

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**Comparación de dos métodos de tratamiento de agua de mar en el
crecimiento de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) en un sistema
continuo.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

CARLOS ALBERTO VIDAL NIEVES

Ensenada, Baja California, México, junio 2013.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

**Comparación de dos métodos de tratamiento de agua de mar en el
crecimiento de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) en un sistema
continuo.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

CARLOS ALBERTO VIDAL NIEVES

Aprobada por:


DR. ZAUL GARCIA ESQUIVEL

DIRECTOR DE TESIS


DRA. CASANDRA ANGUIANO BELTRÁN

SINODAL


DR. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA

SINODAL

RESUMEN

Se probó el efecto de la ozonificación (OZ) como método de tratamiento del agua de mar filtrada (1 μm) utilizada en la producción de la microalga *Isochrysis sp* (clone T-ISO) en bolsas de polietileno de 400L. La ozonificación fue comparada por triplicado y durante 30 días con la pasteurización (PA, control positivo) y con un control (C) sin tratamiento adicional. El agua de mar filtrada (1 μm) fue suministrada continuamente en las bolsas con un flujo de 60 L día^{-1} . Los nutrientes se agregaron diariamente como medio F/2 y las bolsas con microalgas fueron enriquecidas con CO_2 para mantener un pH entre 7.5 y 9. La calidad de los cultivos se evaluó mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) en medio ZoBell y TCBS, cada 3 días los primeros 9 días y semanalmente el resto del experimento. Diariamente se cuantificó la concentración celular y se calculó la tasa de crecimiento específica (TCE) de las microalgas. La cantidad de bacterias (medio ZoBell) presentes en muestras de las bolsas de cultivo no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $P=0.063$), no obstante, se observó la tendencia de una mayor cantidad de UFC en el tratamiento PA ($\bar{x}= 2.23 \pm 0.59 \cdot 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$), seguido por OZ ($\bar{x}=1.11 \pm 0.37 \cdot 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$) y C ($\bar{x}=6.97 \pm 2.07 \cdot 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$). No se detectaron bacterias tipo *Vibrio* en medio selectivo TCBS en ninguno de los 3 tratamientos. Se detectaron dos fases de crecimiento de las microalgas: una exponencial (1-10 días) y otra estacionaria (11-30 días). La TCE de los tratamientos OZ y PA permanecieron relativamente constantes durante la fase estacionaria (0.163 y 0.154 respectivamente) y no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($t_{36}=0.356$; $P=0.724$). El valor de la TCE fue similar al valor del factor de dilución ($\text{FD}= 0.15$) lo que sugiere que se alcanzó un “steady state” del sistema continuo en todos los casos. En ambos tratamientos (OZ y

PA) aparecieron protozoarios a partir del día 18. En el tratamiento C aparecieron los protozoarios el día 5, y se observó una drástica caída poblacional a partir del día 10. Se concluye que el tratamiento del agua de mar mediante ozonificación es igual de eficiente que la pasteurización (PA) y ambos son mejores que el control. Por lo mismo, la ozonificación representa una alternativa más económica que la pasteurización para el cultivo continuo de microalgas.

Palabras clave: *Isochrysis sp.* (clon T-ISO), sistema continuo, ozonificación, pasteurización, bacterias, cultivos.

DEDICATORIA

Con todo mi amor y admiración a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional.

A toda mi familia

A dios por permitirme estar aquí y ahora.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Zaúl García Esquivel, por todo su tiempo y dedicación para la realización de esta tesis, así como de todos sus consejos, apoyo y por su amistad, gracias Zaúl.

A mis sinodales la Dra. Casandra Anguiano Beltrán, por el apoyo brindado para los análisis bacterianos, al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza, por permitirme utilizar su laboratorio para la realización de medios de cultivo, a ambos por sus comentarios y correcciones a este trabajo

Al técnico del Laboratorio de Biotecnología de Moluscos, M.C. Marco Aurelio González Gómez por toda su paciencia y facilidades brindadas durante el desarrollo de este trabajo.

A todos los profesores del posgrado en Oceanografía Costera por contribuir en gran medida en mi formación académica.

A Charly (Piña) por tu apoyo incondicional en momentos buenos y malos que pase durante el desarrollo de esta tesis, gracias Charly.

A mis amigos del ITMAR por todos los momentos que vivimos en este lugar: Paty, Nevía, Iyari, Martha y yiyo.

A la familia Meza Robles por su amistad incondicional y por recibirme como uno de la familia.

Al equipo del Laboratorio de Biotecnología de moluscos por hacer que cada día de trabajo sea placentero y productivo: Aurora, Alejandra, Sandra, Chavira, Gerardo, gracias por su amistad plebes.

A todos mis amigos del posgrado que de alguna u otra manera han contribuido para la realización de este trabajo, gracias.

Al CONACyT por la beca otorgada (No. 365723) para la realización de mis estudios de maestría en Oceanografía Costera.

A la Beca recibida a través del proyecto financiado a Zaúl García Esquivel: **“Estudios base para evaluar la factibilidad técnica de cultivo y/o repoblamiento de la almeja generosa, (*Panopea generosa*), en el campo”**. 15ª Convocatoria Interna UABC de Apoyo a Proyectos de Investigación, UABC.

Trabajo generado con apoyo CONAPESCA a través del proyecto de Vinculación UABC - Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) financiado a Zaúl García Esquivel **“Consolidación de la infraestructura y optimización de la tecnología para la producción de semilla de almeja generosa, *Panopea spp*”**

CONTENIDO	Pág.
RESUMEN	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE SIMBOLOS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	5
1.2. Objetivos	10
1.2.1. Objetivo general	10
1.2.2. Objetivos específicos	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Microorganismo seleccionado	11
2.2. Sistema y diseño experimental	11
2.3. Limpieza y mantenimiento de sistemas	13
2.4. Calidad bacteriológica	13
2.4.1. Medios de cultivo	13

CONTENIDO	Pág.
2.4.2. Siembra de bacterias	15
2.5. Variables físico-químicas	15
2.6. Variables poblacionales	15
2.7. Análisis estadístico	16
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Flujos y variables físico-químicas	17
3.2. Calidad Bacteriológica	20
3.2.1. Calidad bacteriológica en medio TCBS	20
3.2.2. Calidad bacteriológica en medio ZOBELL	20
3.2.2.1. Agua de mar tratada, antes de inocular microalgas	20
3.2.2.2. Inóculos de microalgas	21
3.2.2.3. Bolsas de cultivo	22
3.3. Variables Poblacionales	23
3.3.1. Tasas de crecimiento	24
4. DISCUSIÓN	28
4.1. Ozonificación y Pasteurización del agua de mar	28
4.2. Variables ambientales	29
4.3. Calidad bacteriológica	32
4.4. Variables poblacionales	34

CONTENIDO	Pág.
5. CONCLUSIONES.....	37
6. RECOMENDACIONES.....	38
7. LITERATURA CITADA.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema del sistema de cultivo continuo de la microalga <i>Isochrysis sp.</i> (clon T-ISO) en bolsas de 400 L. 1) Bomba recirculación tanque ozonificación; 2) válvula solenoide; 3) Bomba recirculación tanque des-ozonificación; 4) Válvula bola ajuste de flujo; 5) Controlador ORP y sensor sumergible; 6) Controlador ORP y sensor sumergible; 7) Reservorio 30 L; 8) Bomba recirculación pasteurización; 9, 10 y 11) Válvulas bola para ajuste de flujos; 12) generador de ozono; 13) venturi; 14) manguera de aireación.	14
2	Variación temporal de temperatura en las bolsas de cultivo de 400L de la microalga <i>Isochrysis sp.</i> (clon T-ISO) producida en un sistema continuo de agua de mar filtrada (1 μ m) enriquecida con nutrientes y tratada con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). La barra vertical indica el error estándar (n=3). Las barras cortas sobre el eje X indican la condición de nubosidad: soleado= blanco; Mayormente soleado=barra horizontal; barra vertical= parcialmente nublado; negro= nublado.	18
3	Irradianza registrada durante un período de 24 horas en el invernadero donde se instalaron las bolsas experimentales de cultivo de la microalga <i>Isochrysis sp.</i> (clon T-ISO). Los	19

datos corresponden a un día sin nubosidad (círculos vacíos) y con nubosidad (círculos rellenos).

- 4 Cambios temporales en la cantidad promedio de UFC (medio ZOBELL) obtenidos en muestras de agua de mar filtrada y tratada mediante ozonificación (OZ) o pasteurización (PA) y un control sin tratamiento (C). La barra vertical indica el error estándar (n=3). 21
- 5 Cambios temporales promedio de UFC (medio ZOBELL) en bolsas de cultivo de 400L de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO), producida en un sistema contínuo de agua de mar filtrada (1 μ m) enriquecida con nutrientes y tratada con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). La barra vertical indica el error estándar (n=3). 22
- 6 Cambios temporales en la densidad celular promedio (DC) de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) en bolsas de cultivo de 400 L alimentadas en forma contínua con agua de mar filtrada (1 μ m) enriquecida con nutrientes. El agua fue tratada previamente con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). La barra vertical indica el error estándar (n=3). 24
- 7 Cambios temporales en la tasa de crecimiento específica (μ) de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) en bolsas de cultivo de 400 L alimentadas en forma contínua con agua de 26

mar filtrada (1 μm) enriquecida con nutrientes. El agua fue tratada previamente con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). La barra vertical indica el error estándar (n=3).

- 8 Tiempo de duplicación (TD) de *Isochrysis* (Clon T-ISO) 27
cultivada en tres diferentes métodos de tratamiento de agua
de mar (PA= pasteurización; OZ= ozonificación; C= control)
en un cultivo continuo. La barra vertical indica el error
estándar (n=3).

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Variables promedio ($\pm$ error estándar) de variables físico-químicas registradas en bolsas de cultivo de 400L de la microalga <i>Isochrysis sp.</i> (clon T-ISO), producida en un sistema continuo de agua de mar filtrada (1 μ m) enriquecida con nutrientes y tratada con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). Irradianza= I_r (μ E m ⁻² s ⁻¹). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).	18
2	Parámetros poblacionales para la fase exponencial, estacionaria y promedio de <i>Isochrysis sp.</i> clon T-ISO en un sistema de cultivo continuo. Donde DC= Densidad celular ($\times 10^6$ cél mL ⁻¹), μ = tasa de crecimiento específica, D= tiempo de duplicación (días). El error estándar se muestra como $\pm$ (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).	25

LISTA DE SIMBOLOS

PA	Tratamiento pasteurización.
OZ	Tratamiento ozonificación.
C	Tratamiento control.
μ	Tasa de crecimiento específica.
D	Duplicaciones por día.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
TCBS	Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas juegan un papel importante en acuicultura, ya que aproximadamente el 90% de los laboratorios de producción acuícola emplean alimento vivo en al menos una etapa de desarrollo de los organismos cultivados (Duerr et al., 1998). En moluscos se utilizan durante toda su vida, así como en algunos estadios larvales de crustáceos y peces, o bien en organismos intermedios como rotíferos o *Artemia*. Es por ello que todos los laboratorios de producción de organismos marinos necesariamente deben tener un área para el cultivo de microalgas, así como sistemas especializados para la producción de las mismas. Los criaderos de bivalvos emplean una amplia gama de especies de microalgas como alimento vivo. Entre ellas *Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema* sp., *Chaetoceros* sp., *Chlorella minutissima*, *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia* sp., *Gomphonema* sp., y *Tetraselmis subcordiformis* (Duerr et al., 1998). En particular, *Isochrysis* sp. (clon T-ISO) se caracteriza por ser una especie de crecimiento rápido y alto contenido de proteínas (26 – 47,2 %) y lípidos (Whyte, 1987; Fernández-Reiriz et al., 1989), especialmente del ácido graso docosahexanoico (DHA, Kaplan, 1986; Patil et al., 2007).

Los métodos de producción de microalgas más conocidos son los cultivos estáticos o de tandas (“batch” en inglés), los cuales comienzan con volúmenes pequeños que son escalados a recipientes de mayor tamaño. Al alcanzar la densidad deseada las microalgas son cosechadas en su totalidad. También,

existen métodos de producción semicontínuos caracterizados por cosechas parciales y el reemplazo del mismo volumen cosechado con medio de cultivo nuevo, lo que llamamos una dilución. Estos métodos de producción tienen algunas restricciones o limitantes ya que se tiene cosecha de microalgas después de varios días de trabajo y por períodos cortos, y en una escala comercial, la demanda de personal eleva los costos de operación. Otros métodos y/o sistemas de cultivo son los de producción continua, caracterizados por producir volúmenes grandes con un alto grado de automatización. Estos se han desarrollado en sistemas con diversas formas, grados de complejidad y eficiencia (ej. placas, tubulares, entre otros) dependiendo de la finalidad de producción (Contreras et al., 2003).

Un sistema de cultivo continuo es aquel en el que se extrae un volumen del cultivo (microalgas y medio de cultivo) a una tasa constante, y al mismo tiempo, el volumen cosechado es reemplazado por una cantidad equivalente de medio enriquecido nuevo. Los sistemas de producción continua trabajan bajo dos supuestos principales: a) Si se mantiene un volumen de cultivo constante la densidad poblacional crecerá de manera constante, y b) si la tasa de crecimiento específico de las microalgas (μ) es mayor que el factor de dilución (FD) entonces, la densidad celular se incrementará con el tiempo. Por el contrario, si $\mu < FD$ el crecimiento será negativo y la densidad celular disminuirá con el tiempo. Solo si $\mu = FD$ la densidad poblacional permanecerá constante en el tiempo (Tempest, 1970). En cualquier caso, tanto la intensidad luminosa, el mezclado, el pH, el suministro de nutrientes (incluido el CO_2), la temperatura

(Contreras et al., 2003) y calidad del agua de mar, son factores que influyen directamente sobre la tasa de crecimiento de las microalgas. Algunos medios de cultivo que se han usado en la producción exitosa de algas de interés acuicultural incluyen aquellos con formulación de nutrientes realizada por Walne (1966), Matthiessen y Torner (1966) y Guillard (1975). Existen varias maneras de evaluar el crecimiento microalgal, como la tasa de crecimiento específica (μ), las divisiones por día (D) que se refiere al número de veces que una célula se divide, y el tiempo de duplicación (TD) el cual se refiere al tiempo en que la población se duplicaría (Andersen, 2005).

Por otra parte el método de tratamiento/esterilización de agua de mar es un paso crítico para el cultivo exitoso de microalgas, ya que de ello dependerá su calidad. Si bien es conocido que los métodos clásicos de cultivo (tandas) emplean la clorinación e irradiación con luz UV para el tratamiento del agua de mar en volúmenes mayores a 3L, a la larga estos métodos resultan ser costosos. En algunos fotobiorreactores se ha venido utilizando con éxito la pasteurización como método de tratamiento del agua de mar utilizada para el cultivo de microalgas. A pesar de sus ventajas, el costo de electricidad asociado al pasteurizador y al intercambiador de calor es alto, por lo que es necesario seguir explorando alternativas que abaraten dichos costos. La ozonificación es una forma de esterilización que se ha venido explorando como método terapéutico y/o de esterilización en ambientes terrestres y acuáticos (Bocci, 2006; Karnik et al., 2005; Salvesen et al., 2000), pero su uso aún no se ha probado

extensivamente ni se ha extendido como herramienta de apoyo en el cultivo de microalgas.

1.1. Antecedentes

Las microalgas se utilizan directa o indirectamente como alimento para la producción de prácticamente cualquier especie. También son usadas como suplementos en alimentos para humanos y animales, y sus derivados y/o compuestos tienen numerosas aplicaciones para la salud, cosmetología y en la producción de energía renovable (Muller-Feuga, 1997). En los laboratorios de acuicultura las microalgas son producidas en áreas dedicadas que incluyen control de luz y temperatura, especialmente en los niveles de menor volumen. A mayor escala, el método de Wells-Glancy es el más socorrido en zonas rurales, ya que utiliza filtración escasa, volúmenes grandes (> 5,000 L) y luz solar. El agua es enriquecida con productos naturales como el estiércol o con nutrientes grado industrial. Los sistemas de producción más controlados utilizan el método Milford, cuya base es la producción de microalgas con agua de alta calidad (filtrado y esterilizado), fuente de luz artificial, y nutrientes formulados.

Comúnmente, los cultivos de microalgas se realizan de manera estática (tandas) o mediante flujo continuo de agua y nutrientes en los recipientes de cultivo. Este último también se le conoce como producción en biorreactores. Existe una información vasta al respecto de los sistemas de tandas, y su éxito depende de un buen control en la calidad del agua, en la cantidad de nutrientes, y en los factores ambientales (Lemus et al., 2006; Brown y Hohmann, 2002; Kaplan, 1986; Patil et al., 2006; Tzovenis, Pauw, y Sorgeloos, 1995, 1997, 2003). En contraste con el método de tandas, son pocos los estudios que tratan sobre

los cultivos continuos masivos y como afectan las diferentes variables ambientales, así como el papel que juegan las bacterias dentro de los recipientes de cultivo y el tipo de tratamiento que se da al agua de mar antes de ser usada en la producción de microalgas.

Actualmente se emplean dos tipos de sistemas de producción continua: los turbidostatos y los quimiostatos. En los turbidostatos se cosecha un volumen continuo de microalgas, el cual es directamente proporcional al volumen de agua/nutriente entrante (Tempest, 1970). Por otra parte, los quimiostatos funcionan bajo el principio de nutriente limitante (como el nitrato). Cuando la concentración del nutriente disminuye, se adiciona una nueva cantidad fijada previamente. Por lo tanto, la tasa de crecimiento de la microalga es regulada por el nutriente limitante (Richmond, 1988). Existen dos diseños básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos, los sistemas abiertos en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera y los sistemas cerrados (Grobbelaar, 2000), comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera.

Antes de la década de los 90's los sistemas de fotobiorreactores eran de tipo carrusel ya que eran fácil de construir y tenían costo de operación bajo. Sin embargo, su desarrollo se vio limitado debido a la densidad celular baja que producían, el costo de recuperación alto de los compuestos de interés y el difícil control de la temperatura. Por lo anterior, en las últimas décadas se desarrollaron otros sistemas de materiales transparentes como el vidrio, plástico,

policarbonatos entre otros. Los fotobiorreactores tubulares y de placas planas son los que han recibido la mayor atención, ya que permiten establecer cultivos microalgales de densidad celular alta, (3 o más veces en comparación con los sistemas convencionales). Esto tiene ventajas como: 1) facilidad para cosechar la biomasa; 2) mantenimiento del cultivo sin contaminación; 3) mejor control de las condiciones de cultivo; y 4) menor costo de operación (Contreras et al., 2003).

Existen sistemas de fotobiorreactores con varios grados de complejidad, dependiendo del aprovechamiento que se les quiera dar. Recientemente, se han desarrollado algunos sistemas de producción continua para su uso en la acuicultura a nivel comercial, así como para la producción de metabolitos de interés industrial. Estos sistemas pueden establecerse en espacios interiores o exteriores, y puede ser iluminado con luz natural, artificial (lámparas) o ambas. Por ejemplo, los fotobiorreactores “BioFence” y “AddaVita” consisten en un sistema tubular en forma de serpentín principalmente. Por otra parte, el sistema “SeaCaps” es usado principalmente en la acuicultura, y consiste de bolsas de polietileno cerradas de volumen conocido (200 a 800 L). Las bolsas son alimentadas en forma continua con agua de mar pasteurizada y nutrientes, y su contenido es mezclado por burbujas ascendentes con el fin que todas las células pasen por la zona fótica del sistema.

El sistema “SeaCaps” ya ha sido estudiado por diferentes autores. Por ejemplo Jacobsen et al. (2010) realizaron cultivos de tres especies de microalgas

(*Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros muelleri*) en interiores con el sistema “SeaCaps” (iluminación= $110 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizando bolsas de 500 L, obteniendo densidades celulares de 2.16, 2.26 y $0.93 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ respectivamente. Por su parte Anzueto-Sánchez (2008) y Jacobsen et al. (2012) trabajaron con el mismo sistema “SeaCaps” pero redujeron el diámetro (D= 40-25 cm) y volumen (280-250 L) de la bolsa de cultivo. Anzueto-Sánchez, (2008) realizó cultivos de *Chaetoceros muelleri* en presencia de luz natural y artificial y un factor de dilución de 0.15, alcanzando una densidad final de $1.20 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$. Por otra parte, Jacobsen et al. (2012) realizaron los cultivos en interiores (iluminación= $220 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y obtuvieron una densidad celular de $2.41 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ para *Chaetoceros muelleri*, utilizando un factor de dilución de 0.10.

La mayoría de los estudios realizados en sistemas continuos “SeaCaps” han tenido una duración mínima de 30 días (Anzueto-Sánchez, 2008; Jacobsen et al., 2010, 2012). No obstante, se ha demostrado que las bolsas de cultivo pueden permanecer en condiciones óptimas hasta por 4 meses (Jacobsen et al., 2010, García-Esquivel, com. pers. Lab. de Biotecnología de Moluscos, IIO-UABC). Esto dependerá de las rutinas de limpieza (vaporización de tuberías) así como de la calidad de los inóculos utilizados para los cultivos en bolsa, y sobre todo mantener un pH adecuado para el crecimiento óptimo, ya que aumentos de pH por encima de 9 se verá un efecto adverso en el cultivo.

Recientemente se comenzó a utilizar el ozono como agente esterilizante, el cual funciona (dependiendo de la concentración y tiempo de residencia) inactivando y/o eliminando las bacterias presentes tanto en agua dulce como en agua de mar (Park et al., 2011, 2013; Salvesen et al., 2000; Tango y Gagnon, 2003). Algunos de los usos actuales y potenciales de ozono en el agua de mar incluyen la acuicultura, la purificación del agua y el tratamiento de aguas residuales (Perrins, 2003). El ozono es capaz de reducir o eliminar la carga bacteriana del agua de mar e incluso eliminar bacterias patógenas tipo *Vibrio* (Park et al., 2011, 2013; Tango y Gagnon, 2003). Anzueto-Sánchez (2008) incorporó la ozonificación como un sistema híbrido acoplado a la pasteurización en los sistemas de producción continua de microalgas. No obstante, el presente estudio es el primero en su tipo que utiliza el ozono como única fuente de tratamiento del agua de mar que se emplea para el cultivo continuo de microalgas.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

1. Evaluar el efecto de la ozonificación como método de tratamiento de agua de mar en el crecimiento de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO), en un sistema de producción continua.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento de *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) en un sistema continuo cultivada agua de mar tratada con ozono (OZ) y pasteurización (PA).
2. Evaluar la carga de bacterias heterótrofas y tipo *Vibrio* presentes en agua de mar tratada con ozono o pasteurizada, así como en las bolsas de cultivo continuo de microalgas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo seleccionado

La microalga *Isochrysis* sp. (clon T-ISO) fue proporcionada por el Laboratorio de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, y el escalamiento/experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos. Esta especie se mantuvo en el laboratorio utilizando medio f/2 de Guillard (1975), bajo condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (35 ups) y luz continua. Siguiendo el método clásico de escalamiento del cultivo en tandas, la microalga se produjo inicialmente en volúmenes de 125 mL (matraz) y 3 L (Fernbach) antes de ser usados como inóculo de las bolsas experimentales de 400 L.

2.2. Sistema y diseño experimental

El sistema Seacaps para producción continua de microalgas ya ha sido descrito por otros autores (Anzueto-Sánchez, 2008). Esencialmente consta de una fuente continua de agua de mar filtrada ($1 \mu\text{m}$), la cual pasa por un pasteurizador (85°C) y un intercambiador de calor antes de ser distribuida en las bolsas de cultivo (cerradas) mediante tubería de vidrio y manguera de silicón (Fig. 1). El sistema Seacaps de agua pasteurizada (PA) se usó como control positivo en el presente estudio para comparar el tratamiento del agua de mar ozonificada (OZ), los nutrientes se aplicaron en forma discreta en las bolsas de

todos los tratamientos (ver más adelante). Para el tratamiento ozonificación se utilizó agua de mar filtrada ($1\ \mu\text{m}$) y dos reservorios de 1000 y 200L respectivamente, a los cuales se les instaló un sensor de ozono (ORP) conectados a un controlador automático. En el primer reservorio se almacenó diariamente agua de mar filtrada, la cual se ozonificó a una velocidad de $10\ \text{g/h}$ mediante la inyección de ozono por medio de un venturi en el flujo entrante. El ozonificador se apagaba con un controlador automático al alcanzar una concentración máxima de $18\ \text{mg L}^{-1}$, y el agua ozonificada se dejó reposar cuando menos 16 h., el agua ya ozonificada y reposada era pasada automáticamente por un electro nivel que abría una válvula solenoide a un reservorio de 200 L, donde se aireaba fuertemente para eliminar el ozono. Una bomba (acuatic ecosystem) suministraba el agua des-ozonificada desde el 2^{do} reservorio a las bolsas de cultivo. Finalmente, para el tratamiento control (C) el agua solamente se filtró por una serie de tres filtros “cuno” de $1\ \mu\text{m}$ y posteriormente fue pasada en forma continua a las bolsas de cultivo. En el experimento se utilizaron un total de 3 bolsas de cultivo (réplicas) por cada uno de los 3 tratamientos (OZ, PA y C). Para los tres tratamientos se utilizó el medio de cultivo f/2, el cual se inyectó diariamente a las bolsas de cultivo con una jeringa. El pH se reguló mediante la inyección de CO_2 directamente en el sistema de aireación para que se distribuyera en todas las bolsas de cultivo. Los sistemas y mecanismos de tratamiento de agua de mar estuvieron conectados y controlados por una serie de mecanismos electrónicos que mantenían las condiciones necesarias para cada tratamiento. Cada bolsa se iluminó con

lámparas fluorescentes de 54 watts con montura vertical durante la noche, y durante el día por luz natural del sol. El experimento tuvo una duración de 18 días sin contaminación y 30 días en total.

2.3. Limpieza y mantenimiento de sistemas

Las tuberías de vidrio de distribución de agua de mar y las conexiones de silicón de todos los tratamientos se limpiaron con vapor de agua destilada, para reducir o eliminar el crecimiento bacteriano y protozoarios, con una periodicidad de dos veces por semana. Además, el cambio de filtros “cuno” se realizó cada 2 días, los cuales eran lavados y dejados en cloro durante 24 h. antes de ser usados nuevamente.

2.4. Calidad bacteriológica

2.4.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon siguiendo la metodología descrita por Hameed y balasubramanian (2000) con los siguientes compuestos: agar bacto peptona 5.0 g, extracto de levadura 2.5 g, cloruro férrico 1.0 mL, agar bacteriológico 15 g, y 1000 mL de agua de mar envejecida. Para el medio TCBS se utilizaron 88 g/L de dicho medio, preparado en agua de mar envejecida. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C y a una presión de 1.05 kg cm⁻² durante 15 minutos. Posteriormente se vaciaron en placas Petri junto a dos mecheros para mantener el área estéril y evitar la contaminación de estas,

las placas solidificadas fueron almacenadas en refrigeración hasta el momento de las siembras. Para las diluciones se utilizaron tubos de ensayo con 9 mL de agua de mar envejecida esterilizada en autoclave.

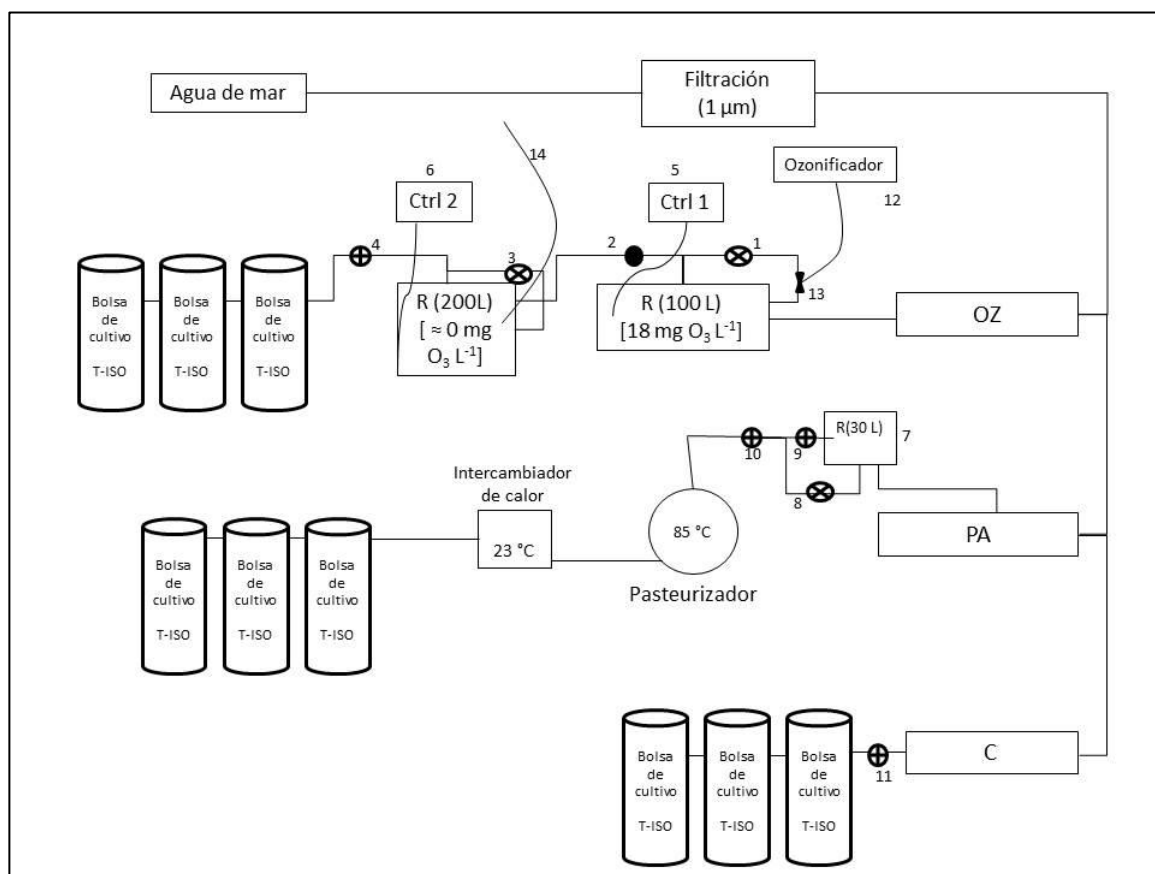


Fig 1. Esquema del sistema de cultivo continuo de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) en bolsas de 400 L. 1) Bomba recirculación tanque ozonificación; 2) válvula solenoide; 3) Bomba recirculación tanque des-ozonificación; 4) Válvula bola ajuste de flujo; 5) Controlador ORP y sensor sumergible; 6) Controlador ORP y sensor sumergible; 7) Reservorio 30 L; 8) Bomba recirculación pasteurización; 9, 10 y 11) Válvulas bola para ajuste de flujos; 12) generador de ozono; 13) venturi; 14) manguera de aireación.

2.4.2. Siembra de bacterias

La calidad del agua tratada y de los cultivos microalgales se evaluó cada 3 días durante los primeros 9 días (inicio-medio-cosecha), y cada semana durante el resto del experimento. Del agua de mar tratada (OZ, PA, C) y de cada bolsa de cultivo se tomó una alícuota de 1 mL. De esta muestra se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-3} y 10^{-4} . A partir de dichas diluciones se sembró por diseminación en placas Petri en medio ZOBELL para bacterias heterótrofas, y en medio selectivo TCBS para bacterias tipo *Vibrio* se sembró a una dilución de 10^{-2} . Todas las siembras se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron a 25°C y después de 24 h se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante conteo directo. Se contaron las colonias de bacterias que aparecieron a las 24, 48 y 72 h, se sumó el total de colonias de cada uno de los conteos y se reportaron como unidades de colonias por mL (UFC mL^{-1}).

2.5. Variables físico-químicas

Diariamente se tomaron registros de temperatura (apuntador laser Steren ± 2.5 °C), pH (potenciómetro milwaukee ± 0.1), salinidad (refractómetro Vital Sine), y concentración celular (Multisizer3 Beckman). La intensidad luminosa se midió al inicio y a la mitad del experimento con un irradiómetro (QSL-100 Biospherical Instruments Inc.).

2.6. Variables poblacionales

Los datos de concentración celular se transformaron para obtener el logaritmo natural. La tasa de crecimiento específico (μ) se calculó de acuerdo con la siguiente formula (Tempest, 1970):

$$\mu = [(\ln Ct_0 - \ln Ct_1) / t] + FD$$

Dónde: t_0 = concentración celular al tiempo t_0 , t_1 = concentración celular al tiempo t_1 , t =tiempo en días y FD = factor de dilución.

El tiempo de duplicación (D) se calculó con la siguiente formula (Falinski, 2009):

$$TD = \ln 2 / \mu$$

Dónde: $\ln 2$ = logaritmo natural de 2 y μ = tasa de crecimiento específica.

2.7. Análisis estadístico

Se utilizó análisis de varianza de 1 vía (temperatura, UFC, DC y TCE), así como prueba t-student (DC y TCE), con el programa estadístico SigmaStat 3.5, con un nivel de significancia de 0.05.

3.- RESULTADOS.

3.1.- Flujos y variables Físico-químicas.

Las bolsas de cultivo mantuvieron un flujo promedio de 60 L d^{-1} lo que dió como resultado un factor de dilución (FD) de 0.15 y un tiempo de recambio (TR) de 6.5 días. Las variables ambientales fueron similares para todos los tratamientos a lo largo del experimento, con temperaturas que fluctuaron entre 21.7 y 26°C , la variabilidad mayor de temperatura se observó durante la primera mitad del experimento. Posteriormente la variación se redujo a 3°C o menos durante el ciclo diurno (Fig. 2). En general la temperatura promedio diurna en las bolsas de cultivo fluctuó alrededor de los 24°C , y no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P= 0.546$) (Tabla 1). La salinidad también se mantuvo estable, alrededor de 34 ups todos los tratamientos (tabla 1). El pH no mostró grandes variaciones entre los tratamientos, ya que se mantuvo en un rango entre 8.5 y 9.3 excepto en el tratamiento C, el cual mostró el promedio de pH más bajo (8.2 ± 0.02) a partir del décimo día cuando cayó la densidad poblacional de microalgas (Tabla 1).

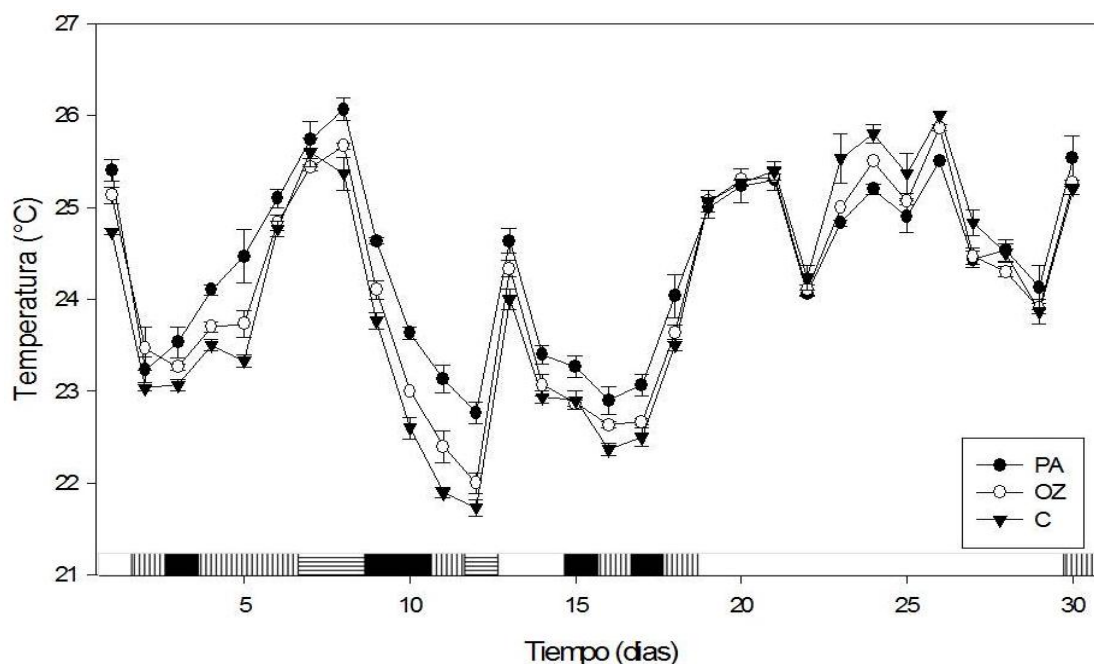


Fig 2. Variación temporal de temperatura en las bolsas de cultivo de 400 L de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) producida en un sistema continuo de agua de mar filtrada (1 μ m) enriquecida con nutrientes y tratada con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). La barra vertical indica el error estándar (n=3). Las barras cortas sobre el eje X indican la condición de nubosidad: soleado= blanco; Mayormente soleado=barra horizontal; barra vertical= parcialmente nublado; negro= nublado.

Tabla 1. Variables promedio ($\pm$ error estándar) de variables físico-químicas registradas en bolsas de cultivo de 400L de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO), producida en un sistema continuo de agua de mar filtrada (1 μ m) enriquecida con nutrientes y tratada con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). Irradianza= Ir (μ E m⁻² s⁻¹). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

	PA	OZ	C
Temperatura (°C)	24.3 $\pm$ 0.11 ^a	24.1 $\pm$ 0.03 ^a	24.05 $\pm$ 0.02 ^a
Salinidad (ups)	34.1 $\pm$ 0.01 ^a	34.1 $\pm$ 0.01 ^a	34.2 $\pm$ 0.02 ^a
pH	8.8 $\pm$ 0.01 ^a	8.8 $\pm$ 0.02 ^a	8.2 $\pm$ 0.02 ^b
Ir nublado(1 jun)		176.2 $\pm$ 27.17	
Ir despejado (11 jun)		345.0 $\pm$ 45.42	

La cantidad de luz que incidió sobre las bolsas de cultivo varió con la hora del día y presentó un patrón tipo parábola (Fig. 3), con valores mínimos ($26.5\text{--}127.4 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a la salida y puesta del sol, y máximos entre las 11 y 15 h ($684.2\text{--}802.8 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Las irradianzas mínima, máxima y promedio registradas durante el día en condiciones de nubosidad fueron de 3.03 , 684.2 y $176.2 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente (Fig. 3, Tabla 1), mientras que en un día soleado los valores mínimo, máximo y promedio durante el día fueron 26.3 , 802.3 , y $345.0 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fig. 3, Tabla 1). Cabe señalar que durante la noche la luz artificial provenía de lámparas de 56 W , las cuales proporcionaron una intensidad luminosa constante de $181 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

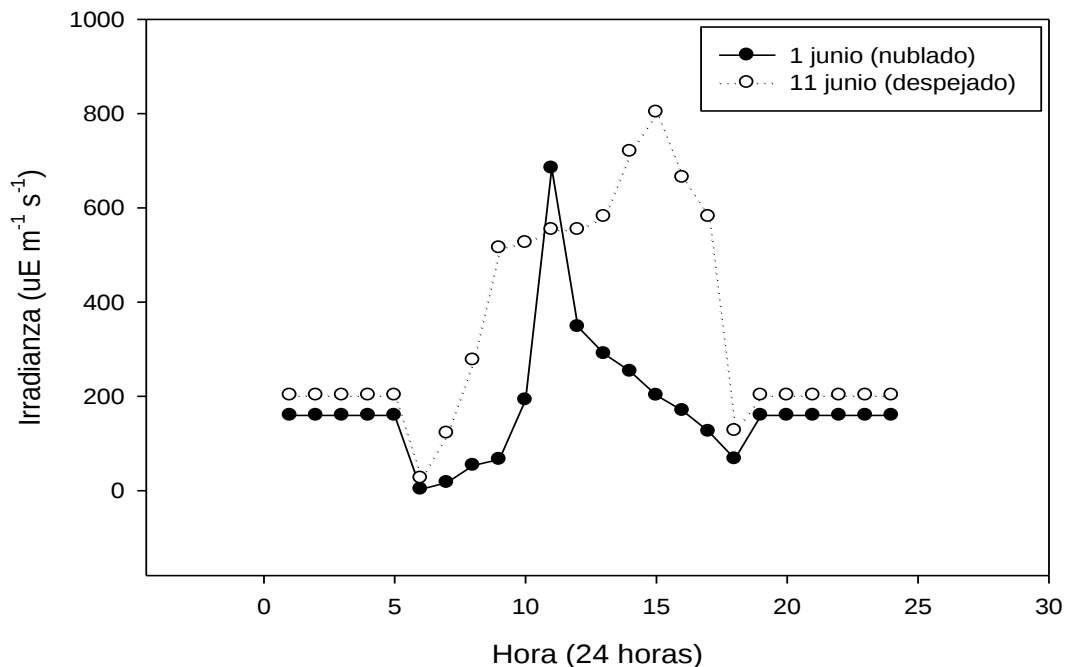


Fig 3. Irradianza registrada durante un período de 24 horas en el invernadero donde se instalaron las bolsas experimentales de cultivo de la microalga

Isochrysis sp. (clon T-ISO). Los datos corresponden a un día sin nubosidad (círculos vacíos) y con nubosidad (círculos rellenos).

3.2. Calidad bacteriológica

3.2.1. Calidad bacteriológica en medio TCBS

No se registraron bacterias tipo *Vibrio* durante ningún muestreo para ninguno de los tratamientos.

3.2.2. Calidad bacteriológica en medio ZOBELL

3.2.2.1. Agua de mar tratada, antes de inocular microalgas

Los conteos de bacterias heterótrofas que se hicieron durante los seis muestreos realizados no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.063$), la cantidad de bacterias vario a lo largo del tiempo entre 0 y $1.30 \cdot 10^4$ UFC mL⁻¹, excepto por un valor anómalo ($3.47 \cdot 10^4$ UFC mL⁻¹) observado el día 5 en el tratamiento PA (Fig. 4). Durante el experimento se contabilizó un promedio de $1.09 \pm 0.51 \cdot 10^4$ UFC mL⁻¹ para el tratamiento PA, $3.22 \pm 1.13 \cdot 10^3$ UFC mL⁻¹ para OZ, y $1.11 \pm 0.70 \cdot 10^2$ UFC mL⁻¹ para el control (C).

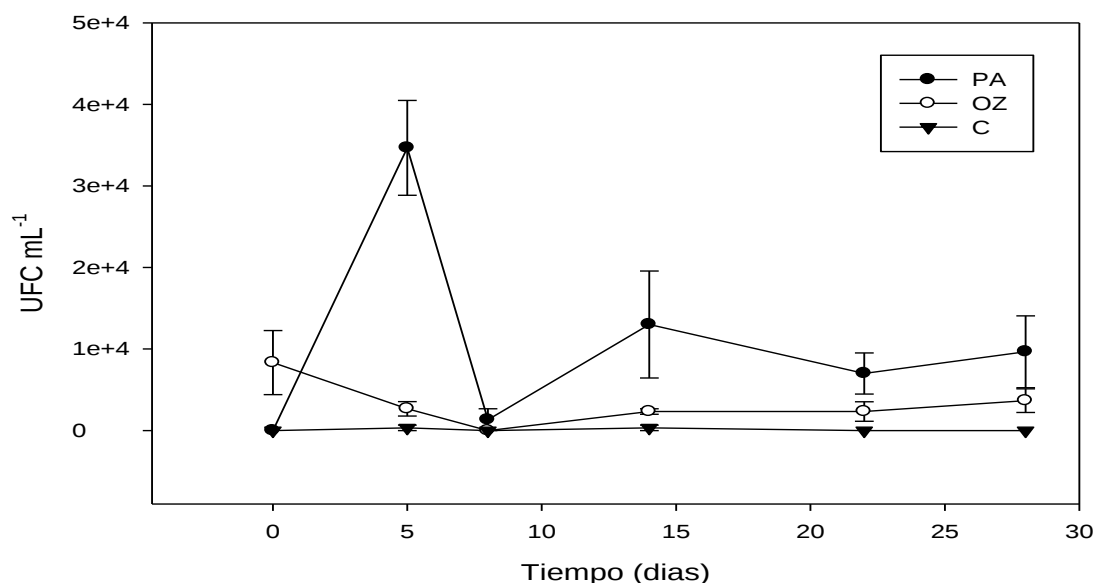


Fig 4. Cambios temporales en la cantidad promedio de UFC (medio ZOBELL) obtenidas en muestras de agua de mar filtrada y tratada mediante pasteurización (PA) u ozonificación (OZ) y un control sin tratamiento (C). La barra vertical indica el error estándar (n=3).

3.2.2.2. Inóculos de microalgas

La cantidad de bacterias presentes en las muestras de microalgas cultivadas en nivel Fernbach (3 L), previo a su inoculación en las bolsas experimentales, no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.534$). Los valores más altos de bacterias se observaron en el tratamiento C ($1.46 \pm 0.0527 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹), seguidos por PA ($1.33 \pm 0.230 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹) y OZ ($1.21 \pm 0.0521 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹).

3.2.2.3. Bolsas de cultivo

No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de bacterias presentes en las bolsas de cultivo de los distintos tratamientos ($P=0.062$). No obstante, el tratamiento PA tendió a presentar la mayor cantidad de UFC ($2.23 \pm 0.59 \cdot 10^5$ UFC mL⁻¹), seguido por OZ ($1.11 \pm 0.37 \cdot 10^5$ UFC mL⁻¹) y C ($6.97 \pm 2.07 \cdot 10^4$ UFC mL⁻¹) (Fig. 5). En general los tratamientos PA y OZ mostraron una tendencia a incrementar gradualmente su carga bacteriana hacia el final del experimento (Fig. 4), excepto por un valor anómalo del tratamiento PA observado el día 5 ($4.29 \cdot 10^5$ UFC mL⁻¹).

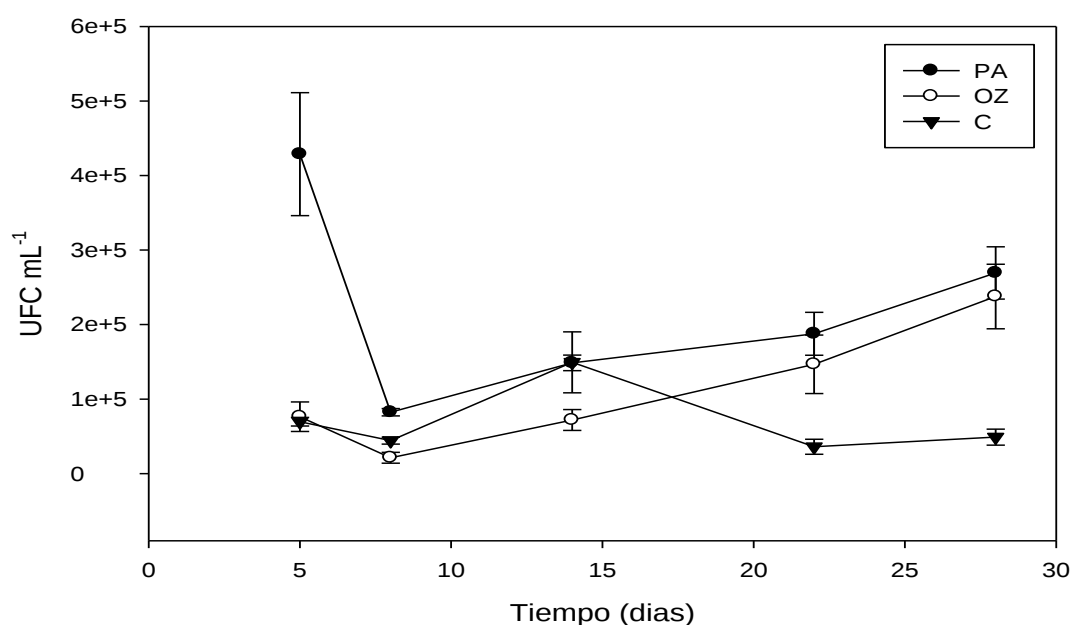


Fig 5. Cambios temporales promedio de UFC (medio ZOBELL) en bolsas de cultivo de 400 L de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO), producida en un sistema continuo de agua de mar filtrada (1 μ m) enriquecida con nutrientes y tratada con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos

del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). La barra vertical indica el error estándar (n=3).

3.3. Variables poblacionales

3.3.1. Tasas de crecimiento

La densidad celular de *Isochrysis sp.* clon T-ISO en bolsas recién inoculadas fue de $398,090 \pm 3,672$ cél mL⁻¹, $394,095 \pm 4,111$ cél mL⁻¹, y $400,445 \pm 1,800$ cél mL⁻¹ para los tratamientos PA, OZ, y C respectivamente. En general se observaron dos fases claras de crecimiento (Fig. 6), del día 0 al 10 donde ocurre una fase de crecimiento rápido con densidades entre 1.82×10^6 y 3.92×10^6 cél mL⁻¹, durante esta etapa no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.548$). A partir del día 11 y hasta el final del experimento (día 30) ocurrió una aparente “fase estacionaria” con densidades entre 2.736 y 3.918×10^6 cél mL⁻¹ para los tratamientos OZ y PA (Fig. 6), sin embargo, estas diferencias en la DC no mostraron diferencias significativas ($t_{36} = 0.447$; $P = 0.658$). Es importante mencionar que en el día 5 se detectó contaminación por protozoarios tipo *Paramecium sp.* en las bolsas de cultivo del tratamiento C, y el efecto negativo se observó claramente a partir del día 10 con una caída drástica de la densidad celular desde $3.918 \pm 0.304 \times 10^6$ cél mL⁻¹ hasta 7.780×10^4 cél mL⁻¹ (Fig. 6). Al comparar las fases de rápido crecimiento y estacionaria de los tratamientos OZ y PA se encontraron diferencias significativas ($t_2 = -38.916$; $P=0.001$) siendo esto una clara evidencia de las dos fases de crecimiento. Los

tratamientos PA y OZ se vieron afectados por la presencia de protozoarios a partir del día 18 de cultivo. En este caso no se observó la caída drástica reportada previamente para el tratamiento C cuando aparecieron los protozoarios.

En promedio durante el experimento la DC para PA fue de $3.132 \pm 0.151 \times 10^6$ cél mL⁻¹ y $3.122 \pm 0.155 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para OZ (Fig. 6, Tabla 2), estas diferencias en la DC no fueron significativas ($t_{52}=0.053$; $P=0.958$).

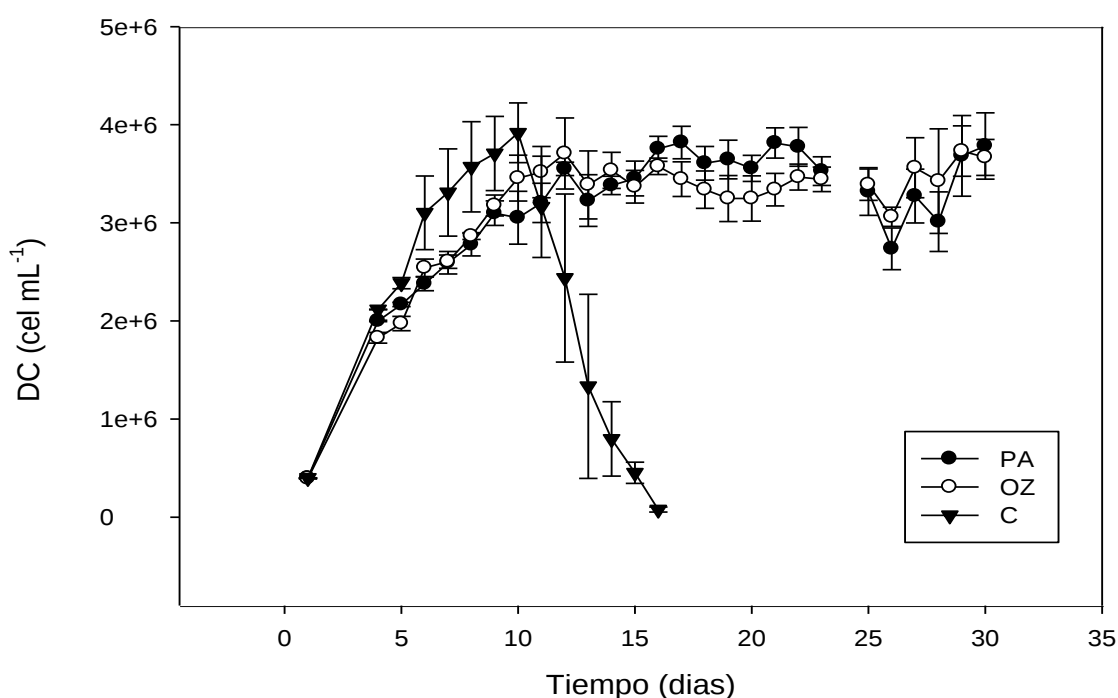


Fig 6. Cambios temporales en la densidad celular promedio (DC) de la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) en bolsas de cultivo de 400 L alimentadas en forma continua con agua de mar filtrada (1 μ m) enriquecida con nutrientes. El agua fue tratada previamente con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). La barra vertical indica el error estándar ($n=3$).

Tabla 2. Parámetros poblacionales para la fase exponencial, estacionaria y promedio de *Isochrysis sp.* clon T-ISO en un sistema de cultivo continuo. Donde DC= Densidad celular ($\times 10^6$ cél mL⁻¹), μ = tasa de crecimiento específica, D= tiempo de duplicación (días). El error estándar se muestra como $\pm$ (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

Exponencial			
	PA	OZ	C
DC	2.308 $\pm$ 0.077 ^a	2.355 $\pm$ 0.044 ^a	2.813 $\pm$ 0.244 ^a
μ	0.267 $\pm$ 0.011 ^a	0.295 $\pm$ 0.006 ^a	0.297 $\pm$ 0.011 ^a
D	3.406 $\pm$ 0.374 ^a	2.766 $\pm$ 0.140 ^a	2.832 $\pm$ 0.093 ^a
Estacionaria			
DC	3.48 $\pm$ 0.186 ^a	3.445 $\pm$ 0.203 ^a	0.542 $\pm$ 0.167 ^b
μ	0.162 $\pm$ 0.0007 ^a	0.153 $\pm$ 0.001 ^a	-0.024 $\pm$ 0.004 ^b
D	5.970 $\pm$ 0.906 ^a	5.867 $\pm$ 0.400 ^a	3.892 $\pm$ 1.449 ^b
Promedio			
DC	3.132 $\pm$ 0.151 ^a	3.122 $\pm$ 0.155 ^a	1.241 $\pm$ 0.190 ^b
μ	0.191 $\pm$ 0.0037 ^a	0.192 $\pm$ 0.0009 ^a	0.066 $\pm$ 0.0057 ^b
D	5.28 $\pm$ 0.712 ^a	5.032 $\pm$ 0.302 ^a	3.59 $\pm$ 1.068 ^a

La tasa de crecimiento específica exhibida por *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) durante la primera fase de cultivo (10 días) varió entre 0.56 y 0.12, mientras que en el resto del experimento (11-30 días) osciló alrededor de 0.04 y 0.34 (Fig. 7). Las diferencias durante la fase de crecimiento rápido no fueron significativas (P=0.896). En la fase de crecimiento estacionaria las diferencias no fueron significativas ($t_{36}=0.356$; P=0.724), en promedio el tratamiento PA presentó un valor de 0.163 ± 0.0007 y 0.154 ± 0.001 para OZ. En promedio durante los 30 días del experimento, no se encontraron diferencias significativas ($t_{50}=0.026$; P=0.979), siendo el tratamiento OZ (0.192 ± 0.0009) en donde registro el valor mayor, PA con 0.191 ± 0.0037 y C 0.066 ± 0.0057 (Fig. 7 y Tabla 2). En las

pruebas estadísticas para la fase estacionaria y promedio durante el experimento sólo se compararon los tratamientos PA y OZ.

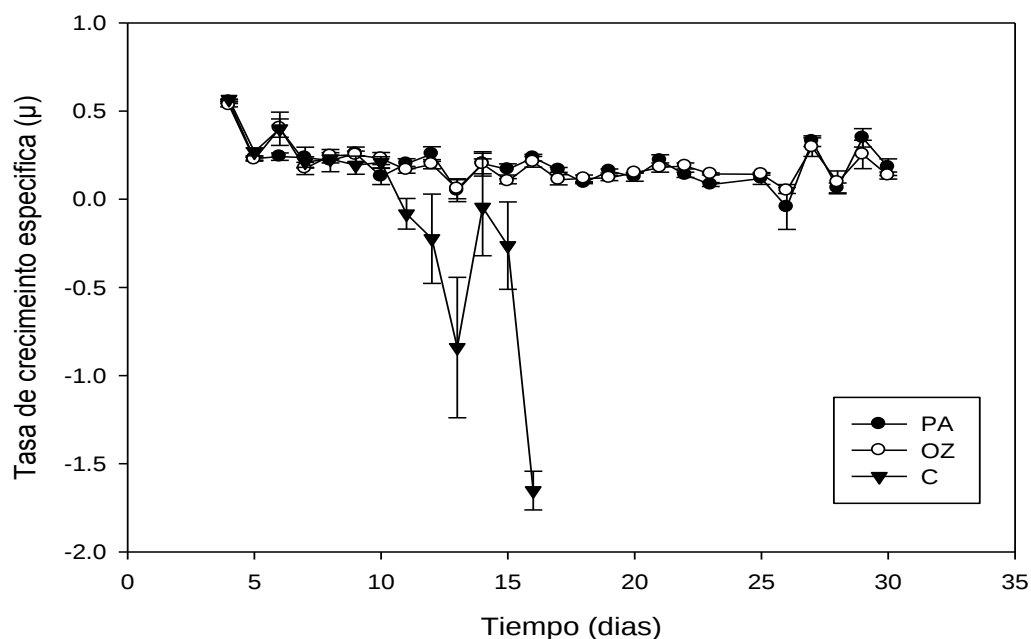


Fig 7. Cambios temporales en la tasa de crecimiento específica (μ) de la microalga *Isochrysis* sp. (clon T-ISO) en bolsas de cultivo de 400 L alimentadas en forma continua con agua de mar filtrada ($1\ \mu\text{m}$) enriquecida con nutrientes. El agua fue tratada previamente con ozono (OZ) o pasteurización (PA). Se muestran también los datos del tratamiento control (C= microalgas en agua filtrada enriquecida, sin tratamiento adicional). La barra vertical indica el error estándar ($n=3$).

El tiempo de duplicación mostró un comportamiento directamente proporcional a la tasa de crecimiento específico, se observó poca variabilidad entre los tratamientos PA y OZ (Fig. 8), no se observaron diferencias significativas durante el experimento ($t_{50}=0.180$; $P=0.858$). El número de divisiones por día varió entre 1.771 y 32.221 durante los 30 días del

experimento, el valor mejor se obtuvo en el tratamiento OZ (5.032 ± 0.302), seguido por PA (5.28 ± 0.712) (Fig. 8 y Tabla 2).

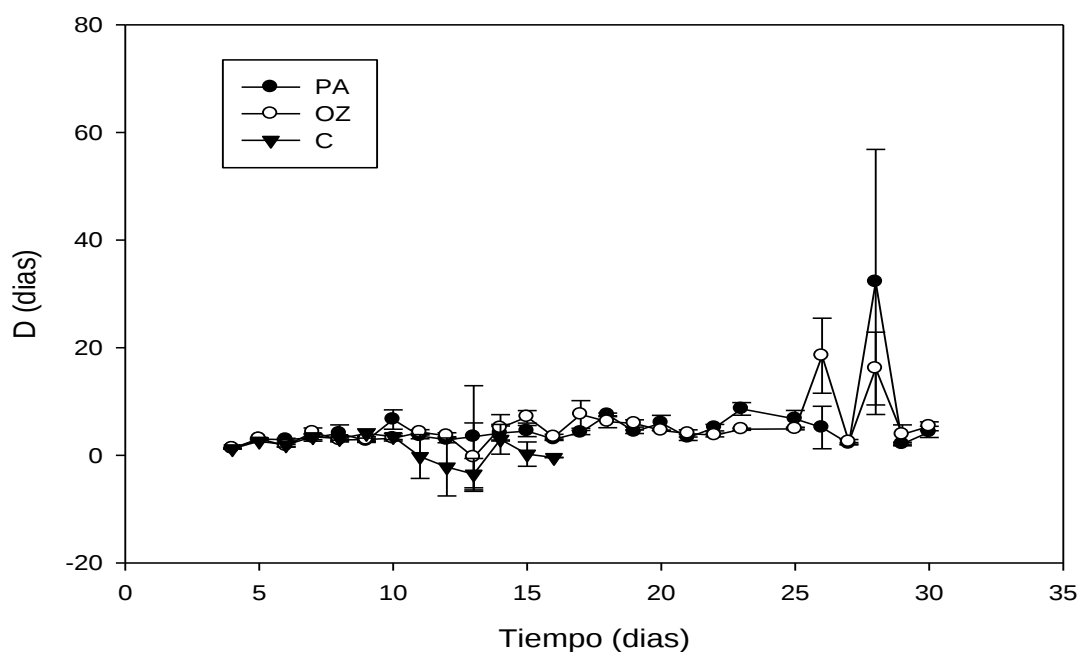


Fig 8. Tiempo de duplicación (TD) de *Isochrysis* (Clon T-ISO) cultivada en tres diferentes métodos de tratamiento de agua de mar (PA= pasteurización; OZ= ozonificación; C= control) en un cultivo continuo. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

4. DISCUSIÓN

4.1. Ozonificación y Pasteurización del agua de mar

La ozonificación con $18 \text{ mgO}_3 \text{ L}^{-1}$ resultó efectiva como método de tratamiento del agua de mar utilizada para el cultivo de la microalga *Isochrysis sp* (clon T-ISO) en bolsas de polietileno de 400L con flujo continuo. Su efectividad fue comparable con el tratamiento de pasteurización del sistema Seacaps®, el cual se usó en el presente estudio como control positivo. Lo anterior fue evidenciado tanto por la cantidad de bacterias presentes en cada tratamiento a lo largo del tiempo como en los parámetros poblacionales de T-ISO.

Se sabe que el ozono actúa como oxidante de materia orgánica y como inactivador de microorganismos presentes en agua de mar (Ritar et al., 2006). En particular se ha utilizado en sistemas acuícolas para reducir el olor, turbidez, bacterias, sólidos suspendidos, color, nitratos y el efecto de los subproductos derivados del bromo (Tango y Gagnon, 2003; Park et al., 2011; Park et al., 2013; Gensemer; Sharrer y Summerfelt, 2007; Perrins, 2003). Existen pocos estudios sobre el efecto del ozono en bacterias presentes en agua de mar. Sin embargo, se sabe que estas pueden ser inactivadas a concentraciones bajas de ozono ($0.06 - 0.1 \text{ mg L}^{-1}$, Sugita et al., 1992) y eliminadas en un 99% con niveles de ozono entre $0.1 - 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ y un tiempo de exposición muy corto (60 s, Colberg y Lingg, 1978). Es evidente que el ozono residual no fue un problema en el presente estudio, ya que este fue eliminado con un burbujeo intenso y su afecto

en las tasas de crecimiento y/o la densidad celular de T-ISO fue comparable con el tratamiento por pasteurización. Además, la ozonificación resultó más práctica que la pasteurización debido a que: a) el equipo es relativamente económico en comparación con el pasteurizador y se usa por períodos relativamente cortos, b) el ozono se puede eliminar de manera relativamente fácil y rápida, c) no altera la temperatura del agua, y d) se requiere un cuidado y mantenimiento del equipo mínimos.

4.2. Variables ambientales

La temperatura mantuvo el mismo comportamiento y grado de variabilidad en las bolsas de todos los tratamientos, con aumentos y disminuciones a lo largo del experimento, y se mantuvo en el rango óptimo reportado para *I. galbana* (22-28 °C, Kaplan, 1986). Fue evidente que el laboratorio tipo invernadero donde se desarrolló el presente estudio ayudó a amortiguar los cambios de temperatura, y que dicha variación estuvo directamente relacionada con las condiciones de nubosidad. En este sentido, la intensidad luminosa de un día despejado ($344.98 \pm 45.42 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) disminuyó hasta en un 50 % en un día parcialmente nublado ($176.16 \pm 27.17 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Pese a dicha variación, la irradianza se mantuvo dentro del intervalo óptimo reportado para el crecimiento de *I. galbana* (200-400 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Marchetti et al., 2012) e *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) (220-460 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Tzovenis et al., 2003). Aunque en el presente estudio no se evaluaron procesos de fotolimitación y fotoinhibición, es de esperarse que dichos procesos no se hayan presentado en las bolsas de cultivo, ya que las células de

Isochrysis sp. se fotoinhiben a irradianza mayores que $1630 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Molina Grima et al., 1997).

Por otra parte, la iluminación artificial que se ofreció durante la noche con lámparas fluorescentes no logró satisfacer las necesidades de T-ISO, ya que proporcionaron solamente $181.0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el cual es un valor por debajo del reportado para el crecimiento óptimo de la especie. En relación a lo anterior, estudios previos reportaron el desempeño de *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) cultivada en interiores con el sistema Seacaps, y se encontró que a la intensidad luminosa ofrecida ($110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) produjo una densidad celular baja (Jacobsen et al., 2010). A pesar de lo anterior, fue evidente en el presente estudio que la iluminación solar proveyó la mayor parte de la luz requerida por T-ISO, mientras que la iluminación artificial tuvo una contribución mínima. Por lo mismo, se sugieren estudios de costo-beneficio en caso de implementar lámparas fluorescentes con una mayor intensidad luminosa como fuente de iluminación artificial única. El presente estudio se desarrolló durante la época de primavera lo cual es óptimo refiriéndose a variables de temperatura, fotoperiodo e irradianza, en comparación al invierno el fotoperiodo se reduce un 35% (INIFAP, 1961-2003) y por lo mismo es de esperarse que la irradianza también disminuya, por lo que el factor de dilución debe estar manejándose de acuerdo con la época del año. Por otra parte, se sabe que el diámetro de la bolsa de cultivo influye directamente sobre el crecimiento microalgal, ya que conforme aumenta la densidad celular la irradianza disminuye hacia el interior de la bolsa.

Esto ha sido reportado por otros autores como (Richmond, 2004) quien observó que la luz sólo penetra 3 cm. y Jacobsen et al. (2010) en un sistema Seacaps observó una reducción de un 20 a 30 % de irradianza conforme aumenta la densidad celular. Por lo mismo, la intensidad luminosa parece ser un factor que requiere de un manejo crítico en los cultivos interiores mientras que en el laboratorio tipo invernadero este factor no pareció afectar significativamente, excepto durante la noche.

Finalmente, el pH fue controlado eficientemente durante el experimento mediante la adición de pulsos de CO₂. Se ha reportado que el máximo permisible para el óptimo crecimiento de *I. galbana* es de 9.1(Kaplan, 1986). Un trabajo con el mismo sistema y especie Anzueto-Sánchez (2008) reporta un máximo similar de pH de 8.97. Es importante resaltar que en el tratamiento C se registraron valores relativamente bajos de pH (8.2) después de la aparición de los protozoarios en las bolsas. Es de esperarse que esto sucediera, ya que la aparición de protozoarios vino acompañada con la caída poblacional del *Isochrysis sp.* lo que supone un aumento del proceso de respiración y aunado a esto se siguieron adicionando pulsos de CO₂. A su vez, la salinidad se mantuvo en niveles óptimos ya que *I. galbana* se desarrolla de manera óptima en un rango amplio de salinidad (5-60 g l⁻¹ de NaCl, Kaplan 1986).

4.3. Calidad Bacteriológica

Algunos estudios han reportado la presencia de *Vibrio sp.* en cultivos estáticos y semicontinuos de *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) (Salvesen et al., 2000; Simental, 2001) sin embargo, en el presente trabajo no se logró detectar dichas bacterias. La ausencia de bacterias tipo *Vibrio* en todos los tratamientos, indica que las microalgas producidas en el sistema Seacaps bajo las condiciones del presente trabajo (agua ozonificada o pasteurizada) son aptas para su uso en la alimentación de peces y moluscos. La presencia de bacterias heterótrofas en los cultivos de *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) típicamente se originan en las mismas microalgas y en el agua, ya que las bacterias son incapaces de crecer por si solas en medio f/2 (Gonzales-Del Valle, 1997). Pese a que la inoculación en el medio f/2 se realiza en condiciones de asepsia es prácticamente imposible mantener un cultivo axénico, ya que las bacterias se encuentran íntimamente asociadas a los cultivos microalgales

Fue evidente la efectividad del tratamiento de ozono en el agua de mar (sin microalgas) ya que a pesar de que estadísticamente no se encontraron diferencias significativas, fue clara la tendencia de una menor cantidad de bacterias heterótrofas marinas presentes en las muestras de agua ozonificada ($3.22 \pm 1.13 \cdot 10^3$ UFC mL⁻¹) que en la pasteurizada ($1.09 \pm 0.51 \cdot 10^4$ UFC mL⁻¹). Es probable que dicha tendencia se haya debido a la presencia de trazas de ozono en el agua, el cual continuaría actuando sobre las bacterias mientras se volatiliza. La cantidad de bacterias observadas en el presente estudio están

ligeramente por encima de lo reportado por Simental 2001 ($0.000745 \cdot 10^6$ UFC mL^{-1}) para agua tratada con luz UV. No obstante, este autor utilizó volúmenes mucho más pequeños (20 L) y por lo tanto es de esperarse un mejor control del proceso de esterilización.

Por otra parte, la cantidad de bacterias heterótrofas observadas en las muestras obtenidas de las unidades experimentales (bolsas de cultivo) durante el primer muestreo, exhibieron una alta cantidad de bacterias, esto pudo deberse a una alta concentración de bacterias ($1.33 \cdot 10^6$ UFC mL^{-1}) presentes en el inóculo de microalgas (Fernbach de 3 L) que se usó en los primeros 60 L de agua tratada en las bolsas. Este efecto del escalamiento en relación al máximo de bacterias los primeros días de cultivo ya ha sido reportado por Simental (2001). En el presente trabajo se registró un máximo de $2.23 \pm 0.59 \cdot 10^5$ UFC mL^{-1} en el tratamiento PA. Este valor se encuentra hasta un orden de magnitud por debajo de lo reportado por Simental (2001) ($3.72 \cdot 10^6$ UFC mL^{-1}) utilizando agua de mar tratada con luz UV. Lo anterior sugiere que tanto la ozonificación como la pasteurización fueron más eficientes respecto a la luz UV reportada por el citado autor.

Es importante hacer notar que el tratamiento C que fue el que decayó drásticamente a partir del día 10, y presentó contaminación por protozoarios 13 días antes que el resto de los tratamientos y aun así presentó la cantidad menor de bacterias ($6.97 \pm 2.07 \cdot 10^4$ UFC mL^{-1}). Esto pudo deberse a la poca cantidad de materia orgánica disponible como sustrato para las bacterias, ya que las

bolsas de cultivo prácticamente se estaban lavando con el medio de cultivo entrante. Otra fuente importante para la disminución bacteriana son los protozoarios ya que estos fagocitan bacterias (Sherr y Sherr, 2000) y por ende, reducen la carga bacteriana. Estas asociaciones fitoplancton-bacterias-protozoos se han reportado por autores como Nagata (2000) y Sherr y Sherr, (2000), indicando que es la conexión de los primeros niveles de la cadena trófica. Cabe mencionar que los protozoarios presentes en los tres tratamientos (C al día 5, OZ y PA día 18) pertenecen al género *Paramecium sp.*, estos ya han sido reportados con anterioridad para cultivos de *I. galbana* (Kaplan, 1986).

4.4. Variables Poblacionales

En el sistema de cultivo continuo Seacaps no fue posible obtener muestras sino hasta después de 3 días, cuando el volumen acumulado rebasó la parte media de la bolsa. No obstante, visualmente y con datos posteriores se pudo evidenciar una fase clara de crecimiento exponencial, y cuando el cultivo llegó a una aparente fase estacionaria al llenarse la bolsa, se observaron tasas de crecimiento muy similares entre tratamientos y con poca variabilidad. Lo anterior evidencia un patrón de crecimiento típico para un sistema continuo con un factor de dilución apropiado (Richmond, 1988).

Los tratamientos por pasteurización (3.132×10^6 cél mL⁻¹) y ozonificación (3.122×10^6 cél mL⁻¹) no mostraron diferencias significativas en la densidad celular alcanzada durante la fase estacionaria, lo que indica que la ozonificación

fue tan efectiva como la pasteurización, y que la primera no tuvo efectos negativos en la calidad del agua de mar. En comparación con otros estudios, se han reportado densidades más bajas de microalgas (2.16×10^6 cél mL⁻¹, Jacobsen et al., 2010) o más altas (4.27×10^6 cél mL⁻¹, Anzueto-Sánchez 2008) que las obtenidas en el presente estudio utilizando el mismo tipo de sistema (Seacaps) y especie de microalga. Es importante mencionar que en el trabajo de Anzueto-Sánchez (2008) se emplearon bolsas de diámetro menor (40 cm), con volumen menor (288 L) y por lo tanto con mayor penetración de la luz. El FD será establecido en función de las variables ambientales, ya que de ello depende el crecimiento celular óptimo, esto es de gran importancia ya que un inadecuado uso del FD se vería reflejado en el aumento de costos de producción.

Con relación a la tasa de crecimiento, cuando estas son similares al factor de dilución el cultivo llega a una fase de equilibrio ("steady-state") y así permanecerá mientras las condiciones ambientales permanezcan sin gran cambio (Droop, 1975). El crecimiento podría verse afectado negativamente si se presentan condiciones limitantes o factores que inhiban el crecimiento. En este trabajo no se observó un factor limitante como tal, y es evidente en las tasas de crecimiento de los tratamientos PA (0.163) y OZ (0.154), donde se observa su similitud al factor de dilución utilizado de 0.15. En este caso los tratamientos PA y OZ alcanzaron la fase estacionaria, excepto el tratamiento control.

Los cultivos continuos pueden tener mayor producción que los sistemas estáticos debido a que pueden mantener sus parámetros constantes y por un tiempo prolongado, tales como la densidad celular y la tasa de crecimiento. Son

los cultivos estáticos los que presentan la mayor densidad en comparación con un sistema continuo. Sin embargo son los sistemas continuos los que generan la mayor productividad por lo antes mencionado. Brown et al. (1993) reportan un peso celular para T-ISO de 30.1 pg cél^{-1} , en base a ese peso celular, en este trabajo se estimó un rendimiento máximo de 5.63 g d^{-1} en el tratamiento PA, este resultado es mayor que el obtenido por Anzueto-Sánchez (2008) reportando 3.32 gr d^{-1} para *Isochrysis sp.* en el mismo tipo de sistema pero con distinto volumen de bolsa (288 L).

Es claro a partir del presente estudio que los métodos de tratamiento de agua de mar por ozonificación y pasteurización fueron comparables y adecuados para su uso en cultivos continuos microalgales. La aparición de protozoarios no se debió al método o al sistema de cultivo. Primordialmente se sospecha de una deficiente filtración del agua de mar antes de recibir su respectivo tratamiento y/o un deficiente mantenimiento la limpieza de tuberías (vaporización) ya que es la manera de eliminar fuentes de contaminación dentro del sistema. De ello depende directamente el tiempo de vida de estas bolsas, generalmente es de 1-2 meses, sin embargo pueden durar hasta 3-4 meses (Jacobsen et al., 2010, García-Esquivel, com. pers. Lab. Biotecnología de Moluscos, IIO-UABC). Por lo tanto el uso del ozono como método de tratamiento de agua mar resulta ser una alternativa muy prometedora debido a su eficiencia en cuanto a la eliminación de bacterias heterótrofas y tipo *Vibrio*, así como la facilidad de operación del sistema de ozono.

5. CONCLUSIONES

La calidad del agua de mar filtrada y tratada con ozono fue similar a la calidad de agua de mar filtrada y pasteurizada y mejor que el control de agua de mar filtrada, en sistemas experimentales de producción continua.

Tanto la ozonificación como la pasteurización inhibieron el crecimiento de bacterias tipo *Vibrio* en agua de mar y bolsas de cultivo, y mantuvieron niveles bajos de bacterias heterótrofas marinas.

Las microalgas cultivadas en agua tratada con ozono o pasteurización alcanzaron densidades máximas entre 4 y 4 millones de cél mL⁻¹, y tardaron 18 días en contaminarse por protozoarios, mientras que el control se contaminó al 5^{to} día.

La tasa de crecimiento específica de *Isochrysis sp* (clon T-ISO) se mantuvo alrededor de 0.15 durante la fase estacionaria y coincidió con el valor del factor de dilución aplicado al sistema de producción continua.

La ozonificación representa un método alternativo de bajo costo que potencialmente podría sustituir la pasteurización en sistemas de cultivo continuo tipo Seacaps.

6. RECOMENDACIONES

Probar distintos factores de dilución (FD) a lo largo del año con el fin de obtener un FD dinámico apropiado para cada condición estacional.

Probar con otras especies de microalgas de interés acuícola en este sistema de producción continua.

Realizar un análisis de costo beneficio de este sistema y compararlo con los sistemas tradicionales.

7. LITERATURA CITADA

Andersen, R. A. 2005. Algal culturing techniques. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press. pp 271-273.

Anzueto-Sanchez, M. A. (2008). Evaluacion del cultivo continuo de tres especies microalgales. Centro de Investigacion Cientifica y de Educacion Superior de Ensenada.

Bocci, V.A. (2006), "Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art.", Archives of medical research, Vol. 37 No. 4, pp. 425–35.

Brown, M. R., y Hohmann, S. (2002). Effects of irradiance and growth phase on the ascorbic acid content of *Isochrysis* sp . T . ISO (Prymnesiophyta). Journal of Applied Phycology, (14), 211–214.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. y Dunstan, C. A.1993. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture., 151:315-331.

Colberg, P. J., Lingg, A. J., 1978. Effect of ozonation on microbial fish pathogens, ammonia, nitrate, nitrite, and BOD in simulated reuse hatchery water. J. Fish. Res. Board Can., 35, 1290-1296.

Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J. M., Flores-Cotera, L. B., y Cañizares-Villanueva, R. O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Interciencia, 28, 450–456.

Duerr, E., A. Molnar., y V. Sato. 1998. Culture microalgae as aquaculture feeds. *Journal Marine Biotechnology*, 7:65-70.

Falinski Anne K (2009) Effects of different aeration conditions on *Isochrysis galbana* (t-iso) ccmp 1324 in a bench-scale photobioreactor. Thesis of Master of Science.

Fernández-Reiriz, M.J., A. Pérez-Camacho, M. J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M. J. Campos y U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83: 17-37.

Gensemer, R. W. (n.d.). Toxicity of Ozonated Seawater to Marine Organisms Submitted to *Environmental Chemistry and Toxicology*.

Grima, E. M., Camacho, F. G., Perez, J. a S., Fernndez, F. G. A., y Sevilla, J. M. F. (1997). Growth yield determination in a chemostat culture of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 8(6), 529–534.

Grobbelaar J U, (2000). Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *J. Appl. Phycol.* 12: 201-206.

Guillard, R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Preess, N.Y. p. 29-59.

- Jacobsen, A., Grahl-Nielsen, O., y Magnesen, T. (2010). Does a large-scale continuous algal production system provide a stable supply of fatty acids to bivalve hatcheries? *Journal of Applied Phycology*, 22(6), 769–777.
- Jacobsen, A., Grahl-Nielsen, O. y Magnesen, T. (2012), “Effects of reduced diameter of bag cultures on content of essential fatty acids and cell density in a continuous algal production system.”, *Journal of applied phycology*, Vol. 24 No. 1, pp. 109–116.
- Kaplan, D., Cohen, Z., y Abeliovich, A. (1986). Optimal growth characteristics for *Isochrysis galbana*. *Biomass*, 9, 37-48.
- Karnik, B.S., Davies, S.H., Baumann, M.J. y Masten, S.J. (2005), “The effects of combined ozonation and filtration on disinfection by-product formation.”, *Water research*, Vol. 39 No. 13, pp. 2839–50. doi:10.1016/j.watres.2005.04.073
- Lemus, N., Urbano, T., Arredondo Vega, B., Guevara, M., Vasquez, A., Carreon Paula, L., y Vallejo, N. (2006). Growth and biochemical profile of *Chaetoceros muelleri*. *Ciencias Marinas*, 32, 597–603.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Le Dean, L., Mégrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., Olivo, E. (2012). Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*, 326-329, 106–115.

- Muller-Feuga A, J. Moal y R. Kaas. 2003. The Microalgae of Aquaculture. En: Live Feeds in Marine Aquaculture. Josianne G. Stottrup y Lesley A. McEvoy. Blackwll Science Ltd. 2003 USA. 518 p.
- Nagata, T. 2000. Production Mechanisms of Dissolved Organic Matter. En: Microbial Ecology of the Oceans. D. Kirchman (ed.), New York, 85-120
- Oppenheimer, C. H., y C. E. Zobell. 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J. Marine Res. 11:10-18.
- Park, J., Kim, P.-K., Lim, T., y Daniels, H. V. (2013). Ozonation in Seawater Recirculating Systems for Black Seabream *Acanthopagrus schlegelii* (Bleeker): Effects on Solids, Bacteria, Water Clarity, and Color. Aquacultural Engineering, (2010).
- Park, J., Kim, Y., Kim, P., y Daniels, H. V. (2011). Aquacultural Engineering Effects of two different ozone doses on seawater recirculating systems for black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker): Removal of solids and bacteria by foam fractionation. Aquacultural Engineering, 44(1), 19–24.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., y Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquaculture International, 15(1), 1–9.

- Perrins, J. C. y R. P. H. (2003). Ozone Treatment of Seawater Mesocosm Experiments: Bacterial Community Enumeration with Flow Cytometry, 98195.
- Richmond, A., 1988. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science. 566 p.
- Richmond, A. y Zhang, C. W. (2003). Sustainable, high-yielding outdoor mass cultures of *Chaetoceros muelleri* var. *subsalsum* and *Isochrysis galbana* in vertical plate reactors. Marine biotechnology New York NY, 5(3), 302–310.
- Ritar, A. J., Smith, G. G., Thomas, C. W., 2006. Ozonation of seawater improves the survival of larval southern rock lobster, *Jasus edwardsii* in culture from egg to juvenile. Aquacult. 261, 1014-1025.
- Sahul Hameed, A.S., G. Balasubramanian (2000). Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. Aquaculture. 183: 195-205.
- Salvesen, I., Reitan, K. I., y Skjermo, J. (2000). Microbial environments in marine larviculture: Impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. Aquaculture International, 275–287.
- Sherr, E. y Sherr, B. 2000. Marine Microbes. Analysis Overview. En: Microbial Ecology of the Oceans. D.L. Kirchman (ed.), Wiley-Liss Inc. 542 p.

- Sharrer, M. J., y Summerfelt, S. T. (2007). Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. *Aquacultural Engineering*, 37(2), 180–191.
- Sugita, H., Asai, T., Hayashi, K., Mitsuya, T., Amanuma, K., Maruyama, C., Deguchi, Y., 1992. Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscicida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4072-4075.
- Tango, M. S., y Gagnon, G. a. (2003). Impact of ozonation on water quality in marine recirculation systems. *Aquacultural Engineering*, 29(3-4), 125–137.
- Tempest, D. W. 1970. Continuous cultivation of micro-organisms. In: Norris, J. R., and Ribbons, D. W. (Eds). *Methods in microbiology*. Academic Press New York and London. 261-263 p
- Tzovenis, I., Pauw, N. De, y Sorgeloos, P. (2003). Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I . Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture*, 216(1-4), 203–222.
- Walne, P. R. 1966. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery Invest. Min. Agric. Fish. Series 2*, 24(4): 8.
- Whyte, J. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231-241.