0,10 ^a	3,00 \pm 0,55	93,1 \pm 2,69	3,8 \pm 0,37 ^a	1,00 \pm 0,11 ^a
Batch	167.000	4,09 \pm 0,37 ^b	9,00 \pm 0,91 ^a	0,64 \pm 0,01 ^a	1,00 \pm 0,00	97,4 \pm 0,75	4 \pm 0,00 ^a	1,04 \pm 0,02 ^a

Diferentes superíndices indican diferencias significativas en los resultados ($p \leq 0,05$) Kruskal-Wallis (Anexo 2).

Tabla 2: *I. aff. galbana*. Desempeño productivo de la microalga cultivada en FBR y *batch*. Presentando de izquierda a derecha el volumen total del cultivo (ml), biomasa total cosechada (BTC) (g) y la eficiencia en base al peso seco producción por mililitro ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y producción por litro ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Valores promedio \pm error estándar.

Sistema	Vol. Cultivo (ml)	BTC (g)	Eficiencia	
			Producción por ml ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Producción por L ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
FBR	13.500	7,37 \pm 1,46 ^b	546,0 \pm 108,2 ^a	0,55 \pm 0,11 ^a
Batch	167.000	19,40 \pm 2,51 ^a	122,9 \pm 22,4 ^b	0,12 \pm 0,02 ^b

Diferentes superíndices indican diferencias significativas en los resultados ($p \leq 0,05$) Kruskal-Wallis (Anexo 1).

3.2 Composición proximal y energética en las diferentes fases de ambos sistemas de cultivo.

En la primera fase exponencial (tabla 3a) de ambos sistemas se encontró que no hubo diferencias en cuanto a la composición de lípidos y carbohidratos. Donde sí existieron diferencias, fue en el porcentaje de proteína ($H(1, N=9) = 5,4 P=0,0201$) y en el índice proteína/energía ($H(1, N=9) = 5,4 P = 0,0201$), donde en ambos casos fue mayor en la microalga producida en el *batch*. En la energía total no se pudo realizar análisis estadístico por falta de réplicas.

En la fase estacionaria de la curva de crecimiento (tabla 3b y figura 4), el sistema de cultivo FBR obtuvo mayores porcentajes lípidos ($H(1, N=11) = 7,0 P=0,0082$) y proteína ($H(1, N=11) = 7,5 P=0,0062$). En la cantidad carbohidratos no se observaron diferencias

para la microalga cultivada en ambos sistemas. En cuanto a la energía total de las células, ésta fue similar para el *batch* y FBR, pero el índice proteína/energía del cultivo *batch* fue superado en 1,8 veces por los del fotobioreactor ($H(1, N=11) = 7,5$ $P=0,0062$).

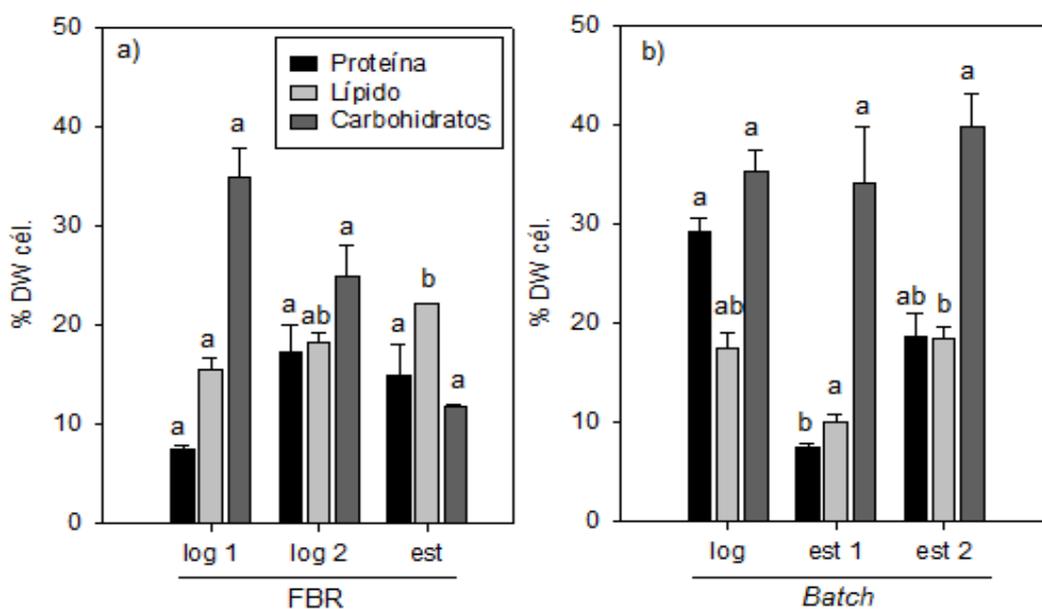


Figura 4: *I. aff. galbana*. Bioquímica proximal: proteína, lípido y carbohidratos en porcentaje del peso seco de la microalga en: a) Sistema de cultivo FBR, la primera y siguientes fases logarítmicas y estacionaria (log 1, log 2 y est respectivamente); b) Sistema de cultivo *batch*, fase logarítmica y estacionarias temprana y tardía (log, est 1 y est 2 respectivamente). Diferentes letras indican diferencias significativas en los resultados ($p \leq 0,05$).

Por otro lado en la fase estacionaria del *batch*, temprana y tardía (Tabla 3c y figura 4), los porcentajes de lípidos ($H(1, N=13) = 9,0$ $P=0,0027$) y proteína ($H(1, N=11) = 7,5$ $P=0,0062$) fueron superiores en la fase estacionaria tardía al igual que el índice

proteína/energía ($H(1, N=11) = 7,5 P=0,0062$). Los carbohidratos tuvieron en promedio $37,9 \pm 6,8$ % del peso seco de las células y la energía $13,2 \pm 2,9 \text{ Kj}\cdot\text{g}^{-1}$ sin diferencias entre ambas etapas.

Respecto a las fases exponenciales del FBR, se observaron similares porcentajes de lípidos, carbohidratos e índice proteína/energía (ver anexo 1) aunque las proteínas aumentaron para las siguientes fases exponenciales ($H(1, N=15) = 4,1 P=0,0433$). Referente a la energía, no se realizó análisis estadístico debido a la falta de réplicas.

Para el sistema FBR, la comparación entre fases de cultivo arrojó que

El análisis de ceniza solo se realizó en fase exponencial del FBR y en fase estacionaria del sistema de cultivo *batch*, donde los valores obtenidos fueron $16,4 \pm 5,7$ y $19,1 \pm 4,1$ % del peso seco de la microalga, no siendo esto suficiente para realizar análisis estadístico.

Tabla 3: *I. aff. galbana* (Clon T-Iso). Composición bioquímica expresada en porcentaje de proteína, lípidos, carbohidratos y cenizas del peso seco de la microalga, energía E° (Kj·g⁻¹) e índice proteína/energía (mgProteína·Kj⁻¹) en: **a)** Primera fase exponencial de los sistemas FBR y *batch*; **b)** Primera fase estacionaria de los sistemas FBR y *batch*; **c)** Fases estacionarias temprana y tardía del sistema de cultivo *batch* (muestras tomadas según figura 4) y **d)** Primera y siguientes fases exponenciales del sistema de cultivo FBR. Valores promedio ± error estándar.

a)

sistema	% Proteína	% lípidos	% Carbohidratos	% Ceniza	E (Kj·g ⁻¹)	E/P (mgProteína·Kj ⁻¹)
FBR	7,5 ± 0,5 ^b	15,5 ± 1,1 ^a	37,3 ± 2,3 ^a	16,4 ± 5,7	7,6*	8,7 ± 0,7 ^a
Batch	29,7 ± 2,1 ^a	19,8 ± 2,9 ^a	33,0 ± 3,3 ^a	-	13,7 ± 0,6	21,3 ± 1,7 ^b

Diferentes letras indican diferencias significativas en los resultados (p ≤ 0,05). *: No existe réplica.

b)

sistema	% Proteína	% lípidos	% Carbohidratos	% Ceniza	E (Kj·g ⁻¹)	E/P (mgProteína·Kj ⁻¹)
FBR	10,7 ± 0,5 ^b	22,3 ± 0,6 ^b	11,9 ± 0,2 ^a	-	13,1 ± 0,6 ^a	8,3 ± 0,5 ^b
Batch	7,4 ± 0,4 ^a	10,0 ± 0,8 ^a	34,0 ± 5,7 ^a	19,1 ± 2,5	14,9 ± 0,7 ^a	4,9 ± 0,4 ^a

Diferentes letras indican diferencias significativas en los resultados (p ≤ 0,05).

c)

Estacionaria	% Proteína	% lípidos	% Carbohidratos	% Ceniza	E (Kj·g ⁻¹)	E/P (mgProteína·Kj ⁻¹)
Temprana	7,4 ± 0,4 ^a	10,0 ± 0,8 ^a	34,0 ± 5,7 ^a	-	14,9 ± 0,7 ^a	4,9 ± 0,4 ^a
Tardía	18,6 ± 2,3 ^b	18,3 ± 1,3 ^b	39,9 ± 1,1 ^a	19,1 ± 2,6	11,6 ± 2,7 ^a	16,0 ± 0,7 ^b

Diferentes letras indican diferencias significativas en los resultados (p ≤ 0,05).

d)

Exponenciales	% Proteína	% lípidos	% Carbohidratos	% Ceniza	E (Kj·g ⁻¹)	E/P (mgProteína·Kj ⁻¹)
Primera	7,5 ± 0,5 ^a	15,5 ± 1,1 ^a	34,9 ± 2,3 ^a	-	7,6*	9,9 ± 0,7 ^a
Siguientes	17,2 ± 2,7 ^b	18,2 ± 0,9 ^a	24,8 ± 3,2 ^a	16,4 ± 0,1	14,0 ± 1,8	12,3 ± 1,8 ^a

Diferentes letras indican diferencias significativas en los resultados (p ≤ 0,05). *: No existe réplica.

4. Discusión

4.1. Comportamiento de la curva de crecimiento y parámetros de productividad

La observación de la fase de ajuste o *lag*, (en el tiempo de muestreo establecido) sólo en el sistema semicontinuo y no en el sistema cerrado, pudo deberse al mayor ajuste fisiológico que probablemente las células de este cultivo tuvieron que pasar (Becker, 1994), ya que el FBR presentaba mayor luminosidad, $4.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras que el cultivo *batch* se sometió a $2500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ muy similar a las condiciones de sus inóculos. Bergeijk *et al.*, (2010) declaró que un 25% de sus cultivos en FBR (de exterior) mostraron fase lag, la que explicaron mediante un índice compuesto de la *irradiancia/densidad celular*, cuando el resultado del índice era mayor a 1,5 se producía fase lag o muerte del cultivo, aunque en algunos casos donde el índice fue menor a 1,5 éstos cultivos también colapsaron.

Luego en la fase exponencial, no se hallaron diferencias tanto para la tasa de crecimiento exponencial μ como para el tiempo de duplicación debido a la gran variabilidad de los datos obtenidos del sistema de FBR.

Otros autores, como Zhu *et al.* (1997) consiguieron tasas de crecimiento exponencial ($0,62 \text{ día}^{-1}$), tiempo de duplicación (1,1 días) y número de días en fase exponencial (4) similares a los obtenidos en el cultivo *batch* en condiciones comparables (medio de cultivo Walne y 30°C) aunque en un volumen mucho menor (0,8L). Varas (2000) presentó un μ un tanto menor (entre $0,38$ y $0,55 \text{ día}^{-1}$), aunque la duración de su fase

exponencial fue mayor (de 7 a 10 días). Lo anterior se puede atribuir a una menor temperatura (20°C) disminuyendo su tasa metabólica, tal como lo demuestra Renaud *et al.* (2002). Estos autores experimentaron con la temperatura del cultivo, indicando que al cultivar con temperaturas más altas, los cultivos aumentaban su μ hasta llegar a una temperatura límite para el crecimiento, donde los cultivos de T-ISO disminuían su μ (33°C) y luego el cultivo presentaba un μ negativo hasta su muerte (35°C) por una interrupción en el metabolismo celular (Richmond, 1986).

También se comprobó que la dinámica de crecimiento de un FBR es diferente a la de un cultivo *batch* ya que aún cuando se les adicionó medio de cultivo a ambos sistemas, sólo el FBR volvió a retomar un crecimiento exponencial, ocurriendo esto hasta el segundo abono del medio donde alcanzó su máxima densidad de cultivo $1,82 \cdot 10^7 \pm 0,36 \cdot 10^7$ cél·ml⁻¹. Distinto ocurrió para el cultivo *batch* ya que presentó un crecimiento muy bajo o nulo, interpretado como fase estacionaria, después de que se le abonara con medio de cultivo.

La fase estacionaria fue diferente para ambos sistemas, ya que en el FBR solo se mantuvo un par de días, en cambio el sistema *batch* permaneció hasta 25 días en esta etapa. Varas (2000) y Pino (1999) también observaron una permanencia de la fase estacionaria en sus cultivos *batch* al rededor de 10 hasta 20 días.

Las cosechas realizadas de 4,5 L en el FBR al final de cada etapa exponencial, indican que al ejecutar alrededor de 8 cosechas se igualaría la producción del cultivo *batch* considerando el volumen completo (167 L) y en la máxima densidad celular. Por lo

tanto, si el fotobioreactor tuviera un volumen de 106 L, en una sola cosecha de 1/3 de su volumen, se equipararía la producción total del cultivo *batch*.

Respecto a las cosecha, la BTC fue mayor en el sistema *batch* debido al mayor volumen, sin embargo se debe tener en cuenta las proporciones, el volumen recolectado del FBR correspondió a un 8,1 % del volumen del *batch* y produjo el 38% de su producción, por lo que sería necesario 4,4 cilindros de 167 litros cada uno para igualar la biomasa producida por el FBR.

La productividad alcanzada en sistema semicontinuo, aunque es bastante mayor que la obtenida en el cultivo *batch*, fue menor a las logradas en sistemas de producción continua (o semicontinua) de autores como Molina-Grima *et al.* (1994) y Berjeijk *et al.* (2010) para *I. aff. galbana*, los cuales están descritos en la tabla en las tablas 4 y 5, no obstante Bougaran *et al.* (2003) presentó una producción 3 veces menor que la del presente trabajo. Este último, indica que la densidad celular de sus experimentos son aquellas presentadas normalmente en producción de *I. aff. galbana* en hatcheries de pequeño a mediano tamaño. Aún así la variabilidad de respuestas productivas, sean estas densidades celulares, tasa específica de crecimiento o productividad, es muy amplia incluso en condiciones similares (ver tabla 4 y 5).

Esta diferencia en la producción puede deberse a la falta de homogeneización en el FBR, evidenciado por la estratificación formada en la manguera de cultivo, ya que la velocidad del flujo al interior de la manguera no superó los $1,6 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo esta muy baja para la densidad celular alcanzada. Richmond (2004a) indica que en cultivos de altas concentraciones celulares y una velocidad de flujo muy bajo ocurre decantamiento

de las células. En trabajos donde utilizan bombas de desplazamiento positivo (como medio de homogenización) indicaron velocidades de $44 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ y $30 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (Berjeijk *et al.* 2010 y Molina-Grima *et al.*, 1994) y con *airlift* $14 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, sin indicar problemas de estratificación, superando ampliamente en ambos casos la velocidad de flujo empleada en el presente trabajo, por lo que no es extraña la precipitación de las células microalgales.

Durante los tres cultivos realizados para la segunda etapa de los experimentos solo se logró una cosecha por cada uno, luego de esto los cultivos no lograban recuperarse en su totalidad y caían.

Una de las razones del colapso de los cultivos pudiese ser la acumulación de inhibidores del crecimiento secretados por las mismas células. Este efecto se ha reportado en cultivos que alcanzan altas y ultra-altas densidades celulares (Richmond *et al.*, 2003). El inhibidor del crecimiento para *I. galbana* fue identificado como ácido 1-[hydroxil-dietil malonato]-isopropil dodecenoico ($\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_7$) por el equipo de trabajo de Yingying *et al.* (2008), el cual además de tener un efecto inhibidor del crecimiento, disminuye la producción de clorofila y proteína de manera progresiva al aumentar su concentración en el medio de cultivo para otras microalgas como *Dunaliella salina*, *Platymonas elliptica*, *Chlorella vulgaris*, *Nitzschia closterium*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros gracilis*, *Nitzschia closterium minutissima*, y *Phaeodactylum tricorutum*. Richmond *et al.* (2003) indicó un incremento extraordinario del compuesto inhibidor al final de la fase exponencial de crecimiento, en un cultivo ultra denso, de *Nannochloropsis sp*, el que siguió en aumento con la edad del cultivo hasta su

senescencia. Sin embargo, este punto, en el que incrementa exponencialmente la secreción del compuesto inhibitorio es especie-específico (Richmond, 2004b).

No obstante, otros factores pudieron haber ocasionado el quiebre luego de cada cosecha. La cosecha realizada en cada cultivo, como antes se mencionó fue de un 33% del volumen, lo cual es el doble y el triple del volumen cosechado por otros autores para cultivos semicontinuos (Briassoulis *et al.*, 2010 y Brown *et al.*, 1993) y aún mayor para sistemas continuos. Así en los cultivos, a menor volumen cosechado, disminuye el *shock* del cambio de las condiciones en que se encontraban, como temperatura del cultivo, pH y la luminosidad a la que estaban adaptadas las células (menor exposición a la luz debido al efecto sombra).

A pesar de que el sistema de cultivo FBR contemplaba las características físicas y de iluminación requeridas para obtener densidades celulares ultra-altas UHCD (*ultra-high cell density*) (Richmond, 2004a): un camino luminoso angosto (1 a 2 cm) y una fuerte iluminación mayor a $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la producción no superó los $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo una UHCD definida arbitrariamente por sobre los $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Hu *et al.*, 1996).

Las otras 2 características requeridas para concretar un cultivo de UHCD son la remoción frecuente del inhibidor del crecimiento (explicado más arriba) y un flujo turbulento acorde a las características de la microalga en cuestión.

Este último se hace muy relevante antes de influir el factor inhibidor del crecimiento. Richmond (2004a) indica que a partir de cierta concentración celular (especie-específica) la productividad (por ejemplo $\text{gr}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$) disminuye a medida que aumenta la densidad de cultivo, esto debido a que cada célula recorre caminos más largos en

espacios oscuros antes de volver a recibir luz, el llamado efecto sombra, a lo que muchos autores han indicado que un aumento de la agitación o mezclado del cultivo lo contrarresta, aumentando la tasa fotosintética y la productividad (Hu y Richmond, 1996; Grobbelaar, 1994).

Tabla 4: Condiciones de cultivo para *I.aff. galbana*. presentando de Izquierda a derecha el Autor (es), la especie y cepa utilizada, recipiente, volumen y medio de cultivo, Luminosidad aplicada el sistema de cultivo, forma de homogeneizar, utilización de CO₂ y sistema de cultivo empleado.

Autor	Especie	Recipiente cultivo	volumen cultivo (L)	Medio cultivo	luminosidad ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ó lux	forma de homogeneizar	CO ₂	Sistema
Presente trabajo	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	tubular helicoidal	14	Walne	4000	bombeo	no	continuo
		cilindro	167		2500	burbujeo	no	<i>batch</i>
Berjeijk et al., 2010	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	cilindro	50	c/ NaNO ₃	100	burbujeo	si	<i>batch</i>
		serpentín	200		Solar	airlift	*si	continuo
Lin et al., 2007	<i>I. galbana</i> CCMP 1324	botella cultivo celular	1,6	Walne	256	shaker y burbujeo	si	<i>batch</i>
Bougaran et al., 2003	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	cilindro	2,2	walne	110	agitado 120 RPM	*si	continuo
Renaud et al., 2002	<i>Isochrysis sp.</i> T-ISO	botella Erlenmeyer	1,5	F/2	80	burbujeo	*si	<i>batch</i>
Varas, 2000	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	botellón	6	Walne	N	burbujeo	no	continuo
Abu-Rezq et al., 1999	<i>Isochrysis sp.</i>	frasco	0,1	James et al., 1986	4,5-5 10^3 lux	shaker y burbujeo	*si	<i>batch</i>
Fidalgo et al., 1998	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	n	n	Fidalgo et al., 1995	115	burbujeo	no	<i>batch</i>
Zhu et al., 1997	<i>I. galbana</i> TK1	botella	0,8	Walne	200	burbujeo	no	<i>batch</i>
Molina Grima et al., 1994	<i>I. galbana</i> ALII-4	Serpentín horizontal	50	c/ NaNO ₃	Solar	airlift	*si	continuo
Brown et al., 1993	<i>Isochrysis sp</i> T-ISO.	manga	85	f/2	100	burbujeo	si	continuo <i>batch</i>

n: No hay información; *Si: introducción de Co₂ solo para regular pH.

Tabla 5: Continuación tabla 4, presentando de izquierda a derecha el Autor (es), la especie y cepa utilizada, el sistema de cultivo, el inóculo en millones de $\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$, la(s) temperatura(s) de cultivo, la tasa de crecimiento exponencial (día^{-1}), la productividad ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y la máxima densidad celular en millones de células ($\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Autor	Especie	Sistema	Inóculo ($10^6\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$)	T°(°C)	Tasa de crec. exp. (día^{-1})	Produc. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Máx. densidad ($10^6\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Presente trabajo	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	continuo <i>batch</i>	0,35	25	0,64	0,56	18,3
					0,79	0,12	4,1
Berjeijk <i>et al.</i> , 2010	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	<i>batch</i> continuo	5	20 15	0,91	0,75**	25
					0,39	2,58**	86
Lin <i>et al.</i> , 2007	<i>I. galbana</i> CCMP 1324	<i>batch</i>	n	20	1,3	0,45	15,0**
Bougaran <i>et al.</i> , 2003	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	continuo	0,5	27	N	0,14	7a 9
Renaud <i>et al.</i> , 2002	<i>Isochrysis</i> sp. T-ISO	<i>batch</i>	n	25 27 30 33 35	0,81	0,12*	5,78
					0,97	0,12*	4,97
					0,89	0,08*	3,55
					0,68	0,02*	1,5
					-0,04	0,01*	0,55
Varas, 2000	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	continuo	0,5	20	0,34 a 0,52	0,51*	14
Abu-Rezq <i>et al.</i> , 1999	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>batch</i>	n	19-21	0,12	0,12**	4
				24-26	0,16	0,195**	6,5
				29-31	0,13	0,12**	4
Fidalgo <i>et al.</i> , 1998	<i>I. aff. galbana</i> T-ISO	<i>batch</i>	2,5	18	0,78	0,75**	25
Zhu <i>et al.</i> , 1997	<i>I. galbana</i> TK1	<i>batch</i>	6	15	0,34	0,56	18,7**
				30	0,62	0,52	17,3**
Molina Grima <i>et al.</i> , 1994	<i>I. galbana</i> ALII-4	continuo	n	20	0,38	4,15	138,3**
Brown <i>et al.</i> , 1993	<i>Isochrysis</i> sp T-ISO.	continuo	n	22	N	0,14*	4
		<i>batch</i>	n	22	N	0,23*	7

n: No hay información; *: Calculado en base al peso seco de la microalga informado en el trabajo; **: Calculado en base a un peso estándar de $30\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$.

4.2. COMPOSICIÓN PROXIMAL Y ENERGÉTICA EN LAS DIFERENTES FASES DE AMBOS SISTEMAS DE CULTIVO.

Las proteínas encontradas en la fase exponencial del sistema de cultivo FBR no presentan precedentes en la literatura, siendo ésta un bajo porcentaje del peso seco de las células (menos del 10% DW) aumentando levemente en las siguientes fases. Sánchez *et al.* (2000) obtuvo un 12% de proteína para T-iso, sin embargo utilizando un medio de cultivo bajo en la fuente nitrogenada (Guillard, f/2). Lo ocurrido, se puede atribuir a la alta mortalidad en que se incurrió en un comienzo del cultivo (fase lag) aumentando posiblemente la proporción de ceniza y disminuyendo la proteína.

En cambio el sistema de cultivo *batch* presentó casi 30% de proteínas para luego disminuir abruptamente en la fase estacionaria temprana a menos de la mitad y finalmente aumentar levemente en la fase estacionaria tardía. Este último cambio en la proporción de proteínas se podría atribuir a 2 procesos: el aumento del tamaño de la célula con la edad del cultivo (Fidalgo *et al.*, 1998 y Brown *et al.*, 1993); y el cambio de condiciones ambientales (cosechas diarias) facultando el consumo del nitrógeno disponible que no había sido utilizado ya que la luz era el factor limitante, por lo que al cosechar constantemente el cultivo se hizo más permeable a luz permitiendo la mayor síntesis de proteínas.

Zhu, Lee y Chao (1997) presentaron porcentajes de lípidos similares a los obtenidos (18- 24% DW) para el FBR pero mayores que en el sistema *batch* de 10 a 18% (DW) aun que todavía dentro de los valores esperados por otros autores (10 a 28%) (Brown *et*

al., 1993; Molina Grima *et al.*, 1994). Así, lípidos en el FBR tendieron a aumentar como fuente de reserva a diferencia de los carbohidratos, ocurriendo lo opuesto en el cultivo *batch*, no obstante esto último no se logró comprobar por la gran variabilidad de los datos obtenidos.

La manipulación de la composición proximal de las microalgas tiene una gran importancia desde el punto de vista práctico, debido a que varios animales acuáticos pueden mejorar su potencial de crecimiento al manejar la composición relativa entre carbohidratos y proteínas (Farías & Uriarte, 2002; Brown *et al.*, 1993). Ejemplo de ello son las larvas de moluscos bivalvos requiriendo mayor cantidad proporción de proteínas para aumentar su tasa de crecimiento (Webb & Chu, 1983). Es por esto que se requiere mantener una composición proximal abundante en proteínas y esencialmente constante en el tiempo.

Debido a que la fase logarítmica del *batch* donde es rica proteínas es muy corta (4 días), para luego decaer rápidamente en menos de la mitad del porcentaje de proteínas, se tendrían que utilizar varios *batch* de mediano a pequeño tamaño para cosecharlos completamente en este corto periodo, lo que ocuparía demasiado espacio dentro de las instalaciones, tiempo en ciclos de limpieza y sembrado. En cambio el sistema FBR, obtuvo una composición en proteínas menor relativamente constante, lo que es conveniente para mantener una dieta de calidad estándar y a la vez disminuir en gran medida el gasto de recursos requeridos por un *batch*.

5. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos se concluye que la hipótesis de trabajo es aceptada ya que,

1º: el fotobioreactor presenta una mayor biomasa por unidad de volumen, siendo 4,5 veces más productivo que el sistema *batch* y,

2º: las microalgas cultivadas en el FBR presentan una composición proximal más estable que la de un cultivo *batch* lo que permitirá tener alimento de una misma calidad nutricional en el tiempo.

3º: Sin embargo, se deben tener las siguientes consideraciones para el mejoramiento del sistema actual:

- a. Aumentar la velocidad del flujo en el sistema para mejorar la producción y evitar estratificación de células. Esto, se puede lograr utilizando una manguera de material con menor rugosidad, o bien aumentando el caudal del sistema ensanchando el diámetro de la manguera.
- b. Iniciar los cultivos con la mitad de la luz empleada evitando o disminuyendo la fase lag provocada por la fotoinhibición de las células.
- c. Reducir el volumen de cosecha, así se disminuiría el impacto en el cultivo y podría cosecharse diariamente.
- d. Y por último, para equiparar la biomasa producida en un cultivo *batch* del presente trabajo, el FBR debería aumentar su volumen a 106 L, así en una sola

cosecha del 33% de su volumen igualaría la producción completa de un cultivo *batch* de 200 l.

6. REFERENCIAS

ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, P., TORRES, E. & HERRERO, C. 1995. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Universidad de Corruña (ed.), 210 págs.

ALBENTOSA, M; PÉREZ-CAMACHO, A; LABARTA, V.; BEIRAS, R. & FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J. 1993. Nutricional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97:261-269

BARNES, H. & BLACKSTOCK J. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin methods for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 12: 103-118

BECKER, E.W. 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press. 293 págs.

BLING E. G., & DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Cam. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-017

BOROWITZKA, MA. 1996. Closed algal photobioreactors: design considerations for large scale systems. *J. mar. biotechnol.* 4: 185– 191.

BRIASSOULIS, PANAGAKIS, P., CHIONIDIS, M., TZENOS, D., LALOS, A., TSINOS, C., BERBERIDIS, K. & JACOBSEN, A. 2010. An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology* 101: 6768–6777

BROWN, M. R., GARLAND, C. D., JEFFREY, S. W., JAMESON, I. D. & LEROI, J. M. 1993. The gross and amino acid compositions of *batch* and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology* 5: 285-296.

BROWN, M. R., JEFFREY, S. W., VOLKMAN, J. K. & DUNSTAN, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.

BROWN, M. R. 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

CHAUMONT, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *J. Appl. Phycol.*, 5, 593–604.

COUTEAU, P. & SORGELOOS, P., 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*, 11: 467-476.

CHRISMADHA, T. & BOROWITZKA, MA. 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. *J. appl. Phycol.* 6: 67–74.

DUBOIS, M., GILLIES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 250-356

ENRIGHT, C. T., NEWKIRK, G. F., CRAIGIE, J. S. & CASTELL, J. D., 1986a. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. Fed *Chaetoceros calcitrans* Schütt of varied chemical composition *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96: 15–26.

ENRIGHT, C. T. NEWKIRK, G. F.; CRAIGIE, J. S. & CASTELL J.D. 1986b. Evaluation of phytoplankton as diets for juveniles of *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*96: 1-13

FABREGAS, J., HERRERO, C., CABEZAS, B. & ABALDE, J. 1986. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalgae *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture* 53: 101–113.

FARÍAS, A. & URIARTE. I. 2002. Nutrición en larvicultura de pectínidos: Relevancia de proteínas y lípidos. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.*

GUILLAUME, J., KAUSHIK, S., BERGOT, P. & MÉTAILLER. R. 2004. Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Publicado por Mundi-Prensa Libros. 475 págs.

GROBBELAAR, J.U. 1994. Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark fluctuations. *J. Appl. Phycol.*, 6: 331–335.

HELLEBUST, J. A. & CRAIGE, J. S. 1978. Handbook of physiological methods. Physiological and biochemical methods. Cambridge. U.P., 512 pp.

HU, Q. & RICHMOND, A. 1996. Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, cell density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. *J. Appl. Phycol.*, 8: 139-45.

HU, Q., GUTERMAN, H. & RICHMOND, A. 1996. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities. *J. Phycol.*, 32: 1066-73.

LAING, I & MILLACAN, P. F. 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat feed various algal diets. *Aquaculture* 54: 245-262.

LEE, Y.K. 1986. Enclosed bioreactors for the mass cultivation of photosynthetic microorganisms: the future trend. *Trends Biotechnol.* 4, 186–89.

LEE, YUAN-KUN & SHEN, HUI. 2004. Basic culturing techniques. In Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. (Ed. Amos Richmond) Blackwell Publishing Ltd. 40-56 págs.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J. Bio. Chem.* 193: 265-275

MÄRKEL, H. 1980. Modeling of algal production systems. In: Algal Biomass (eds .G. Shelef & C.J. Soeder), Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

MOLINA GRIMA, E., SANCHEZ PEREZ, J.A., GARCIA CAMACHO, F., FERNANDEZ SEVILLA, J.M. & ACIEN, F.G. 1994. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. *Appl. microbiol. Biotechnol.*, 41: 23–27.

PINO, M^a S. 1999. Variación de los parámetros nutricionales de las microalgas de cultivo masivo. Tesis. Esc. de Ingeniería en Acuicultura, Fac. De Ciencias Básicas y humanas, Univ. Nacional Andres Bello. 92 págs.

PROKOP, A. & ERICKSON, L.E. 1995. Photobioreactors. In: Bioreactor System Design (eds J.A. Asenjo & J.C. Merchuk), Marcel Dekker, Inc., New York. 441–77 págs.

PULZ, O. & SCHEIBENBOGEN, K. 1998. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (ed. T. Scheper), pp. 123–52. Springer-Verlag, Berlin.

RENAUD, S. M., THINH, L-V., LAMBRINIDIS, G. & PARRY, D. L. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in *batch* cultures. *Aquaculture* 211:195–214

RICHMOND, A., 1986. Cell response to environmental factors. In: Richmond, A. (Ed.), CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton.69– 106 págs.

RICHMOND, A., ZHANG C.-W. & Y. ZARMI, 2003. Efficient use of strong light for photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell growth inhibition. *Biomolecular Engineering* 20: 229-236.

RICHMOND, A. 2004a. Biological Principles of Mass Cultivation. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed), 125-177 págs.

RICHMOND, A. 2004b. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hidrobiología* 512: 33-37.

ROBINSON, LF., MORRISON, AW. & BAMFORTH, MR. 1988. Improvements relating to biosynthesis. European Patent Number 261872.

SANCHEZ, S., MARTÍNEZ, M^a E. & ESPINOLA, F. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Bioch. Eng. J.* 6: 13-18.

STØTTRUP, J. & MCEVOY, L. 2003. Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Publishing. 318 págs.

STROMGREN, T. & CARY, C. 1984. Growth in length of *Mytilus edulis* L. on different algal diets. *J. Exp. Biol. Ecol.* 76: 23-34

SUH, I. S. & LEE, C. 2003. Photobioreactor Engineering: Design and performance. *Biotech. Bioeng.* 8: 313-321

TORZILLO, G. 1997. Tubular Bioreactors. In: *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology* (ed. A. Vonshak), Taylor & Francis, London. 101–15 págs.

TREDICI, M.R. & CHINI ZITTELLI, G. 1997. Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in flat plate reactors. In: *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology* (ed. A. Vonshak), Taylor & Francis, London. 117–30 págs.

TREDICI, M.R. 1999. Photobioreactors. In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* (ed. M.C. Flickinger & S.W. Drew), J. Wiley & Sons, New York. 395–419 págs.

TREDICI, M. 2004. Production of Microalgae: Photobioreactors. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (Ed), pp: 178-214

URIARTE, I., FARÍAS, A. & CASTILLA, C. 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture Engineering*. 25: 139-147

UTTING, S. D. 1985. Influence in the nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Eng.* 4: 175-190.

VARAS, PÍA. 2000. Cultivos masivos de microalgas para su uso en hatchery. Comparaciones entre cultivo continuo y cultivo cerrado. Práctica profesional. Facultad de ciencias. Univ. Católica de la Santísima Concepción. 70 págs.

WATANABE, Y. & HALL, DO. 1996. Photosynthetic production of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* in a cone shaped helical tubular photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotech.* 44: 693–698.

VONSHAK, A. 2000. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In Handbook of microalgal mass culture. Richmond, Amos editor. Israel. Págs 117-145.

WEBB, KL. & CHU, FE. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In Pruder GD, Langdon CJ, Conklin DE (eds), Proc. of the 2nd int. conf. aquaculture nutrition, World Mariculture Society, Spec. Publ. No. 2, Louisiana State University, Louisiana, 272-291 págs.

YÚFERA, M. & LUBIÁN, L. M. 1990. Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. En: Introduction to applied phycology. Akatsuka, I. (ed.), SPB Academic Publishing bv. The Hague. 209-227 págs.

ZHU, C. J., LEE, Y. K. & CHAO, T. M. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology* 9: 451–457.

Anexo 1: Análisis estadísticos

1. Comparación proximal y energética en las fases de crecimiento a) exponencial, b) estacionaria, c) estacionarias tempranas y tardía y d) exponenciales primera y siguientes entre los sistemas de cultivo FBR y *batch*

a) Fase exponencial:

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; % lípidos			
Independent (grouping) variable: sistema			
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=6) = 8,8571429$ $p = 0,3545$			
	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	102	2	5,00000
Batch	103	4	16,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; % proteína			
Independent (grouping) variable: sistema			
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = 5,400000$ $p = 0,0201$			
	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	102	3	6,00000
Batch	103	6	39,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; %carbohidratos			
Independent (grouping) variable: sistema			
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=7) = 0,000000$ $p = 1,000$			
	Code	Valid	Sum of
FBR	102	2	8,00000
Batch	103	5	20,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; E/P			
Independent (grouping) variable: sistema			
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = 5,400000$ $p = 0,0201$			
	Code	Valid	Sum of
FBR	102	3	6,00000
Batch	103	6	39,00000

b) Fase Estacionaria

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **% lípidos**
 Independent (grouping) variable: sistema
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N=11) = 7,000$ $p = ,0082$

	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	102	4	38,00000
Batch	103	7	28,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **% proteína**
 Independent (grouping) variable: sistema
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N=11) = 7,5000$ $p = ,0062$

	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	102	6	51,00000
Batch	103	5	15,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks;
%carbohidratos Independent (grouping)
 variable: sistema
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N=4) = 2,4000$ $p = ,1213$

	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	102	2	3,00000
Batch	103	2	7,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **E/P**
 Independent (grouping) variable: sistema
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N=11) = 7,5000$ $p = ,0062$

	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	102	6	51,00000
Batch	103	5	15,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **Energía**
 Independent (grouping) variable: sistema
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N=4) = 2,4000$ $p = ,1213$

	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	102	2	3,000000
Batch	103	2	7,000000

c) Fases estacionarias tempranas y tardías de *batch*

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **%lípidos**
 Independent (grouping) variable: Estacionaria
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N=13) = 9,00$ $p = ,0027$

	Code	Valid	Sum of Ranks
1º lineal	101	7	28,00000
2º lineal	102	6	63,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **%proteína**
 Independent (grouping) variable: Estacionaria
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N=11) = 7,50$ $p = ,0062$

	Code	Valid	Sum of Ranks
1º lineal	101	5	15,00000
2º lineal	102	6	51,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks;
%carbohidratos Independent (grouping) variable: Estacionaria
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N= 6) = 1,9281$ $p = ,1649$

	Code	Valid	Sum of Ranks
1° lineal	101	2	4,00000
2° lineal	102	4	17,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **Energía**
 Independent (grouping) variable: Estacionaria
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N= 4) = ,6000$ $p = ,4386$

	Code	Valid	Sum of Ranks
1° estacionaria	103	2	6,000000
2° estacionaria	104	2	4,000000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **E/P**
 Independent (grouping) variable: Estacionaria
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N= 11) = 7,500$ $p = ,0062$

	Code	Valid	Sum of Ranks
1° estacionaria	103	5	15,00000
2° estacionaria	104	6	51,00000

d) Fases exponenciales primera y siguientes en el FBR

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; %Lípidos
 Independent (grouping) variable: fase log
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N= 11) = 2,000$ $p = ,1573$

	Code	Valid	Sum of Ranks
2° log	101	9	60,00000
1° log	102	2	6,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; %Proteína
 Independent (grouping) variable: fase log
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N= 15) = 4,083$ $p = ,0433$

	Code	Valid	Sum of Ranks
2° log	101	12	110,0000
1° log	102	3	10,0000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks;
%carbohidratos Independent (grouping) variable: fase log
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N= 14) = 1,633$ $p = ,2012$

	Code	Valid	Sum of Ranks
2° log	101	12	83,00000
1° log	102	2	22,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; **E/P**
 Independent (grouping) variable: fase log
 Kruskal-Wallis test: $H(1, N= 14) = 0,000$ $p = 1,000$

	Code	Valid	Sum of Ranks
2° log	101	12	90,00000
1° log	102	2	15,00000

2. Comparación proximal y energética entre las fases de crecimiento exponenciales y estacionarias en a) sistema de cultivo FBR, y b) sistema de cultivo *batch*.

a) Fase exponencial y estacionaria en el sistema de cultivo FBR.

Multiple Comparisons p values (2-tailed);
% lípidos
 Independent (grouping) variable: Fase
 Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 15) = 7,4625$ $p = ,0240$

	Fase log1	Fase log2	Fase est
Fase log1		0,757678	0,035463
Fase log2	0,757678		0,097162
Fase est	0,035463	0,097162	

Multiple Comparisons p values (2-tailed);
%proteína
 Independent (grouping) variable: Fase
 Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 21) = 5,484$ $p = ,0644$

	Fase log1	Fase log2	Fase est
Fase log1		0,059371	0,188082
Fase log2	0,059371		1,000000
Fase est	0,188082	1,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed);
%carbohidratos
 Independent (grouping) variable: Fase
 Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 17) = 3,654$ $p = ,1608$

	Fase log1	Fase log2	Fase est
Fase log1		0,977256	0,179801
Fase log2	0,977256		0,405437
Fase est	0,179801	0,405437	

Multiple Comparisons p values (2-tailed);
energía
 Independent (grouping) variable: Fase
 Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 7) = 2,250$ $p = ,3247$

	Fase log1	Fase log2	Fase est
Fase log1		0,441897	0,557630
Fase log2	0,441897		1,000000
Fase est	0,557630	1,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); **E/P**
 Independent (grouping) variable: Fase
 Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 21) = 1,012$ $p = ,6026$

	Fase log1	Fase log2	Fase est
Fase log1		1,000000	1,000000
Fase log2	1,000000		1,000000
Fase est	1,000000	1,000000	

b) Fase exponencial y estacionaria en el sistema de cultivo *batch*.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); %lípidos
Independent (grouping) variable: Fase
Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 17) = 11,92$ $p = ,0026$

	Fase log	Fase est1	Fase est2
Fase log		0,053423	1,000000
Fase est1	0,053423		0,003309
Fase est2	1,000000	0,003309	

Multiple Comparisons p values (2-tailed);
%proteína
Independent (grouping) variable: Fase
Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 17) = 14,23$ $p = ,0008$

	Fase log	Fase est1	Fase est2
Fase log		0,000508	0,118775
Fase est1	0,000508		0,216202
Fase est2	0,118775	0,216202	

Multiple Comparisons p values (2-tailed) ;
%Carbohidratos
Independent (grouping) variable: Fase
Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 11) = 2,318$ $p = ,3138$

	Fase log	Fase est1	Fase est2
Fase log		1,000000	0,532590
Fase est1	1,000000		0,669052
Fase est2	0,532590	0,669052	

Multiple Comparisons p values (2-tailed);
energía
Independent (grouping) variable: Fase
Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 6) = 1,142$ $p = ,5647$

	Fase log	Fase est1	Fase est2
Fase log		1,000000	1,000000
Fase est1	1,000000		0,855148
Fase est2	1,000000	0,855148	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); E/P
Independent (grouping) variable: Fase
Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 17) = 13,7778$ $p = ,0010$

	Fase log	Fase est1	Fase est2
Fase log		0,000631	0,155813
Fase est1	0,000631		0,191562
Fase est2	0,155813	0,191562	

3. Comparación de los parámetros productivos entre los sistemas de cultivo FBR y *batch*

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Máx [cél/ml]
Independent (grouping) variable: Sistema
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = 6,000$ $p = ,0143$

Sistema	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	101	5	35,00000
Batch	102	4	10,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Dias μ
Independent (grouping) variable: Sistema
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = ,3428$ $p = ,5582$

Sistema	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	101	5	23,00000
Batch	102	4	22,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; μ
Independent (grouping) variable: Sistema
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = ,2400$ $p = ,6242$

Sistema	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	101	5	27,00000
Batch	102	4	18,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Dias MG
Independent (grouping) variable: Sistema
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = 2,645$ $p = ,1039$

Sistema	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	101	5	31,50000
Batch	102	4	13,50000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; TD
Independent (grouping) variable: Sistema
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = ,2400$ $p = ,6242$

Sistema	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	101	5	23,00000
Batch	102	4	22,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; μ gDW/ml
Independent (grouping) variable: Sistema
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = 6,000$ $p = ,0143$

Sistema	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	101	5	35,00000
Batch	102	4	10,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; DW/L (gr)
Independent (grouping) variable: Sistema
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = 6,000$ $p = ,0143$

Sistema	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	1	5	35,00000
Batch	2	4	10,00000

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Biomasa total
Independent (grouping) variable: Sistema
Kruskal-Wallis test: $H(1, N=9) = 6,000$ $p = ,0143$

Sistema	Code	Valid	Sum of Ranks
FBR	1	5	15,00000
Batch	2	4	30,00000

Anexo 2: Tabla de datos.

Tabla a: *I. aff. galbana*. Parámetros productivos en ambos sistemas de cultivo (FBR y *batch*) indicando de izquierda a derecha: Sistema de cultivo; la fecha de inoculación; volumen de cultivo; número de días que tardó en alcanzar la máxima concentración celular; la tasa específica de crecimiento, el porcentaje de correlación; el número de días que duró la fase exponencial; el número de fases exponenciales obtenidas; el tiempo de duplicación en días; Las cantidad de células en una cosecha y total en millones de células; y luego en gramos; y finalmente la productividad en: microgramos por mililitro y gramos por litro obtenidos.

Sistema	Fecha	Vol. Cultivo (ml)	[máx] (cél/ml)	Nº días para [máx]	μ (Día-1)	Correl. (%)	Nº días fase exp.	nº de Fases log	TD (Días)	(Millones de células)		(gramos)		DW/vol	
										cosecha	Total	cosecha	Total	$\mu\text{g/ml}$	gr/L
FBR	280111	13.500	14.075.000	10	0,54	87,7	4	2	1,29	63.338	190.013	1,90	5,70	422,3	0,42
FBR	280111	13.500	18.200.000	11	0,82	86,7	4	2	0,85	81.900	245.700	2,46	7,37	546,0	0,55
FBR	220311	13.500	20.287.500	10	0,99	92,8	3	3	0,98	91.294	273.881	2,74	8,22	608,6	0,61
FBR	220311	13.500	23.000.000	12	0,99	99,6	3	3	0,70	103.500	310.500	3,11	9,32	690,0	0,69
FBR	130411	13.500	15.437.500	16	0,59	98,8	5	5	1,18	69.469	208.406	2,08	6,25	463,1	0,46
Promedio			18.200.000	11,80	0,79	93,1	3,80	3,00	1,00	81.900	245.700	2,46	7,37	546,0	0,55
Error estándar			1.613.144	1,11	0,10	2,69	0,37	0,55	0,11	7.259	21.777	0,22	0,65	48,39	0,05
Batch	280111	167.000	3.620.000	8	0,63	96,4	4	1	1,11	16.290	604.540	0,49	18,14	108,6	0,11
Batch	280111	167.000	3.300.000	7	0,63	96,2	4	1	1,09	14.850	551.100	0,45	16,53	99,0	0,10
Batch	220311	167.000	4.675.000	10	0,67	97,8	4	1	1,03	21.038	698.498	0,63	20,95	140,3	0,13
Batch	220311	167.000	4.787.500	11	0,63	99,4	4	1	1,10	21.544	732.742	0,65	21,98	143,6	0,13
Promedio			4.095.625	9,00	0,64	97,4	4	1,00	1,08	18.430	646.720	0,55	19,40	122,8	0,12
Error estándar			373.453	0,91	0,01	0,75	0,00	0,00	0,02	1.680	41.836	0,05	1,26	11,20	0,01

Anexo 3: Figuras

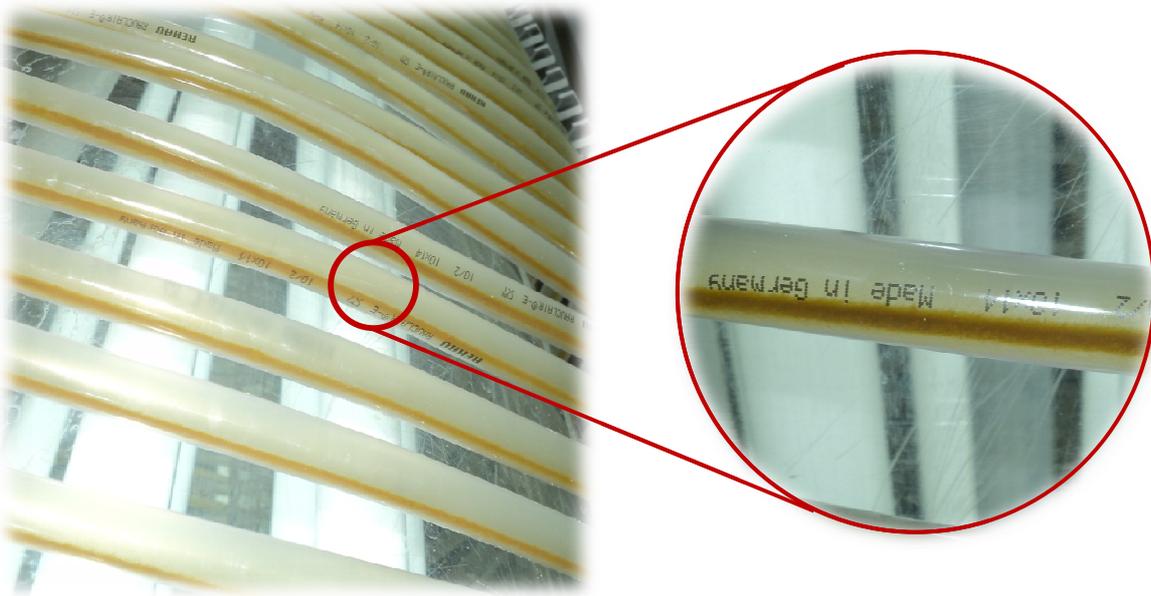


Figura a: *I. aff. galbana*, sistema de cultivo semicontinuo FBR. Imagen de la manguera de cultivo con franja de decantamiento celular en la parte basal de esta y acercamiento.



Figura **b**: *Isochrysis aff. galbana*, imagen de 3 células , visto en microscopio con objetivo de 40x.

Anexo 4

Curvas de crecimiento en sistema de cultivo FBR y *batch* de la primera y segunda etapa de los experimentos. Figuras **a** y **b** corresponden a experimentos de la primera etapa; **c**, **d** y **e** a la segunda etapa.

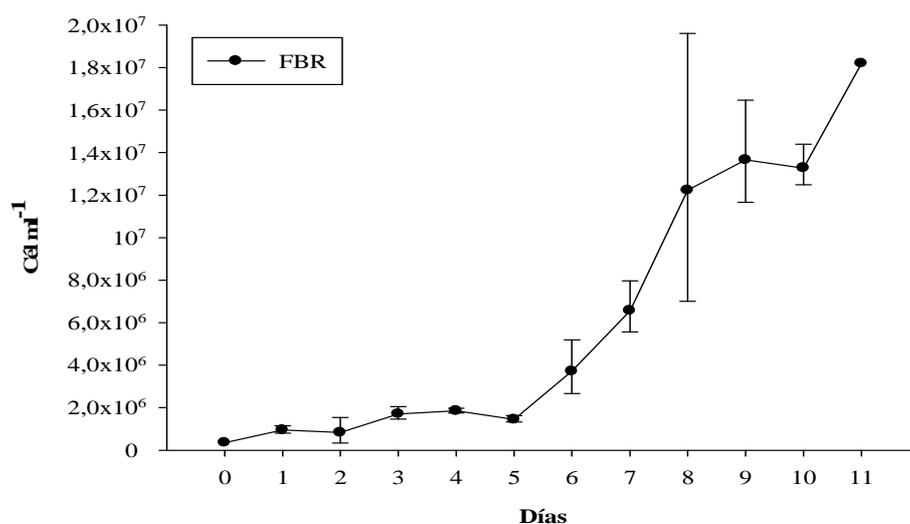


Figura **a**: *I. aff. galbana*, curva de crecimiento de la microalga cultivada en sistema FBR. Fecha de inoculación 28/01/2011. Las barras superiores indican desviación estándar y las inferiores error estándar.

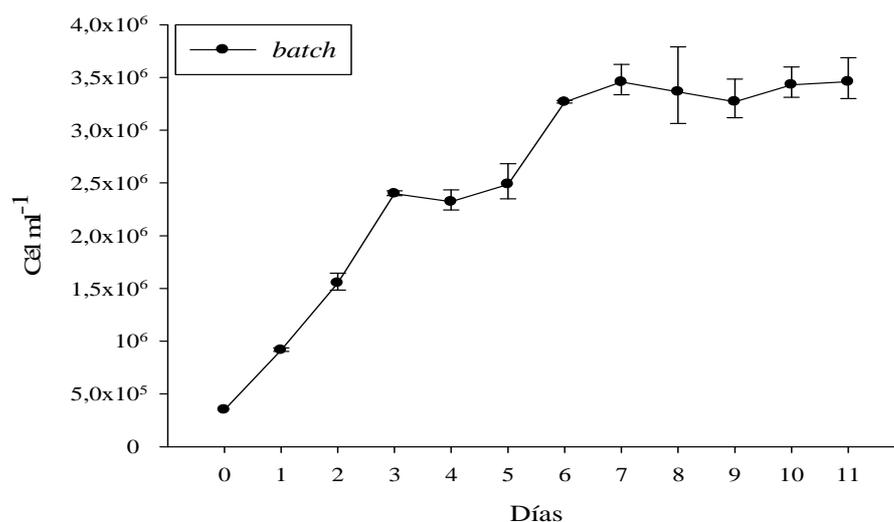


Figura **b**: *I. aff. galbana*, curva de crecimiento de la microalga cultivada en sistema *batch*. Fecha de inoculación 28/01/2011. Las barras superiores indican desviación estándar y las inferiores error estándar.

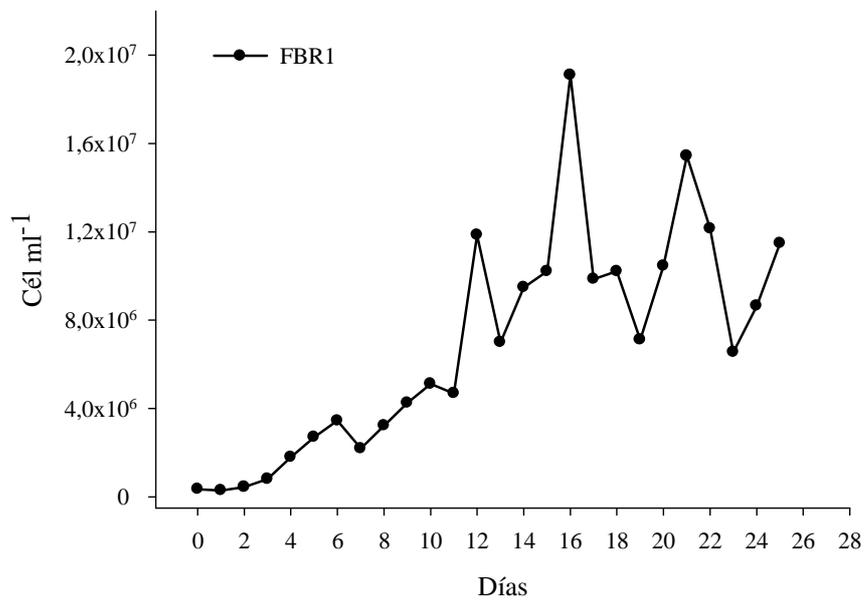


Figura c: *I. aff. galbana*, curva de crecimiento de la microalga cultivada en sistema FBR. Fecha de inoculación 14/04/2011. Las barras superiores indican desviación estándar y las inferiores error estándar.

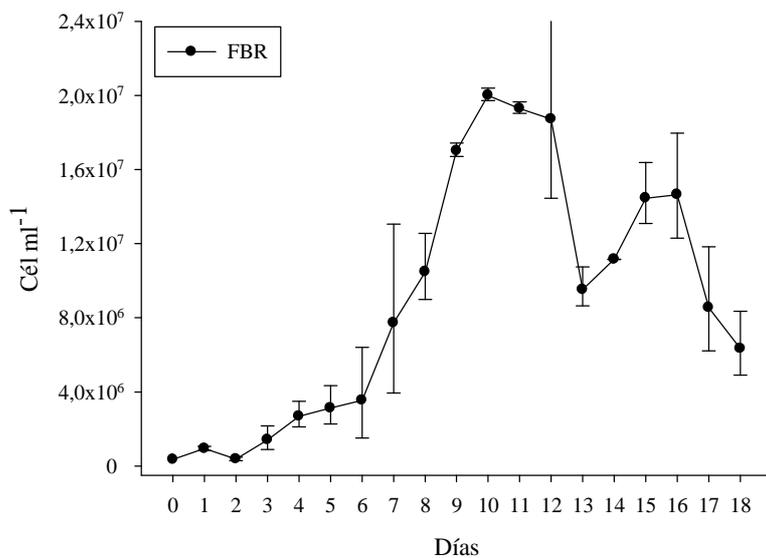


Figura d: *I. aff. galbana*, curva de crecimiento de la microalga cultivada en sistema FBR. Fecha de inoculación 22/03/2011. Las barras superiores indican desviación estándar y las inferiores error estándar.

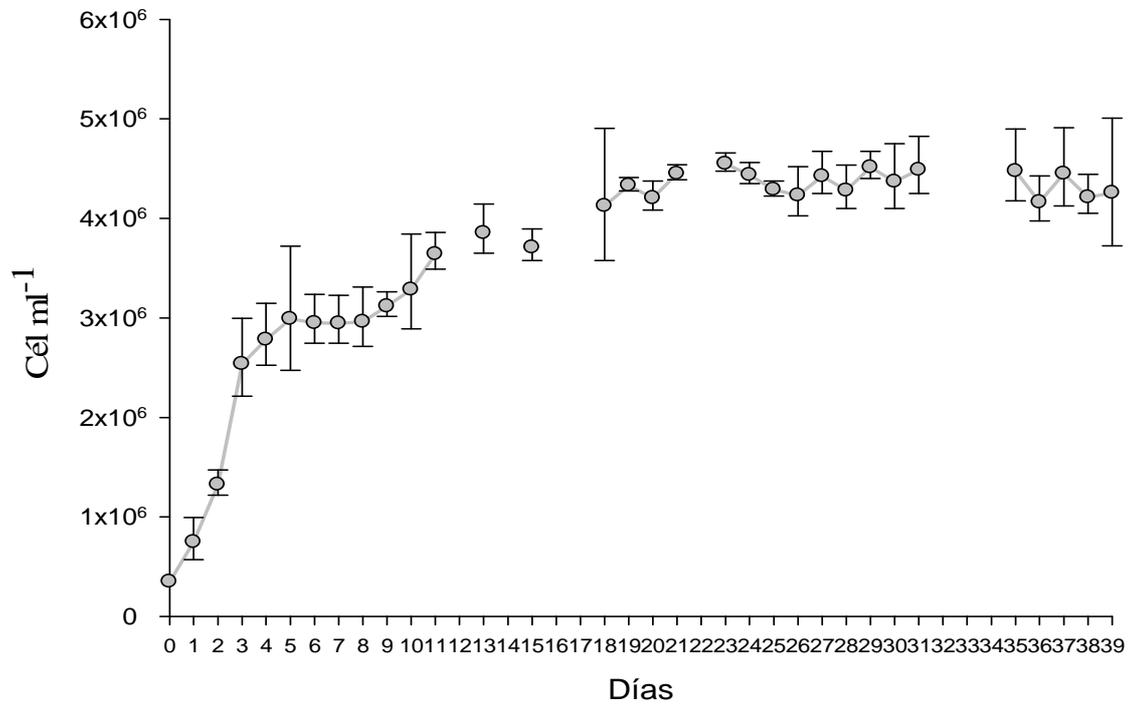


Figura e: *I. aff. galbana*, curva de crecimiento de la microalga cultivada en sistema *batch*. Fecha de inoculación 22/03/2011. Las barras superiores indican desviación estándar y las inferiores error estándar.