



INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

# INFORME

ISSN 0378-7702

Volumen 43, Número especial

## Manual para la producción de microalgas marinas



Octubre 2017

Callao, Perú



# MANUAL PARA LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS MARINAS

## MANUAL FOR THE PRODUCTION OF MARINE MICROALGAE

Gheraldine Ynga\*, Alexander Niño

### RESUMEN

Ynga G, Niño A. 2016. *Manual para la producción de microalgas marinas*. Inf Inst Mar, Per. Inf. 43(especial): 000-000.- El presente manual ha sido elaborado por el Laboratorio de Cultivo de Microalgas perteneciente al Área Funcional de Investigaciones en Acuicultura del INSTITUTO DEL MAR DEL PERU (IMARPE), dentro de las actividades del Proyecto Estudio de la Calidad del Alimento Vivo del PpR. Se describen aspectos generales de las microalgas; mencionando las principales características del grupo, así como la potencialidad de su uso en distintas industrias. Así mismo, se hace mención de los principales parámetros fisicoquímicos en el desarrollo de los cultivos, la preparación de medios de cultivo. Como verificación de la calidad y buen estado de los cultivos se describen las técnicas de cuantificación celular y evaluación de peso seco. Estos cultivos de microalgas marinas son destinados como alimento vivo así como inóculos para la obtención de biomasa. Los procedimientos son aplicados a las especies microalgales: *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloris maculata*, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis contracta*.

PALABRAS CLAVE: microalgas; acuicultura; biomasa; alimento vivo.

### ABSTRACT

Ynga G, Niño A. 2016. *Manual para la producción de microalgas marinas*. Inf Inst Mar, Per. Inf. 43(especial): 000-000. This manual has been developed for Microalgae Cultivation Laboratory belonging to Functional Area of Aquaculture Research of INSTITUTO DEL MAR DEL PERU (IMARPE) within the activities of the Project for Quality Live Food Studies of PpR. The general aspects of microalgae are described; making mention the main characteristics of group as well as the potential use in different industries. Likewise; it is mentioned the main physicochemical parameters are taken into account for the development of the cultures, the preparation of culture medium as a means of quality assurance and good condition of cultures, also the techniques of cellular quantification and evaluation of dry weight are described. These cultures of marine microalgae are intended as live food as well as inoculum for biomass obtaining. The procedures are applied to different microalgal species like: *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloris maculata*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis contracta*.

KEYWORDS: microalgae; aquaculture; biomass; live food.

### PRESENTACIÓN

Entre los factores que limitan la acuicultura está la alimentación, que demanda con organismos que sean adecuados para la ingestión, tal es el caso de algunos moluscos que pueden ser alimentados con microalgas, mientras que larvas de peces y crustáceos generalmente necesitan de otros organismos vivos que satisfagan su comportamiento de captura. Por lo tanto, surge el desarrollo de cultivos auxiliares como el de microalgas cuyo cultivo debe realizarse bajo condiciones de calidad a fin de sostener el cultivo de otras especies.

El propósito de este manual es dar a conocer y describir las metodologías y procedimientos llevados a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Microalgas del Instituto del Mar del Perú, para la producción de microalgas marinas destinada como alimento vivo y producción de inóculos para la obtención de biomasa microalgal. Los procedimientos fueron utilizados en: *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloris maculata* y *Tetraselmis contracta*, sin embargo, las técnicas y procedimientos presentados aquí, pueden ser usados en el cultivo de cualquier especie de microalga marina.

---

\* gynga@imarpe.gob.pe. Laboratorio de Microalgas, Área Funcional de Investigaciones en Acuicultura, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, Instituto del Mar del Perú

## INTRODUCCIÓN

### ANTECEDENTES

A lo largo de la historia las microalgas han venido siendo aprovechadas, sin embargo no es hasta finales del siglo XX que se inicia su uso en forma industrial (CATALA 2013). En la acuicultura, existe gran interés en la producción de alimento que provea el perfil nutricional adecuado para los organismos y al mismo tiempo que mantengan la calidad del agua dentro de cada unidad de cultivo (CORDOVA 2005). La capacidad que tienen las microalgas de reducir compuestos nitrogenados, elevar la concentración de oxígeno y de contener una considerable variedad de nutrientes, permite su amplio uso como alimento. Son utilizadas principalmente como alimento de moluscos y zooplancton, pero también en la nutrición de etapas tempranas de crustáceos y de peces pequeños (MARCHETTI et al. 2011).

Se han probado dietas alternativas tales como microalgas concentradas, levadura, bacterias o incluso compuestos de sustitución de lípidos como alimentos sustitutos; sin embargo, las microalgas vivas siguen siendo necesarias para la producción de larvas y bivalvos juveniles (MARCHETTI et al. 2011).

Los organismos mas utilizados en la alimentación en *hatcheries* son las microalgas. Sin embargo el proceso es caro, la composición bioquímica es variable y representan el cuello de botella en la producción de moluscos. El cultivo continuo es una alternativa atractiva ya que permite la automatización completa del proceso de producción de microalgas, reduciendo así los costes laborales, manteniendo la calidad de la biomasa microalgal ya que se lleva un control de los parámetros físico-químicos adecuados para el crecimiento de organismos acuáticos (BOROWITZKA 1997).

### MICROALGAS: ASPECTOS GENERALES

Desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga hace referencia a aquellos microorganismos unicelulares o coloniales capaces de realizar fotosíntesis oxigénica; contienen clorofila-a y otros pigmentos fotosintéticos; son microorganismos acuáticos, alimento del zooplancton, gasterópodos, moluscos, larvas de crustáceos y algunos peces; también son utilizados en industrias como la farmacéutica, cosmética, energética y alimentaria; así mismo, las microalgas son usadas en procesos de bioremediación y como filtro biológicos para remover excesos de nutrientes (MADIGAN et al. 2004). Además, cumplen un rol ecológico importante al fijar más del 40% del carbono atmosférico, ofreciendo a la biósfera una considerable proporción de oxígeno. Por otro lado, son organismos de interés como fuente alternativa a los combustibles fósiles tradicionales (producción de biodiesel, biometano, biohidrógeno y bioetanol) (RUIZ MARTÍNEZ 2011).

El potencial de las microalgas es considerable, sobre todo si tenemos en cuenta que existen varios millones, en comparación con alrededor de 250000 especies de plantas terrestres (BRENNAN y OWENDE 2010). Se han descrito hasta el momento 40000 especies de microalgas, pero solo el 1% de estas han sido estudiadas para la obtención de sustancias bioactivas, representando una gran reserva de nuevos compuestos únicos e interesantes (YAMAGUCHI 1997).

Aunque las microalgas son en general organismos fotoautótrofos, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía, según esto, la producción de microalgas se divide en:

- Fotoautótrofa: las algas obtienen la energía el sol y el carbono de compuestos inorgánicos (sales).
- Fotoheterótrofa: obtienen la energía del sol y como fuente de carbono emplean compuestos orgánicos.
- Mixotrófica: muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo obtienen por tanto de compuestos orgánicos y de CO<sub>2</sub>. Algunas de estas algas son la *Spirulina platensis* o la *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Heterótrofa: los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono. Es decir, que son algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz, como por ejemplo *Chlorella protothecoides*.

La composición química de las microalgas (contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable, y puede ser manipulada mediante varios parámetros durante el proceso de su cultivo. Depende obviamente también de la especie considerada. En general, las cianobacterias tienen un contenido de hasta 20% en lípidos, mientras que el contenido lipídico de las algas procariotas oscila entre un 20 y 50% en peso seco.

Las microalgas *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloris maculata* y *Tetraselmis contracta* consideradas en el presente manual son de gran interés en la acuicultura ya que son capaces de acumular diferentes metabolitos de valor nutricional durante el desarrollo larval de otras especies de cultivo.

### CONSIDERACIONES GENERALES DURANTE EL CULTIVO DE MICROALGAS:

Dentro de los factores que determinan la producción microalgal tenemos: radiación, tiempo de retención, turbulencia, oxígeno disuelto y pH; carbono, nitrógeno, fósforo e interacciones bióticas (ÁLVAREZ COBELAS y GALLARDO 1989).



### *Radiación.-*

Durante el cultivo de microorganismos fotoautótrofos es de suma importancia tener en cuenta como un factor limitante al crecimiento celular es la fuente de energía luminosa durante la fotosíntesis, por ejemplo la distribución de la intensidad lumínica debería ser homogénea para lograr una máxima productividad (RUIZ 2008).

Se debe tener en cuenta que la tasa de fotosíntesis celular  $F$  (capacidad de captación de fotones) depende de la energía luminosa que reciben las células. (FLORES et al. 2003). La fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica hasta alcanzar la tasa máxima de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación de la luz, (PARK et al. 2011). Una vez sobrepasado este punto se llega a la fotoinhibición, lo que conlleva a la pérdida de productividad, disminución en la fotosíntesis e incluso la muerte (HERNÁNDEZ y LABBÉ 2014).

Resulta difícil independizar los efectos de la temperatura y la luz sobre el crecimiento masivo de las algas. La capacidad fotosintética, los parámetros de crecimiento y la densidad celular están influenciadas por la luz y la temperatura o la interacción de ambos; en relación a reacciones reguladas por enzimas (PRIETO y CRUZ 2008).

### *Nutrientes.-*

Después del carbono, el nutriente más importante para el desarrollo microalgal es el nitrógeno, que es incorporado como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (HERNÁNDEZ y LABBÉ 2014). Por lo tanto, el nitrógeno es un factor crítico para la regulación de lípidos en las microalgas (PARK et al. 2011). En la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía, el fósforo cumple un rol importante, la deficiencia de este en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones de crecimiento (MARTINEZ 2008).

### *Tiempo de retención.-*

Si el sistema se halla en equilibrio dinámico, el tiempo transcurrido entre cada suministro de nuevo medio de cultivo es el tiempo de retención. Lo ideal es que dicho tiempo sea igual al que las algas precisan para consumir todo el medio de cultivo (ÁLVAREZ COBELAS y GALLARDO 1989).

### *Turbulencia.-*

Un factor importante en los cultivos masivos es la aireación, proceso que produce la oxigenación del cultivo, la homogenización de los nutrientes, el movimiento constante de las células hacia la superficie luminosa con lo cual se optimiza la fotosíntesis, además de aportar  $\text{CO}_2$  para el crecimiento celular (ALVEAL et al. 1995). La agitación también impide la sedimentación; además favorece la producción, puesto que las algas no se encuentran en todo mo-

mento en la superficie y así evitan la fotoinhibición, aprovechándose del efecto optimizador de la radiación intermitente (ÁLVAREZ COBELAS y GALLARDO 1989). Estos efectos benefician el crecimiento y productividad del cultivo.

Sin embargo, el verdadero rol de la agitación en el aumento de la producción algal todavía debe ser evaluado. Se han observado efectos positivos provocados por una intensa agitación sobre la productividad solamente en cultivos algales que se desarrollan en estanques agitados por ruedas de paletas. En biorreactores cerrados, con utilización de bombas, el efecto positivo puede ser enmascarado debido al daño mecánico que sufren las paredes de las células. En biorreactores de columnas de burbujeo, la provisión de aire sirve para el doble propósito de proveer turbulencia y remoción del oxígeno. Así, es más difícil evaluar si la influencia sobre la productividad se debe al grado de turbulencia alcanzado o proviene del bajo contenido de oxígeno disuelto en el medio (ELIACH et al. 2004).

### *Oxígeno disuelto y pH.-*

Durante el día la intensa fotosíntesis en un sistema de cultivo podría conllevar a una saturación de oxígeno por encima del 200%. Así, MOLINA (2001) y PARK (2011) determinaron que a una saturación de oxígeno del 200 y 300% existe una reducción del 17 y 25% en la productividad microalgal (HERNÁNDEZ y LABBÉ 2014).

Otro efecto desfavorable para los cultivos de algas planctónicas, en el cual intervienen la luz y el oxígeno es la fotooxidación. El oxígeno es un elemento tóxico para los organismos, quienes se protegen de él de muy distintas maneras. Las algas utilizan como protección los carotenoides, la superóxido dismutasa y otras moléculas que se combinan con el oxígeno en exceso. Pero, en intensidades luminosas elevadas, sobresaturación de oxígeno y ausencia de dióxido de carbono en el cultivo se produce el fenómeno de fotooxidación que mata las microalgas y puede acabar con el cultivo.

El pH es otro aspecto delicado del cultivo masivo porque la ingestión del carbono inorgánico por las algas aumenta el pH del medio y desplaza el equilibrio hacia los carbonatos. Las algas no usan los carbonatos, con lo cual pueden encontrarse limitadas en su crecimiento por el carbono (ÁLVAREZ COBELAS y GALLARDO 1989).

### *Carbono.-*

La producción de algas puede ser incrementada de varias formas si el cultivo es alimentado con  $\text{CO}_2$  en cantidad suficiente. Las principales fuentes de carbono inorgánico para el cultivo masivo de algas son el dióxido de carbono libre y el bicarbonato. Energéticamente, para las algas resulta más barato el dióxido

de carbono, puesto que penetra en la célula por difusión, mientras que el bicarbonato lo hace por transporte activo. Por ello, cuando se trata de optimizar la producción parece más aconsejable el añadir  $\text{CO}_2$  (ÁLVAREZ COBELAS y GALLARDO 1989). Para una producción masiva, que logre la estabilización del pH y la obtención de un rendimiento máximo, el aporte de  $\text{CO}_2$  soluble debe dosificarse intermitentemente en estaciones de suministro distribuidas equidistantemente en el recipiente de cultivo. La adición de dióxido de carbono gaseoso aumenta el carbono inorgánico total disuelto y disminuye el pH obteniéndose así una eficiente amortiguación y mayores tasas de crecimiento microalgal. Para una reproducción celular de 0.8 divisiones por día, se recomienda usualmente concentraciones de 2.4 mM de carbono inorgánico total disuelto (ALVEAL et al. 1995).

## TECNOLOGÍA DE CULTIVO

### PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Los nutrientes utilizados por las microalgas son sustancias químicas que se deben agregar al agua de mar a fin de cubrir sus requerimientos nutricionales asegurando de esta manera el crecimiento óptimo. El buen desarrollo de las microalgas se logra conociendo los nutrientes en deficiencia y suplementándolos en los medio de cultivo.

#### *Materiales, equipos y reactivos.-*

- Botellas de borosilicato de 1L
- Espátulas
- Picetas
- Lunas de reloj
- Balanza analítica KERN ABJ
- Autoclave Lavoklav
- Agua destilada
- Reactivos (Tabla 1)

#### *Preparación de los stocks.-*

Previamente a la preparación de los reactivos se debe tener en cuenta que los materiales a usar deben estar esterilizados y secos.

Cada uno de los reactivos (R1, R2, R3 y R4) se preparan por separado pesando cada uno de los compuestos y disueltos en 500 mL de agua destilada; enrazar a un litro.

Mantenerlos en frascos de vidrio (en caso del R3 debe mantenerse en frasco oscuro), refrigerados y etiquetados.

### TRATAMIENTO DEL AGUA DE MAR

Teniendo en cuenta que el agua de mar contiene diversos organismos y compuestos orgánicos que producen variación en su calidad y concentración

de nutrientes, su uso directo para el cultivo de microalgas no es recomendable. Debido a esto, se hacen necesarios tratamientos previos como filtración, esterilización y adición de nutrientes, a fin de mejorar y/o mantener los requerimientos mínimos necesarios para el desarrollo adecuado de los cultivos.

De acuerdo al nivel de cultivo los tratamientos pueden variar; entre ellos tenemos la filtración, la radiación ultravioleta y los métodos químicos.

#### *Materiales, equipos y reactivos.-*

Bomba de agua, tanques de almacenamiento, filtro de cartucho de 1, 5 y 10  $\mu\text{m}$ , botellas de borosilicato, bomba de vacío y equipo de filtración (Figura 1), autoclave filtros tipo talega de 1  $\mu\text{m}$ , sistema de esterilización UV.

#### *Procedimiento.-*

El agua de mar se obtiene de la zona costera adyacente al Laboratorio de Cultivo de Microalgas del IMARPE mediante bombeo, se hace pasar por filtros rápidos de arena para separar material particulado y el agua filtrada se almacena en reservorios de concreto o de fibra de vidrio.

El agua filtrada es bombeada al laboratorio de microalgas, donde es tratada con filtros CUNO® de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ . Posteriormente es pasada a través de una unidad equipada con luz ultravioleta para desinfección o atenuación de los microorganismos que no fueron retenidos por el filtro. El agua es almacenada

Tabla 1.- Composición del medio Guillard (F/2)

R1: Macronutrientes	
	g/L
$\text{KNO}_3$	75
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	5.65
R2: Micronutrientes	
EDTA $\text{Na}_2$	4.36
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15
$\text{CuSO}_4$	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.010
$\text{MnCl}_2 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$	0.18
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.06
R3: Vitaminas	
Cianocobalamina	0.002
Tiamina HCl	0.10
Biotina	0.01
R4: Silicatos	
HCl	5 mL
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 mL

en tanques para lograr una mayor sedimentación (envejecer el agua).

Para los cultivos en volúmenes de 0.5 a 1 L, utilice agua envejecida y esterilizada con radiación UV, filtre a 0.45  $\mu$ m y autoclave por 10 minutos a una temperatura de 105 °C, deje enfriar hasta el inicio de la siembra (Figura 2). A estos volúmenes se hace uso del medio modificado Guillard en una proporción de 1 mL por cada litro de cultivo microalgal.

Para cultivos en volúmenes mayores de 7 litros, debe usarse agua de mar filtrada a 1  $\mu$ , esterilizada con radiación UV y tratada con hipoclorito de sodio al 2.8% (1 mL de hipoclorito/L de agua) por 24 horas en las que se debe mantener bajo aireación constante (Figura 3). Posteriormente se añade tiosulfato de sodio al 24.8% (0.5mL/L agua) una hora antes de la siembra para eliminar restos de cloro.

De ser necesario usar un determinador de cloro con la finalidad de evaluar la presencia de algún resto de cloro antes de la siembra. El nutriente usado es Byfoland® en una proporción de 0.07 mL por litro de cultivo.

#### *Preparación del hipoclorito de sodio al (2.18%)*

El volumen final obtenido es de 2 litros de solución; para ello:

- Verter 850 mL de hipoclorito de sodio comercial al (4.9%) en una jarra de 2L de capacidad.
- Enrasar con agua destilada a 2L.
- Mantener la solución final de hipoclorito de sodio al (2.18%) en una botella color ámbar y a temperatura ambiente.

#### *Preparación de tiosulfato de sodio al (28.1%)*

- El volumen final de la solución es de un litro; para ello:
- Pesar 248.2 g de tiosulfato de sodio pentahidratado.
- Disolver el tiosulfato de sodio pentahidratado en 1 L de agua destilada.
- Mantener la solución de tiosulfato de sodio al 28.1% en refrigeración.

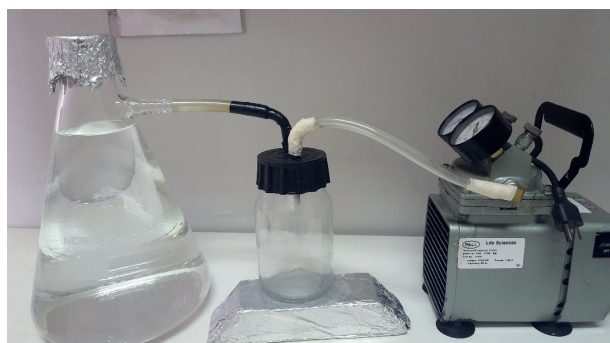


Figura 1: Sistema de filtración: bomba de vacío y equipo de filtración



Figura 2: Agua de mar filtrada y autoclavada hasta 0.45 micras.



Figura 3: Tratamiento del agua de mar con hipoclorito de sodio y tiosulfato de sodio mantenidos bajo aireación constante.



### FLUJO DE CULTIVO MICROALGAL

El proceso de cultivo de peces demanda una serie de subprocesos, así por ejemplo, surge la necesidad de contar con alimento para el periodo de desarrollo larval de los peces, este alimento debe proveerse de un laboratorio de cultivo de microalgas. Para dar inicio al cultivo masivo de microalgas es necesario contar con laboratorios que hagan las veces de proveedores de inóculos y que en forma constante tenga la capacidad de entregar cultivos de calidad.

#### *Materiales, equipos y reactivos.-*

- Matraces de 0.5 y 1 litro
- Botellas plásticas de 7 y 20 L
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 mL
- Tapones de jebe para envases de 0.5, 1. 7 y 20L
- Palitos de globo
- Cámara de flujo laminar ESCO – LHC-6A3
- Botellas de vidrio borosilicato
- Mechero
- Paneles de luz

#### *Procedimiento.-*

##### Acondicionamiento de inóculos:

Solicitar las cepas al Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos en matraces de 250 mL, y mantenerlos durante 24 horas bajo las condiciones de temperatura e intensidad lumínica del laboratorio para su adaptación (Figura 4).

##### *Cultivo bajo condiciones controladas:*

A este nivel se mantienen constante la temperatura: 19 °C, e intensidad lumínica entre 1000 y 3000 lx, los cultivos se mantienen bajos aireación constante e inyección de CO<sub>2</sub> (manteniendo el pH entre 7 y 7.5).

El cultivo a este nivel es de tipo batch. Para los volúmenes de 0.5 y 1 L el desarrollo de la siembra se realiza dentro de la campana de flujo laminar. Colocar el número necesario de matraces de ambos volúmenes antes mencionados y añadir el agua previamente tratada 300 y 800 mL para los matraces de 0.5 y 1 L respectivamente. Añadir cada uno de los reactivos stocks del Medio Guillard en una proporción de 1 mL por cada litro de cultivo. Esterilizar con UV por 16 minutos (Figura 5).

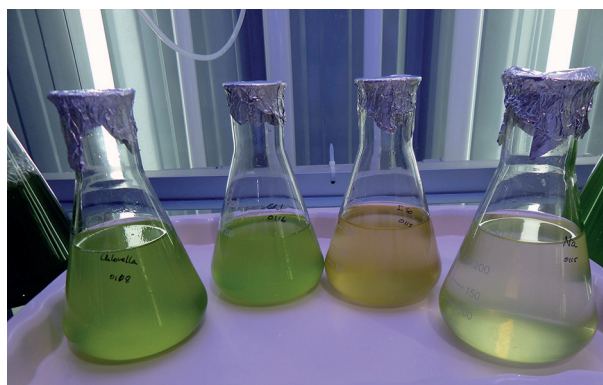


Figura 4: Acondicionamiento de cepas en el laboratorio



Figura 5: Uso de la cámara de flujo laminar para la nutrición y esterilización de matraces previa a la siembra microalgal





Figura 6: Adición de nutriente bayfoland al agua previamente tratada con hipoclorito de sodio y tiosulfato.

Para los cultivos mayores a 7 L, añade 0.07 mL/L del nutriente agrícola Byfoland® utilizando una pipeta volumétrica (Figura 6).

Agregue un inóculo del cultivo microalgal, el mismo que variará según el volumen a cultivar. Para volúmenes de 0.5 y 1 L, el inóculo será de 200 mL; para botellas de 7 L, el inóculo será de 1 L; para 20 L será de 7 L y para tanques de 250 L el volumen del inóculo será de 80 L. Tener en cuenta Tabla 2 (Figura 7).

#### CUANTIFICACIÓN CELULAR

La determinación de la densidad celular se realiza bajo un microscopio utilizando un hematocitometro o cámara de Neubauer. Estos datos permitirán calcular el volumen de alimento que se le suministrará a las larvas. Así mismo, nos permite evaluar la condición de los cultivos microalgales, determinando la presencia de contaminantes en los cultivos, parámetros poblacionales como la tasa de incremento poblacional, expresada frecuentemente como la tasa de división celular.

#### Materiales, equipos y reactivos:

- Microscopio binocular Leica
- Cámara de Neubauer
- Lugol
- Pipetas
- Viales

- Papel toalla

#### Procedimiento:

- Tome la muestra (2 – 3 mL) en un vial y fijarla con una gota de lugol.
- Coloque la muestra en la cámara de Neubauer y lleve al microscopio (Figura 8).
- Realice el conteo en el cuadrante central y en línea diagonal para el caso de microalgas menores a 6  $\mu$  y los cuadrantes externos para el caso de microalgas mayores a 6  $\mu$ .
- Realice el conteo por triplicado.

Obtenga el promedio y lleve los datos a las fórmulas:

Células menores a 6 $\mu$

$$N_a = (\sum Cel. C_a / 5) * 250000$$

Tabla 2.- Proporciones de inóculos por nivel de cultivo

Volumen Inóculo (L)	Volumen Final (L)
0.25	0.5
0.2	1
1	7
7	20
80	250

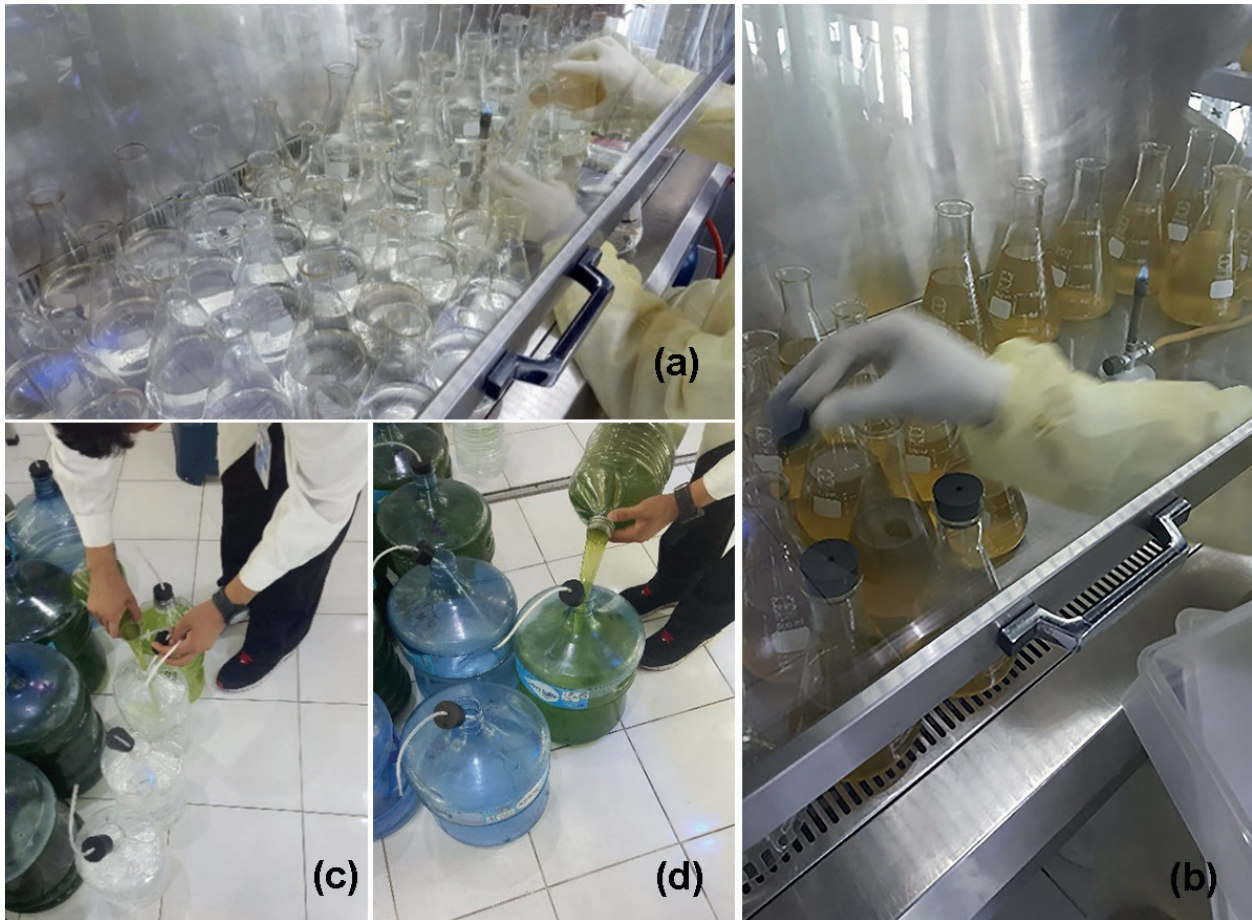


Figura 7: Inoculación de cultivo en los distintos niveles de cultivo: (a) y (b) matraces de 0.5 y 1L, (c) botellas de 7 litros y (d) sembrado en botellas de 20 litros.

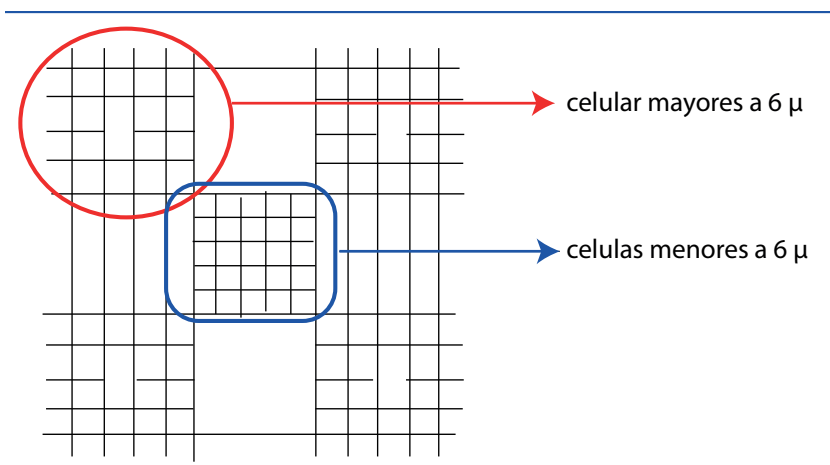


Figura 8: Ubicación de las áreas de conteo en cámara de Neubauer de acuerdo al tamaño de las células microalgales

Células mayores a  $6\mu$

$$N_b = (\sum \text{Cel. } C_b / 4) * 10000$$

Dónde:

$N_a$  y  $N_b$ : Número de células.

$\sum \text{Cel. } C_a$ : Suma de células de la diagonal central de la cámara de Neubauer

$\sum \text{Cel. } C_b$ : Suma de células de los cuadrantes externos de la cámara de Neubauer

*Curva y tasa de crecimiento:*

Luego de cinco días de cultivo se realiza la curva de crecimiento y se determina la tasa de crecimiento celular según la siguiente fórmula.

$$K = (1/C_f) * (\Delta C_f / \Delta t)$$

Donde:

$K$  = Tasa de Crecimiento

$C_f$  = Concentración celular final

$\Delta C_f$  = Variación de la concentración celular (Concentración final – Concentración inicial)

$\Delta t$  = Variación de tiempo (Tiempo final – Tiempo inicial)

#### DETERMINACIÓN DEL PESO SECO

La determinación de peso seco nos permite determinar la biomasa de los cultivos, expresado como peso seco. Se asume que los cultivos a evaluar estarán contenidos únicamente por una especie de microalga.

*Materiales, equipos y reactivos:*

- Estufa
- Filtros de fibra de vidrio GF/F de 2.5 cm
- Bomba de vacío PALL
- Desecador
- Balanza analítica KERN ABJ
- Pinzas
- Pipetas
- Propipeta
- Formiato de amonio
- Placas Petri
- Papel aluminio.

*Procedimiento:*

- Dentro de la placa petri colocar un lamina de papel platino (para evitar que la muestra se pegue) y el filtro GF/F, y luego llevarlas a la estufa por 4 h a 80 °C. Una vez transcurrido este tiempo, colocarlos en el deshumecedor hasta que alcance la temperatura ambiente (25 min. como mínimo) y pese (repita el procesos de pesado por triplicado observando la constancia del peso).

- Coloque el filtro sobre soporte de filtración utilizando una pinza y filtre 5 mL de microalgas.
- Elimine la presencia de sales en el filtro lavándolo con 2 mL de formiato de amonio al 3%.
- Coloque el filtro con muestra en la placa Petri y póngalo en la estufa por 4 h a 80 °C.
- Coloque la placa en deshumecedor por 25 minutos y luego pese el filtro con la muestra y llevar el resultado a la siguiente formula.

Una vez obtenido el peso seco llevar el resultado al volumen de 1 L.

$$Ps = Fm - Fs$$

Dónde:

$Ps$ : Peso seco de microalga

$Fm$ : Filtro con muestra filtrada

$Fs$ : Filtro solo

#### EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS CULTIVOS:

La síntesis continua de materia orgánica por el fitoplancton depende de una serie de condiciones bióticas y abióticas. Los factores que modulan la productividad primaria de forma general deben ser monitoreados a fin de mantener la calidad de los cultivos.

*Materiales, equipos y reactivos.-*

- Multiparámetro WTW
- Luxómetro
- Termómetro ambiental
- Soluciones de calibración (Buffer)
- Agua destilada.

*Procedimiento.-*

Diariamente se registra la temperatura e intensidad lumínica de la sala las mismas que deben mantenerse en un rango entre 18 – 20 °C y 1000 – 3000 lx.

Luego de haber realizado el sembrado (medio nutrido e inoculado), mantenga el cultivo por un periodo entre 72 a 96 h, posterior a este periodo se determinan los parámetros físico-químicos (temperatura, OD, pH y salinidad) y se apuntan el formato LCM / F-10.02 – A. Posteriormente estos datos son registrados en una hoja de cálculo.

#### REFERENCIAS

- ÁLVAREZ COBELAS COBELAS M, GALLARDO T. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las Algas. Bot. Comptensis 15: 9-60
- ALVEAL K, FERRARIO ME, OLIVEIRA EC, SAR EA (Editores). 1995. Manual de métodos ficológicos. Concepción, Chile: Universidad de Concepción. 863 p.
- ARREDONDO O. y VOLTOLINA D. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del noreste. La Paz, Baja California Sur.



- AVALOS P. 2004. Diseño, implementación y evaluación de un fotobiorreactor tubular para el cultivo de *Isochrysis galbana*. Memoria para optar Título de Ingeniero en Acuicultura Universidad Católica del Norte. Coquimbo- Chile
- BRENNAN L y OWENDE P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14: 557-577.
- BOROWITZKA M. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. Journal of Applied Phycology. 9: 393-401
- CATALA L. 2013. Contribución al estudio del crecimiento y a las posibilidades del aprovechamiento térmico de las microalgas *Nannochloropsis gaditana* y *Nannochloropsis oculata*. Universidad de Alicante.
- FLORES CC, PEÑA-CASTRO JM, FLORES-COTERA LB, CAÑIZARES-VILLANUEVA RO. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Interciencia 28:450-456.
- ELIACH J, BOURGES G, DURÉ L, MEDINA M, LARA M. 2004. Incidencia de la Agitación en el Crecimiento Microalgal en Biorreactores. Reporte Técnico RT-ID-015/2004. Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura Universidad Nacional de Rosario. Argentina
- HERNÁNDEZ A y LABBÉ J. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología marina y Oceanografía. Vol. 49, N°2: 157-173
- MADIGAN, M., J. MARTINKO y J. PARKER. 2004. Brock, Biología de los microorganismos. 10a Edición. Prentice Hall. 1089p.
- MARCHETTI J, BOUGARAN G., LE DEAN L., MÉGRIER C., LUKOMSKA E., KAAS R., OLIVO E., BARON R., ROBERT R. y CADORET J. 2012. Optimizing conditions for the continuous culture to *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. Aquaculture. Vol 326-329. Pag. 106-115.
- PARK C y SHILTON A. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technology 102: 35-42.
- PRIETO A y CRUZ A. 2008. Influencia de la intensidad luminosa sobre el crecimiento de dos cepas de *Dunaliella salina* aisladas de Salinas Venezolanas. Postgrado Biología Aplicada, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. Tecnociencia Vol. 10 N° 1.
- RUIZ MARTÍNEZ A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Tesis para el Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. 102 pp.
- RUIZ A. 2008. Remoción de nutrientes de agua residuales urbanas por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en cultivos libres e Inmovilizados. México
- SCOTT SA, DAVEY MP, DENNIS JS, HORST I, HOWE CJ, LEA-SMITH DJ, SMITH AG. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotechnology 21:277-286.
- YAMAGUCHI K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. Journal of Applied Phycology, 8, 487-502.

**ANEXOS 1: FORMATO CONTROL DE TEMPERATURA AMBIENTAL: LCM/ F-10.02 – A<sub>1</sub>**

CONTROL DE TEMPERATURA AMBIENTAL ( °C)																		
FECHA	8:00 AM						12:00 PM						16:00:00					
	A (*)		B (*)		C (*)		A (*)		B (*)		C (*)		A (*)		B (*)		C (*)	
	T° Max	T° Min	T° Max	T° Min	T° Max	T° Min	T° Max	T° Min	T° Max	T° Min	T° Max	T° Min	T° Max	T° Min	T° Max	T° Min	T° Max	T° Min

**ANEXOS 2: FORMATO CONTROL DE INTENSIDAD LUMÍNICA: LCM/ F- 10.02 – A<sub>2</sub>**

CONTROL DE LA INTENSIDAD LUMÍNICA (Lux)																	
FECHA	HORA	A (*)				B (*)				C (*)				D (*)			
		p1	p2	p3	p4	p1	p2	p3	p4	p1	p2	p3	p4	p1	p2	p3	p4

**ANEXOS 3: FORMATO CONTROL DE PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS EN CULTIVO: LCM/ F-10.02 – A<sub>3</sub>**

CONTROL DE PARAMETROS FÍSICO-QUIMICOS DEL CULTIVO																				
A(*)								B(*)								C(*)				
0,5L					1L				7L				20L				250L			
FECHA	pH	O <sub>2</sub> (mg/L)	T° (°C)	Sal. (ppm)	pH	O2 (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)	pH	O2 (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)	pH	O2 (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)	pH	O2 (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)

**ANEXOS 4: FORMATO CONTROL CAPACIDAD DE CARGA y PRODUCTIVIDAD DE LOS CULTIVOS: LCM / F-10.02 – A4**

CONTROL DE LA CAPACIDAD DE CARGA PARA MICROALGAS MENORES A 6 $\mu$										
Fecha de conteo	Conteo	Primer (*)	Segundo (*)	Tercer (*)	Cuarto (*)	Quinto (*)	Sumatoria	Promedio	Fórmula N <sub>a</sub>	Nº Cel /mL x 10 <sup>7</sup>
	1º									
	2º									
	3º									
	1º									
	2º									
	3º									

(\*): Cuadrantes de la cámara de Neubauer; 1º, 2º y 3º: Número de repeticiones del conteo.

CONTROL DE LA CAPACIDAD DE CARGA PARA MICROALGAS MAYORES A 6 $\mu$										
Fecha de conteo	Conteo	Primer (*)	Segundo (*)	Tercer (*)	Cuarto (*)	Quinto (*)	Sumatoria	Promedio	Fórmula N <sub>b</sub>	Nº Cel /mL x 10 <sup>6</sup>
	1º									
	2º									
	3º									
	1º									
	2º									
	3º									

(\*): Cuadrantes de la cámara de Neubauer; 1º, 2º y 3º: Número de repeticiones del conteo.

CONTROL DE LA PRODUCTIVIDAD MICROALGAL				
	Pf (g)	Pt (g)	Prod.x Vol muestra (g)	Prod x L
1º				
2º				
3º				

Pf: Peso filtro solo