

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

INFORME

ISSN 0378-7702

Volumen 46, Número 1



Enero - Marzo 2019
Callao, Perú



MANUAL PARA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS MARINAS EN EL INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

HANDBOOK OF MARINE MICROALGAE PRODUCTION AT THE INSTITUTO DEL MAR DEL PERU

Gheraldine Ynga¹

Alexander Niño

RESUMEN

YNGA G, NIÑO A. 2019. *Manual para producción de microalgas marinas en el Instituto del Mar del Perú. Inf Inst Mar Perú. 46(1): 5-16.*- En este manual se describen aspectos generales y principales características de las microalgas, las más relevantes propiedades del grupo y sus potenciales usos en distintas industrias. Los valores de parámetros fisicoquímicos en el desarrollo de los cultivos y la preparación de medios de cultivo son detallados. Además, se describen las técnicas de cuantificación celular y evaluación de peso seco. Los cultivos de microalgas marinas en laboratorio se destinan como inóculos para obtención de biomasa y como alimento vivo. Los procedimientos se aplicaron a las especies: *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloris maculata*, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis contracta*.

PALABRAS CLAVE: microalgas, acuicultura, biomasa, alimento vivo

ABSTRACT

YNGA G, NIÑO A. 2019. *Handbook of marine microalgae production at the Instituto del Mar del Peru. Inf Inst Mar Peru. 46(1): 5-16.*- This guide describes general aspects and main characteristics of microalgae culture. We describe in detail the values of physicochemical parameters in the development of crops, the preparation of culture media, cell quantification and dry weight assessment techniques. These cultures, are destined as inoculums for obtaining biomass and as live food. The procedures were applied to the following species: *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloris maculata*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis contracta*.

KEYWORDS: microalgae, aquaculture, biomass, live food

1. INTRODUCCIÓN

Entre los factores que limitan la acuicultura está la alimentación, que debe realizarse 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. Ante estos requerimientos surgió el desarrollo de cultivos auxiliares como el de microalgas que debe realizarse bajo estrictas condiciones de calidad para sostener el cultivo de otras especies.

El propósito de este manual es dar a conocer y describir metodologías y procedimientos desarrollados en el Laboratorio de Cultivo de Microalgas del Instituto del Mar del Perú, dentro de las actividades del Proyecto Estudio de la Calidad del Alimento Vivo del PpR, para la producción de microalgas marinas como alimento vivo e inóculos para la obtención de biomasa microalgal. Los procedimientos

se aplicaron a *Isochrysis galbana* Parke, 1949, *Nannochloropsis oceanica* Suda y Miyashita 2002, *Nannochloris maculata* R. W. Butcher, 1952 y *Tetraselmis contracta* Butcher, 1959; sin embargo, las técnicas y procedimientos pueden ser usados en el cultivo de cualquier especie de microalga marina.

Generalidades

Las microalgas han sido aprovechadas a lo largo de la historia de la humanidad pero a fines del siglo XX se inicia su uso en forma industrial (CATALÁ 2013).

En la acuicultura, existe interés en la producción de alimento que provea el perfil nutricional adecuado para los organismos y al mismo tiempo que mantenga la calidad del agua dentro de cada unidad de cultivo (PRIETO *et al.* 2005). La capacidad que tienen las microalgas de reducir compuestos nitrogenados, elevar la concentración de oxígeno y contener variedad de nutrientes, permite su uso como alimento.

¹ Laboratorio de Microalgas, Área Funcional de Investigaciones en Acuicultura, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, Instituto del Mar del Perú. gynga@imarpe.gob.pe

Principalmente sirven como alimento de moluscos y zooplancton, pero también en la nutrición de etapas tempranas de crustáceos y de peces pequeños. Se han probado dietas alternativas tales como levadura, bacterias o compuestos de sustitución de lípidos; sin embargo, las microalgas vivas siguen siendo necesarias para la producción de larvas y bivalvos juveniles (MARCHETTI et al. 2012).

El cultivo continuo de microalgas es una alternativa que permite la automatización 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).

Desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga hace referencia a aquellos microorganismos unicelulares, solitarios o coloniales capaces de realizar fotosíntesis oxigénica; contienen clorofila-a y otros pigmentos fotosintéticos; son utilizados en industrias como la farmacéutica, cosmética, energética y alimentaria; también son usadas en procesos de bioremediación y como filtro biológico para remover excesos de nutrientes (MADIGAN et al. 2004). Además, cumplen un rol ecológico al fijar más del 40% del carbono atmosférico. Por otro lado, son organismos de interés como fuente alternativa a los combustibles fósiles tradicionales (producción de biodiesel, biometano, biohidrógeno y bioetanol) (RUÍZ MARTÍNEZ 2011).

El potencial de las microalgas es considerable, si se tiene en cuenta que existen varios millones, en comparación con alrededor de 250.000 especies de plantas terrestres (HERNÁNDEZ y LABBÉ 2014, BRENNAN & OWENDE 2010). Se ha evaluado que son más de 10.000 especies las microalgas existentes y solamente unas 100 se han estudiado (CATALÁ 2013). En los últimos años, las microalgas se han convertido en un objetivo de investigación para encontrar sustancias útiles tales como compuestos bioactivos, pigmentos, compuestos de combustible y otros productos químicos (YAMAGUCHI 1997).

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

Fotoautótrofa: las microalgas obtienen la energía del sol y el carbono de compuestos inorgánicos (sales).

Fotoheterótrofa: obtienen la energía del sol y como fuente de carbono aprovechan compuestos orgánicos.

Mixotrófica: microalgas capaces de crecer bajo procesos autótrofos y heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo obtienen de compuestos orgánicos y de CO₂. Algunas de estas algas son *Spirulina platensis* Geitler, 1925 y *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dangeard, 1888.

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* Krüger, 1894.

La composición química de las microalgas (contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable, y puede ser manipulada durante el proceso de 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 procariontas 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 con valor nutricional durante el desarrollo larval de otras especies de cultivo.

Consideraciones generales durante el cultivo de microalgas

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

Radiación.- Durante el cultivo de microorganismos fotoautótrofos se debe tener en cuenta que un factor limitante al crecimiento es la fuente de energía luminosa durante la fotosíntesis, por lo que la distribución de la intensidad lumínica deberá ser homogénea para lograr una máxima productividad (RUÍZ 2008).

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-PÉREZ 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 con 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 (NH_4^+) (HERNÁNDEZ-PÉREZ y LABBÉ 2014) y 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 (RUIZ MARTÍNEZ 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 y GALLARDO 1989).

Turbulencia.- Un factor importante en cultivos masivos es la aireación, proceso que produce la oxigenación del ámbito, 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 CO_2 para el crecimiento celular (ALVEAL *et al.* 1995). La agitación también impide la sedimentación; “además favorece la producción, puesto que los organismos no se encuentran en todo momento en la superficie y así evitan la fotoinhibición, aprovechándose del efecto optimizador de la radiación intermitente” (ÁLVAREZ y GALLARDO 1989). Estos efectos benefician el crecimiento y productividad del cultivo. Sin embargo, el 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.- HERNÁNDEZ-PÉREZ y LABBÉ 2014, indican que durante el día la intensa fotosíntesis en un sistema de cultivo podría conllevar a una saturación de oxígeno por encima del 200% y al efectuar la revisión de los trabajos de Molina *et al.* (2001) y Park *et al.* (2011) tomaron conocimiento que a una saturación de oxígeno del 200 y 300% existe una reducción del 17 y 25% en la productividad microalgal.

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 (ÁLVAREZ y GALLARDO 1989).

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 y GALLARDO 1989).

Carbono.- La producción de algas puede ser incrementada de varias formas si el cultivo es alimentado con 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 añadir CO₂ (ÁLVAREZ y GALLARDO 1989).

Para una producción masiva, que logre la estabilización del pH y la obtención de un rendimiento máximo, el aporte de CO₂ 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 1 L
- Espátulas
- Pissetas
- Lunas de reloj
- Balanza analítica KERN ABJ
- Autoclave Lavoklav
- Agua destilada
- Reactivos (Tabla 1).

Preparación de stocks.- Previo 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 prepara por separado. Pesar cada uno de los compuestos y disolver en 500 mL de agua destilada; enrasar a un litro.

Mantenerlos en frascos de vidrio (el 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.- Bomba de agua, tanques de almacenamiento, filtro de cartucho de 1, 5 y 10 µm, botellas de borosilicato, bomba de vacío y equipo de filtración (Fig. 1), autoclave, filtros tipo talega de 1 µm, sistema de esterilización UV.

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

R1: Macronutrientes (g/L)	
KNO ₃	75
NaH ₂ PO ₄	5,65
R2: Micronutrientes (g/L)	
EDTA Na ₂	4,36
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15
CuSO ₄	0,01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,010
MnCl ₂ ·14H ₂ O	0,18
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,06
R3: Vitaminas (g/L)	
Cianocobalamina	0,002
Tiamina HCl	0,10
Biotina	0,01
R4: Silicatos (mL)	
HCl	5 mL
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	10 mL



Figura 1.- Equipo de filtración y bomba de vacío

Figura 2.- Botellones de agua de mar filtrada hasta 0,45 μ y autoclavada

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 se bombea al laboratorio de microalgas, donde se trata con filtros CUNO® de 10, 5 y 1 μ m. Después, pasa 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 en tanques para lograr mayor sedimentación (envejecer el agua).

Es recomendable, para los cultivos en volúmenes de 0,5 a 1 L, utilizar agua envejecida y esterilizada con radiación UV, filtrar a 0,45 μ m y autoclavar por 10 minutos a 105 °C, dejar enfriar hasta el inicio de la siembra (Fig. 2). A estos volúmenes se hace uso del medio modificado Guillar 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 μ m, esterilizada con radiación UV y tratada con hipoclorito de sodio al 2,18% (1 mL de hipoclorito/L de agua) por 24 horas en las que se debe mantener bajo aireación constante (Fig. 3). Una hora antes de la siembra, para eliminar restos de cloro, se añade tiosulfato de sodio al 28,1% (0,5 mL/L agua). 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.



Figura 3.- Agua de mar tratada con hipoclorito de sodio y tiosulfato mantenidos bajo aireación constante

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 2 L de capacidad
- Enrasar con agua destilada a 2 L
- 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.

Flujo de cultivo microalgal

El proceso de cultivo de peces demanda una serie de subprocesos, así por ejemplo, es necesario 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 tengan

la capacidad de entregar cultivos de calidad en forma sostenida.

Materiales, equipos

- Matraces de 0,5 y 1 litro
- Botellas plásticas de 7 y 20 L
- Botellas de vidrio borosilicato
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 mL
- Tapones de jebes para envases de 0,5; 1; 7 y 20 L
- Palitos de globo
- Cámara de flujo laminar
- Mechero
- Paneles de luz.

Procedimiento

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

Cultivo bajo condiciones controladas.- A este nivel se mantiene constante la temperatura en 19 °C e intensidad lumínica entre 1000 y 3000 lx. Los cultivos se mantienen bajo aireación constante e inyección de CO₂ (manteniendo el pH entre 7 y 7,5).

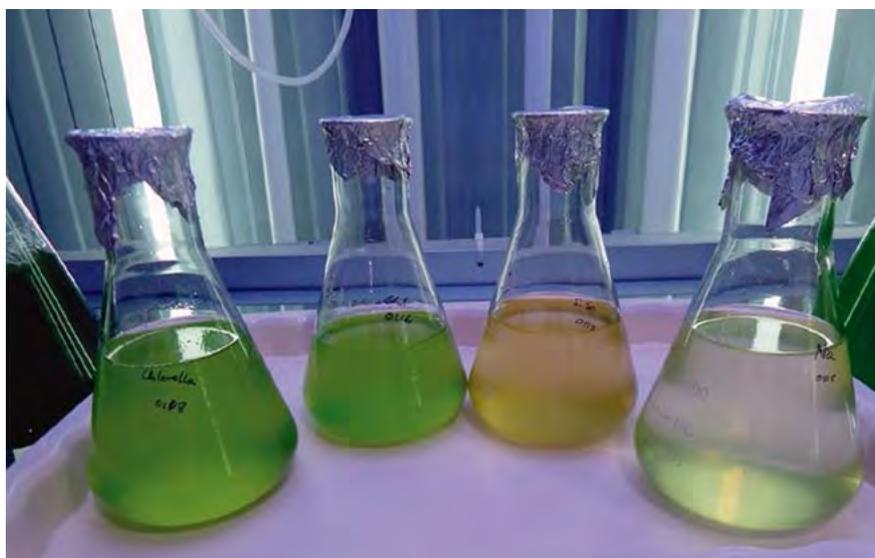


Figura 4.- Acondicionamiento de cepas en el laboratorio

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 (R4 usado únicamente para diatomeas). Esterilizar con UV por 16 minutos (Fig. 5).

Para los cultivos mayores a 7 L, añadir 0,07 mL/L del nutriente Byfoland® utilizando una pipeta volumétrica (Fig. 6).



Figura 5.- Uso de la cámara de flujo laminar para la nutrición y esterilización de matraces previo siembra de microalgas



Figura 6.- Adición de nutrientes al agua previamente tratada con hipoclorito de sodio y tiosulfato

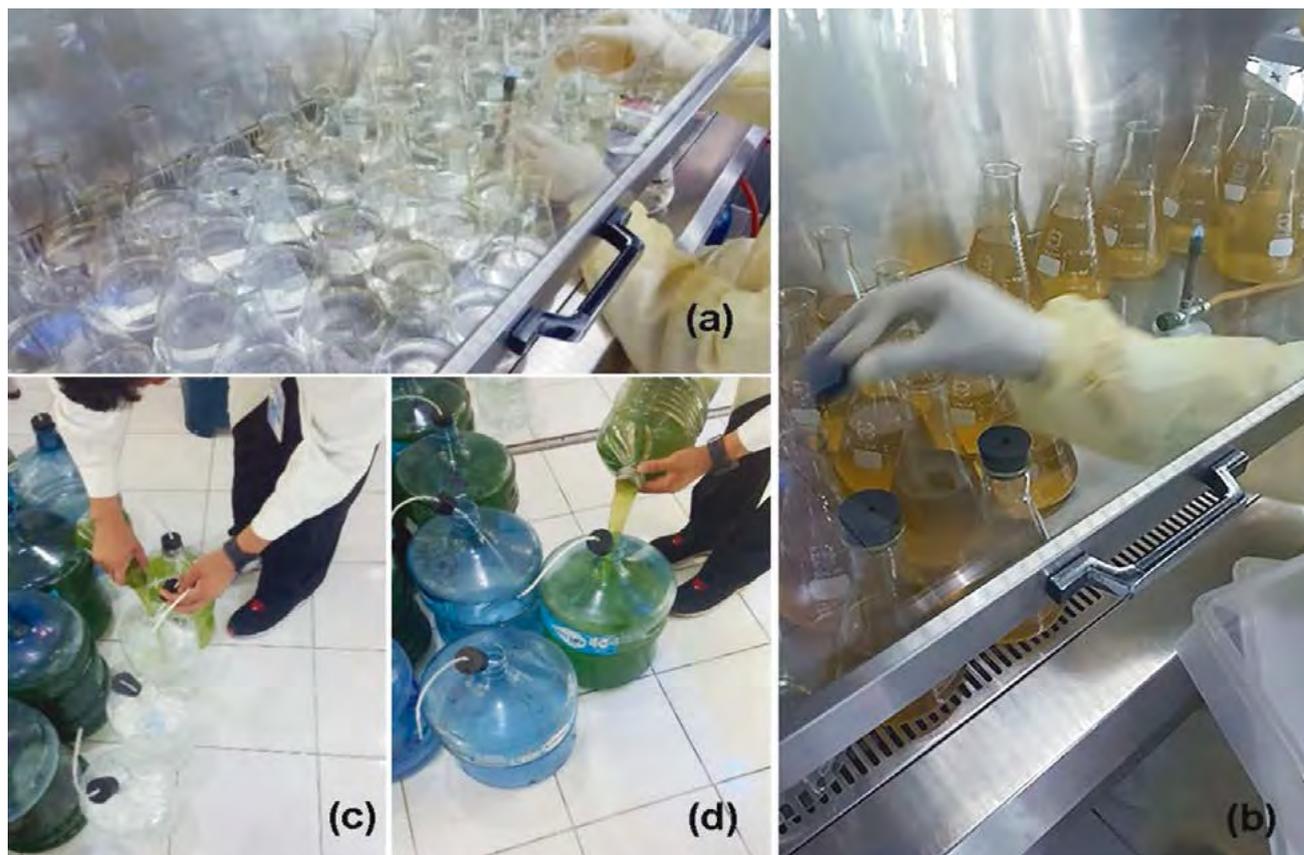


Figura 7.- Inoculación de cultivo en los distintos niveles de cultivo: (a) y (b) matraces de 0,5 y 1 L, (c) botellas de 7 litros y (d) sembrado en botellas de 20 litros

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 (Fig. 7).

Cuantificación celular

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

Materiales

- Microscopio binocular
- Cámara de Neubauer

- Lugol
- Pipetas
- Viales.

Procedimiento Tomar la muestra (2 – 3 mL) en un vial y fijar con una gota de lugol.

- Colocar la muestra en la cámara de Neubauer y llevar al microscopio (Fig. 8).
- Realizar el conteo en el cuadrante central y en línea diagonal para el caso de microalgas menores a 6 μ y los cuadrantes externos para el caso de microalgas mayores a 6 μ.
- Realizar el conteo por triplicado.
- Obtener el promedio y llevar los datos a las fórmulas:

Células menores a 6 μ

$$N_a = (\sum \text{Cel. } C_a / 5) * 250.000$$

Células mayores a 6 μ

$$N_b = (\sum \text{Cel. } C_b / 4) * 10.000$$

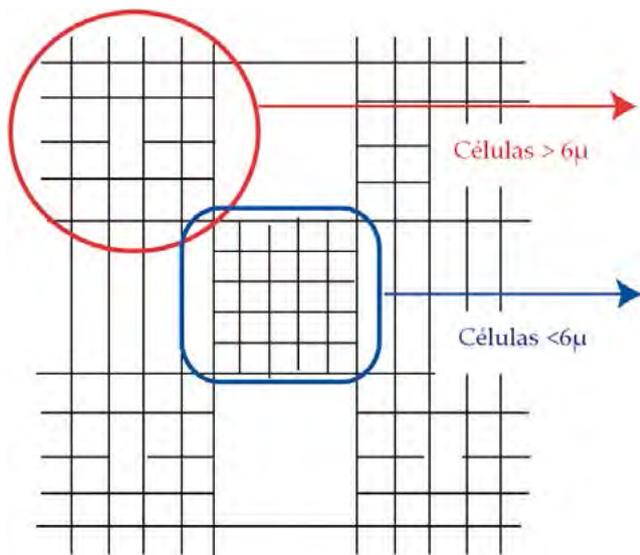


Figura 8.- Cámara de Neubauer. Ubicación de áreas de conteo de acuerdo al tamaño de células microalgales

Dónde:

N_a y N_b : Número de células

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

$\sum Cel.C_b$: 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

ΔC_f = Variación de la concentración celular (Concentración final – Concentración inicial)

Δt = Variación de tiempo (Tiempo final –Tiempo inicial)

Antes de proceder con la cosecha de los cultivos se debe realizar el conteo de los mismos y se apuntan en el formato LCM / F-10.02 – A4 según el tamaño de la microalga (Anexo).

Determinación del peso seco

La determinación de peso seco permite conocer la biomasa de los cultivos. Se asume que los cultivos de microalgas a evaluar son monoespecíficos.

Materiales

- 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 lámina de papel platino (para evitar que la muestra se pegue) y el filtro GF/F, y luego llevarlos a la estufa por 4 h a 80 °C
- Una vez transcurrido ese tiempo, colocarlos en el deshumecedor hasta que alcance la temperatura ambiente (mínimo 25 min) y pesar (repita el proceso de pesado por triplicado observando la constancia del peso) (F_s)
- Colocar el filtro sobre el soporte de filtración utilizando una pinza y filtre 5 mL de microalgas
- Eliminar la presencia de sales en el filtro lavándolo con 2 mL de formiato de amonio al 3%
- Colocar el filtro con muestra en la placa Petri y ponerlo en la estufa por 4 h a 80 °C
- Colocar la placa en el deshumecedor por 25 minutos y luego pesar el filtro con la muestra y llevar el resultado a la siguiente formula (F_m)

$$P_s = F_m - F_s$$

Dónde:

P_s : Peso seco de microalga

F_m : Filtro con muestra filtrada

F_s : Filtro solo

Una vez obtenido el peso seco, llevar el resultado al volumen de 1 L y se apuntan en el formato LCM / F-10.02 – A5 (Anexo).

Evaluación de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos

La síntesis continua de materia orgánica efectuada 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

- 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, respectivamente.

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 en el formato LCM/F-10.02 – A1, A2 y A3 (Anexo). Posteriormente estos datos son registrados en una hoja de cálculo.

2. REFERENCIAS

- ÁLVAREZ M, GALLARDO T. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las Algas. Bot. Complutensis. 15: 9 - 60.
- ALVEAL K, FERRARIO M E, OLIVEIRA E C, SAR E A (Editores). 1995. Manual de métodos ficológicos. Concepción, Chile: Universidad de Concepción. 863 p.
- BOROWITZKA M. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. Journal of Applied Phycology. 9: 393 - 401.
- BRENNAN L, OWENDE P. 2010. Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14: 557 - 577.
- CATALÁ 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. Tesis Doctoral. 236 pp.
- 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.
- FLORES C, PEÑA-CASTRO J M, FLORES-COTERA L B, CAÑIZARES-VILLANUEVA R O. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Interciencia 28: 450 - 456.
- HERNÁNDEZ-PÉREZ A, LABBÉ J. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología marina y Oceanografía. Vol. 49, N°2: 157 - 173.
- MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos. 10a Edición. Prentice Hall. 1089 p.
- MARCHETTI J, BOUGARAN G, LE DEAN L, MÉGRIER C, LUKOMSKA E, KAAS R, OLIVO E, BARON R, ROBERT R, CADORET J. 2012. Optimizing conditions for the continuous culture to *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. Aquaculture. Vol. 326-329: 106 - 115.
- PARK C, CRAGGS R, SHILTON A. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technology 102: 35 - 42.
- PRIETO A, 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.
- PRIETO M, MOGOLLÓN M, CASTRO A, SIERRA L. 2005. Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. Revista MVZ Córdoba. 10 (1): 544 - 554.
- RUIZ A. 2008. Remoción de nutrientes de agua residuales urbanas por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en cultivos libres e Inmovilizados. Tesis de Doctorado Universidad Autónoma de Baja California Ensenada. México. 147 pp.
- 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.
- 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

Formato LCM/ F-10.02 – A1

Formato control de temperatura ambiental (°C)																		
Fecha	8:00 am						12:00 m						16:00 pm					
	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

Formato LCM/ F- 10.02 – A2

Control de la intensidad lumínica(Lux)																	
Fecha	Hora	A (*)				B (*)				C (*)				D (*)			
		p1	p2	p3	p4												

Formato LCM / F-10.02 – A3

Control de parámetros físico-químicos del cultivo																					
A(*)										B(*)								C(*)			
0,5L					1L					7L				20L				250L			
Fecha	pH	O ₂ (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)	pH	O ₂ (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)	pH	O ₂ (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)	pH	O ₂ (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)	pH	O ₂ (mg/L)	T (°C)	Sal. (ppm)	

Formato LCM / F-10.02 – A4

Control de la capacidad de carga para microalgas menores a 6 μ										
Fecha de conteo	Conteo	Primer (*)	Segundo (*)	Tercer (*)	Cuarto (*)	Quinto (*)	Sumatoria	Promedio	Fórmula N _a	Nº Cel /mL x 10 ⁷
	1º									
	2º									
	3º									
	1º									
	2º									
	3º									

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

Formato LCM / F-10.02 – A5

Control de la capacidad de carga para microalgas mayores a 6 μ									
Fecha de conteo	Conteo	Primer (*)	Segundo (*)	Tercer (*)	Cuarto (*)	Sumatoria	Promedio	Fórmula N_D	Nº Cel /mL x 10 ⁶
	1º								
	2º								
	3º								
	1º								
	2º								
	3º								
(*) : Cuadrantes de la cámara de Neubauer; 1º, 2º y 3º: Número de repeticiones del conteo									

Control del peso seco microalgal				
	Fs (g)	Fm (g)	Ps (g x vol muestra filtrada)	Ps (g x L)
1º				
2º				
3º				