

Universidad Tecnológica Nacional  
Unidad Académica Mar del Plata  
Tecnicatura superior en Acuicultura y Procesamiento  
Pesquero

Tema de práctica:

Crecimiento y concentración de lípidos en cultivos exteriores de *Nannochloropsis oculata* en diferentes condiciones de salinidad.

Alumno: Tranier, Enzo.

Profesor tutor: Lic. Pérsico, María Marta.

Año: 2012

## **Índice**

1- Introducción a las microalgas	
1-1 Aspectos biológicos generales de las microalgas	4
1-2 Reproducción	5
1-3 Fotosíntesis	5
1-4 Aplicaciones	6
1-4-1 Alimento para especies de interés comercial	6
1-4-2 Obtención de energía a partir de microalgas	7
1-4-2-1 Ventajas del cultivo de microalgas	7
1-4-2-2 Especies utilizadas para la producción de biocombustibles	8
1-4-3 Productos derivados del cultivo de microalgas	9
2- Instalaciones y procedimientos generales para el cultivo de microalgas	10
2-1 Instalaciones	10
2-2 Procedimiento general en el cultivo de microalgas	11
2-3 Limpieza y esterilización de materiales y medios de cultivo	13
2-3-1 Esterilización del agua de mar por cloración	13
2-3-2 Desinfección de equipos y materiales de laboratorio	14
3- Crecimiento de una población microalgal	14
3-1 Requerimientos físicos-químicos	14
3-2 Medios de cultivos	16
3-3 Medida del crecimiento de cultivo	18
4- Cosecha y obtención de biomasa	20
5- Experiencia de cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> en diferentes situaciones de salinidades	21
5-1 Introducción	21

5-2 Materiales y métodos	23
5-3 Metodología de la experiencia	24
5-3-1 Metodología para el análisis de lípidos	24
5-3-2 Metodología para la extracción directa de los lípidos	26
5-4 Resultados	27
5-4-1 Parámetros de los cultivos ambientales y densidad celular de <i>Nannochloropsis oculata</i>	27
5-4-2 Resultados en relación a las densidades celulares	28
5-4-3 Resultados en relación a la concentración de lípidos	29
5-5 Discusión y resultados	31
6- Bibliografía	32
7- Agradecimientos	34

# Efecto de la salinidad sobre el crecimiento y la concentración de lípidos de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*

## Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue la realizar el cultivo en el interior de un invernadero de la microalga marina oleaginosa *Nannochloropsis oculata*, Eustigmatophyceae, en diferentes condiciones de salinidad, y determinar el efecto de este parámetro sobre el su crecimiento y concentración de lípidos.

## 1. Introducción

### 1.1. Aspectos biológicos generales de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares, generalmente planctónicos y en su mayoría autótrofos, cuyo tamaño es de 2-100  $\mu$ . Comprenden el primer eslabón de la cadena alimenticia y se utilizan en operaciones de Acuicultura de una forma directa, para la nutrición de diferentes especies de moluscos y primeros estadios larvarios de crustáceos, como para alimentar organismos que servirán a su vez de presas para peces y crustáceos. También se consideran microalgas las algas filamentosas y coloniales microscópicas, de pequeño número de células.

El cultivo y las posibles aplicaciones de las microalgas implica tener en consideración los factores fisicoquímicos que influyen en el crecimiento y la biomasa obtenida; ésta podrá ser utilizada para diferentes fines (Figura 1).

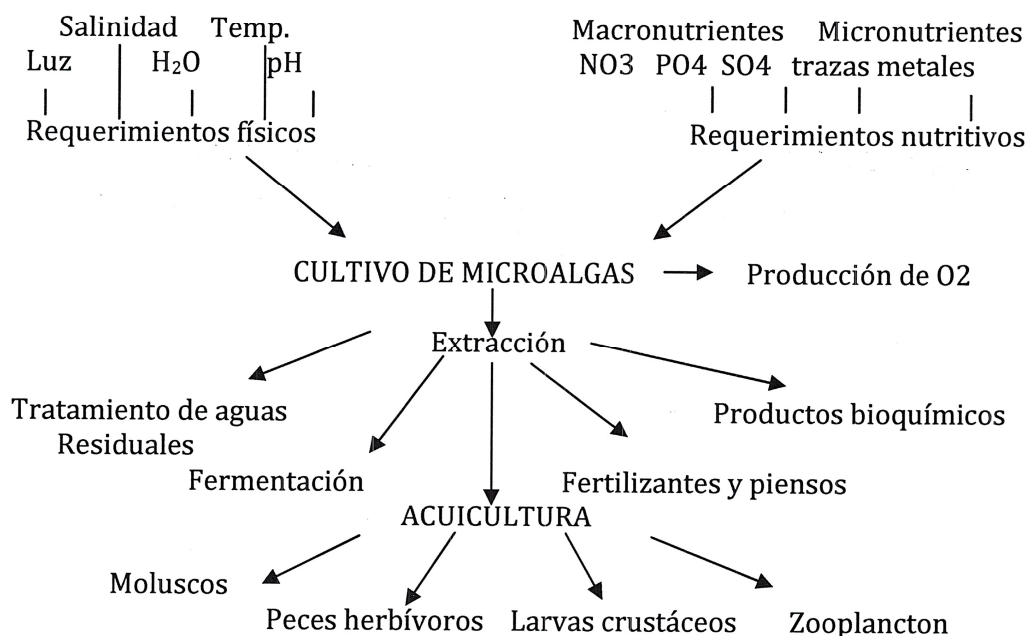


Figura 1. Esquema de representación de posibles aplicaciones de las microalgas

## 1.2. Reproducción

La reproducción de microalgas se lleva a cabo en condiciones óptimas por ciclos de división celular, generalmente mediante mitosis (bipartición o fisión binaria). Algunas especies coloniales, como *Scenedesmus sp*, producen autosporas que generan colonias hijas con el mismo número de células que la colonia madre, seguidos de un aumento del volumen celular. Así, a partir de una célula madre se genera una población de células genéticamente idénticas. En condiciones especiales las células pueden reproducirse por meiosis, resultando células que funcionan como gametos. Éstos se fusionan dando una célula diploide o cigoto, el cual puede formar células de resistencia o una célula normal que entra en nuevos ciclos de división celular (Figura 2).

Existen numerosas variantes de este ciclo dependiendo de cada especie (Col Morales, 1983). Por otro lado, existen especies en las cuales no se conoce reproducción sexual. (Ejemplo: *Nannochloropsis sp*).

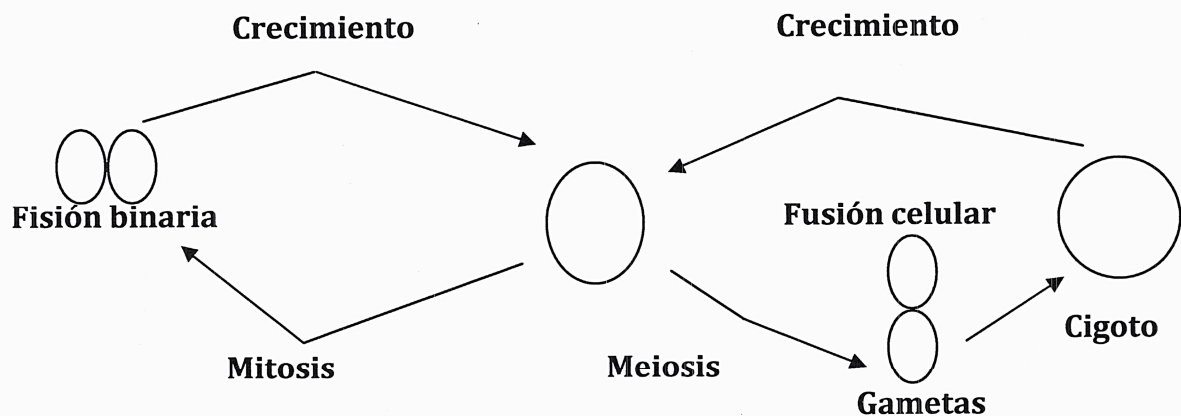


Figura 2. Esquema de los ciclos de reproducción asexual y sexual en las microalgas

## 1.3. Fotosíntesis

Las microalgas son mayoritariamente organismos autótrofos, por lo cual realizan la fotosíntesis. Ésta en las algas es básicamente el mismo proceso que ocurre en las plantas terrestres (Figura 3). La luz con 400-700 nm de longitud de onda que activa el primer paso del proceso es absorbida por varios pigmentos fotosintéticos responsables del color característico del fitoplancton, siendo el principal la clorofila-a, que puede absorber hasta un máximo de 670 a 695 nm de longitud de onda. Los pigmentos accesorios absorben luz de otras longitudes de onda, para pasar la energía lumínica a la clorofila-a.

La fijación fotosintética es responsable de la generación inicial de los compuestos orgánicos en el mar. Los hidratos de carbono, lípidos y proteínas son todos sintetizados y la cantidad de carbono o de energía fijada forma la producción primaria bruta.

Ecuación general de la fotosíntesis:



La adición de  $\text{CO}_2$  permite mantener el pH del medio, el cual reacciona con el agua formando ácido carbónico que se ioniza dando hidrogeno carbonato que estabiliza el pH ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_3 \text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CO}_3 \text{H}^-$ )

La deficiencia de  $\text{CO}_2$  produce un aumento de pH; con valores superiores a 8-9, el fósforo precipita y se transforma en un nutriente limitante del crecimiento de las microalgas. En cultivos un pH alto (mayor de 9) produce el aglutinamiento de las células, lo que dificulta el crecimiento del cultivo y no es accesible para utilizarlo como alimento.

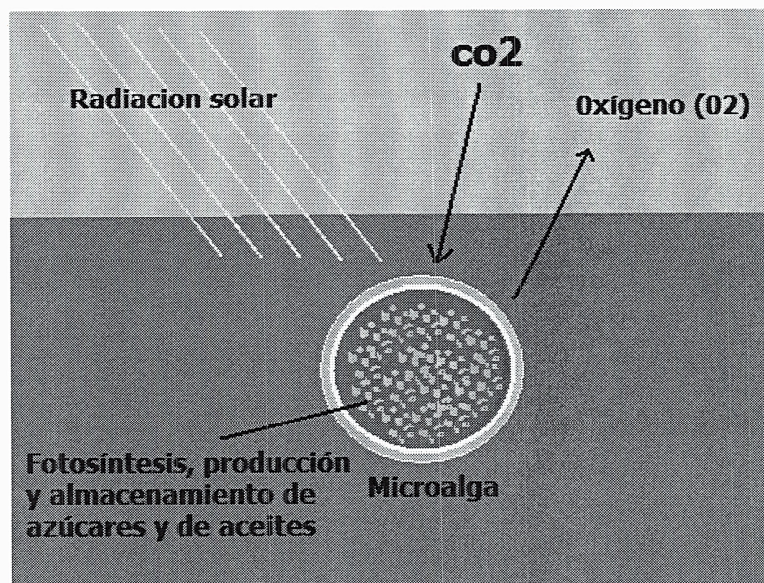


Figura 3. Esquema de la fotosíntesis realizada por las microalgas.

## 1.4. Aplicaciones

### 1.4.1. Alimento para especies de interés comercial

El desarrollo de la Acuicultura viene condicionado por la disponibilidad de larvas de aquellas especies que el mercado demanda y que por lo tanto han de desarrollarse en cantidad y calidad suficiente. Por ello, uno de los factores limitantes de esta actividad es sin duda el relativo a la nutrición, principalmente en sus fases iniciales o larvarias; de tal forma que una adecuada alimentación va a ser la base del éxito del cultivo. Las microalgas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica acuática, tanto de agua salada como dulce.

Las especies más utilizadas pertenecen a los grupos de algas pardo-doradas, diatomeas y algas verdes, entre otras, con características nutricionales excepcionales, principalmente gracias a su alto contenido en proteínas, lípidos e hidratos de carbono, esenciales para la alimentación de los organismos sujetos a cultivo.

En función de los criterios de selección de microalgas se pueden establecer relaciones entre microalgas y consumidores. El contenido de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga (HUFA) son indispensables para las larvas de peces marinos, principalmente el 20:5n3 y 22:6n3. Las microalgas más utilizadas en este caso son *Nannochloropsis* sp e *Isochrysis galbana*.

GÉNERO	CICLO	TEMPERATURA ÓPTIMA	DIÁMETRO MEDIO
<i>Phaeodactylum (diatomea)</i>	10 h	25°C	10.4µ
<i>Skeletonema (diatomea)</i>	13.1 h	18°C	>20µ
<i>Dunaliella (cloroficea)</i>	24 h	16°C	17.8µ
<i>Chlorella (cloroficea)</i>	7.7 h	25°C	5µ
<i>Tetraselmis (cloroficea)</i>	18 h	18°C	18.4µ
<i>Monochrysis (crisoficea)</i>	15.3 h	20–25°C	10µ
<i>Isochrysis (crisoficea)</i>	30.2 h	20°C	10.2µ

Tabla I. Características de algunas de las especies de algas unicelulares utilizadas en acuicultura

#### 1.4.2. Obtención de energía a partir de microalgas.

A partir de las microalgas podremos obtener **biocarburantes líquidos o gaseosos** para el transporte, o la generación de electricidad y/o calor renovable. Además, al producirse de un modo sostenible y sin competir en el mercado de las materias primas alimenticias estamos hablando de un **cultivo energético de segunda generación**.

##### 1.4.2.1. Ventajas del cultivo de microalgas frente a los cultivos energéticos tradicionales para la producción de biocombustibles

Para la producción de biocombustibles las microalgas presentan una serie de ventajas importantes con respecto a los otros productos agrícolas que se emplean en la actualidad:

- ✓ **El nivel de productividad es mucho mayor que empleando cualquier otro tipo de materia prima.**

Las microalgas son organismos que en condiciones adecuadas se desarrollan a gran velocidad y completan su ciclo de vida en un tiempo mucho menor que los cultivos tradicionales. Se estima que la productividad de biocombustibles a partir de las microalgas es de entre 20 y 80 veces superior que a los producidos a partir del maíz, la soja o la caña de azúcar.

✓ **No se emite CO<sub>2</sub> de más a la atmósfera**

Las microalgas requieren CO<sub>2</sub>, capturándolo en sus moléculas. En el momento de su combustión ese CO<sub>2</sub> tomado se libera devolviéndolo al aire. Por lo tanto se libera tanto CO<sub>2</sub> como el que el alga tomó en su desarrollo resultando el balance final igual a cero. Varios diseños de plantas de producción de microalgas proyectan emplear las emisiones de CO<sub>2</sub> de las centrales termoeléctricas para insuflarlas en los cultivos y acrecentar la producción.

✓ **La producción de biocombustible a partir de microalgas no afecta en absoluto al mercado de alimentos.**

Actualmente se están destinando grandes partidas de cereales para producir bioetanol y biodiesel, lo que provoca que estos escaseen y que se eleve su precio en perjuicio de la industria alimenticia y en especial de las sociedades más pobres. Obtener combustibles a partir de las algas permitirá que los cereales se usen exclusivamente para fines alimentarios y que los precios se mantengan más bajos

✓ **Para el cultivo de microalgas no se destruyen bosques ni selvas**

La inmensa demanda de biocombustibles elaborados a partir de cultivos tradicionales provoca la destrucción de amplias zonas selváticas y forestales con el fin de ampliar la superficie cultivable. Esto repercute negativamente en los ecosistemas. Es perfectamente posible realizar el cultivo de microalgas en estanques localizados en áreas desérticas o en terrenos improductivos para cualquier otro tipo de vegetal. Existen de hecho en ejecución centrales de producción de microalgas para biocombustibles en desiertos, aprovechando las excelentes cualidades de insolación que ofrecen.

#### **1.4.2.2. Especies más utilizadas para la producción de biocombustibles**

Como ya se ha mencionado, las microalgas pueden ser la materia prima para combustibles renovables como el biodiesel, el metano, el hidrógeno y el etanol. Estos biocombustibles no contienen azufre y se desempeñan tan bien como el diesel del petróleo; además, reducen emisiones de materia particulada, monóxido de carbono e hidrocarburos.

El contenido promedio de lípidos en las microalgas puede alcanzar hasta hasta el 70%.

Entre las especies más utilizadas se encuentran *Chlorella*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Porphyridium*, y tienen niveles de aceite de 20 a 50%. También es significativa la composición en ácidos grasos, ya que tienen efecto en las características del biocombustible producido.

Su selección también depende de su crecimiento, tolerancia a variación de factores ambientales, etc.

A continuación se describen las características de algunas microalgas utilizadas para distintas finalidades.



***Nannochloropsis sp :***

Es una pequeña microalga de 2-8 micras de diámetro. Sus células son redondeadas, de color verdoso amarillento, sin flagelos. Esta especie es euritérmica, eurihalina y fácilmente adaptable a condiciones ambientales diferentes.

Su máxima tasa de crecimiento se encuentra a salinidades de 28-30 partes por mil.

Se utiliza como alimento para rotíferos, copépodos, artemia, etc.

***Chlorella sp :***

Microalga de color verde de 8-10 micras de diámetro. Es eurihalina y euritérmica. Las condiciones óptimas de cultivo se encuentran entre 18-25 ° C y 20-28 partes por mil de salinidad.

Por su fácil crecimiento en aguas dulces y salobres es una de las especies que se utiliza para alimentar camarones y rotíferos.

***Dunaliella sp :***

Células ovoides de 6 micras de diámetro y de 9 a 11 de largo; color verde amarillento y con dos flagelos; móviles.

Son microalgas eurihalinas que crecen en un rango óptimo de temperatura de 28-20 ° C , a un pH de 7,5 - 8 y salinidad de 20 - 23 partes por mil. Debido a su adaptabilidad a condiciones extremas y su flexibilidad en relación al régimen químico de nutrientes, se la considera como un buen alimento para bivalvos, crustáceas, microinvertebrados y ciertos peces de agua dulce.

***Isochrysis sp:***

Células de 6-8 micras de tamaño y con 2 flagelos; móviles.

Su crecimiento óptimo se encuentra a una temperatura que varía de 16-20 ° C, a una salinidad de 25-28 partes por mil y 4000 lux. Su alto valor nutritivo la sitúa entre las especies más importantes para la alimentación de bivalvos marinos .

### **1.4.3. Productos derivados del cultivo de microalgas**

El cultivo de microalgas permite la obtención de diversos productos para fines energéticos, como son:

**Bioetanol**

El sistema se basa en el cultivo de microalgas verde-azuladas o cianobacterias que consumen CO<sub>2</sub> y que producen de manera natural etanol. Hay una empresa que está en proceso de construir su primera planta de etanol en Puerto Libertad en el estado de Sonora (México) en un área desértica próxima al mar.

**Biomasa**

Entendiéndose como tal al volumen de masa de algas generado. Las algas que contienen celulosa se pueden emplear para distintos fines, entre ellos el energético.

### **Bio-fertilizantes**

Se trata de fertilizantes obtenidos a partir de microalgas. Estos fertilizantes están indicados para la agricultura intensiva y su función es adicionar a los cultivos aminoácidos, aumentando la velocidad de crecimiento del cultivo.

## **2. Instalaciones y procedimientos generales para el cultivo de microalgas**

### **2.1. Instalaciones**

- a. Sala o Laboratorio de Cultivo: Se recomienda para fines de mantenimiento de cepas, transferencias sucesivas de cultivos, crecimiento de cultivos iniciadores e intermedios.
  - ✓ Laboratorio con temperatura controlada 18–20°C.
  - ✓ Paredes y pisos de azulejo en color blanco.
  - ✓ Instalaciones para el cepario y cultivo intermedios con lámparas de luz blanca-fría fluorescente (20W–37W).
  
- b. Cuarto de Siembra: puede instalarse dentro del mismo laboratorio una cabina con campana de flujo laminar o bien una simple mesa de laboratorio con instalación de gas para dos mecheros, para la inoculación en condiciones asépticas.
  
- c. Sala de Producción: para volúmenes de 100 l o más, se requieren recipientes de materiales plásticos no tóxicos y transparentes (Figura 4). En este tipo de instalación la luz puede ser artificial o natural, la cual es recomendable pues el uso de la luz artificial es de muy alto costo y se requiere además de equipos para mantener la temperatura a 18–20 ° C. Dependiendo del clima y la especie a cultivar, se pueden desarrollar éstos a la intemperie, cubriendo los recipientes en caso de lluvia o ubicarlos bajo un invernadero.



Figura 4. Cultivo masivo de *Nannochloropsis oculata* en tanques de fibra de vidrio dentro de invernadero de la Universidad Tecnológica Nacional Mar del Plata.

## 2.2. Procedimiento general en el cultivo de microalgas

1. Mantenimiento de cepas o cultivos stock
2. Cultivo inicial
3. Cultivo intermedio
4. Cultivo masivo

1. Las cepas se mantienen en pequeños volúmenes, en medio líquido (tubos de ensayo, erlenmeyers) y/o en medio sólido: agar (en cápsulas de Petri). Esta etapa tiene carácter de cultivo axénico y por lo tanto es de máximo cuidado para evitar la contaminación. Estos cultivos se guardan en cámara o incubador, o en una pequeña sala con condiciones de temperatura e iluminación constantes, 500-1000 lux; 15-18 ° C (Figura 5).

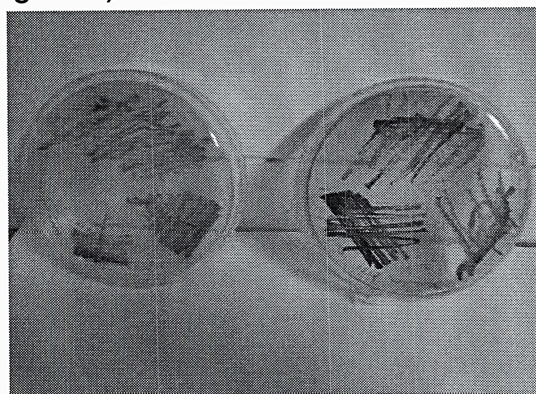


Figura 5. Cultivos stock de *Nannochloropsis oculata* pertenecientes al cepario del Laboratorio de microalgas de la Universidad Tecnológica Nacional Mar del Plata

2. El cultivo inicial se desarrolla en erlenmeyers de 500 ml con 250 ml de medio de cultivo. Luego de la inoculación se ubican en estanterías iluminadas (1500-2000 lux) Se deben agitar manualmente 1 o 2 veces al día en forma periódica y suave o con un agitador que lo hace en forma continua.
3. Esta etapa se desarrolla en recipientes de 1-2 litros con medio de cultivo que ocupe el 60 % aproximadamente de la capacidad total. A éstos se transfieren los cultivos iniciales (un 80-90 %). Hasta un litro de cultivo se pueden agitar manualmente. La intensidad de luz se puede ajustar entre 2000-2500 lux. Estos sirven de inóculo para recipientes de mayor capacidad (10-20 litros). La temperatura se debe mantener entre 18-20°C; La intensidad luminosa puede llevarse hasta 5000 lux. Hasta esta etapa todo el material y medios de cultivo deben ser esterilizados, el aire filtrado y las condiciones de temperatura e iluminación controladas (Figura 6).

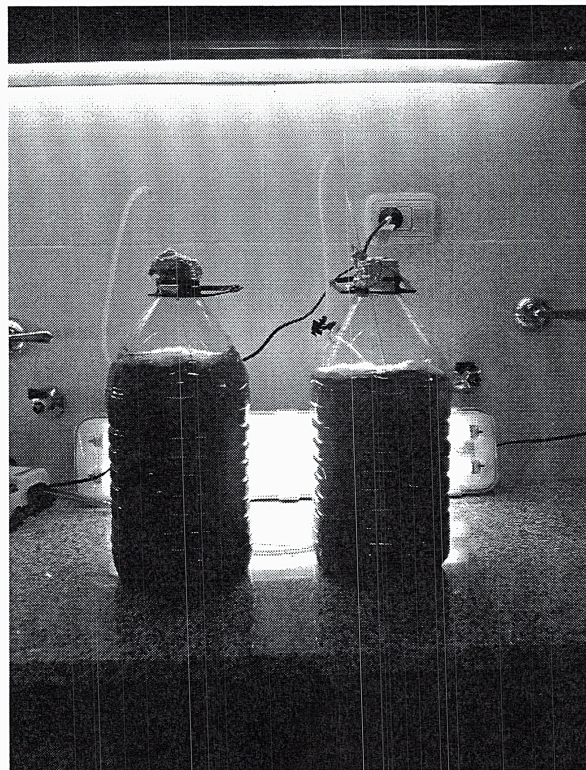


Figura 6: Cultivos intermedios de *Nannochloropsis oculata* en el Laboratorio de Microalgas de la UTN Mar del Plata.

4. Esta etapa se desarrolla con cultivos en recipientes mayores de 10-20 litros, con iluminación natural o artificial, en salas internas y/o externas, con aireación y controles diarios de T, S‰, pH y observaciones microscópicas para detectar contaminación y determinar la densidad de los cultivos (ver figura N° 7). Es importante tener en cuenta la adición de CO<sub>2</sub> si fuera necesario. Dependiendo del tipo de cultivo de

microalgas a implementar según la forma de cosechar, se deberán tener recipientes con suficiente agua y estéril para iniciar nuevos cultivos o reponer volumen de cultivo. En esta etapa los medios de cultivo utilizados son generalmente más sencillos, en cuanto a su composición y preparación. El agua se esteriliza por cloración. La intensidad luminosa en el caso de ser artificial se coloca en la parte superior de los recipientes, pudiendo estar entre 4000-5000 lux.

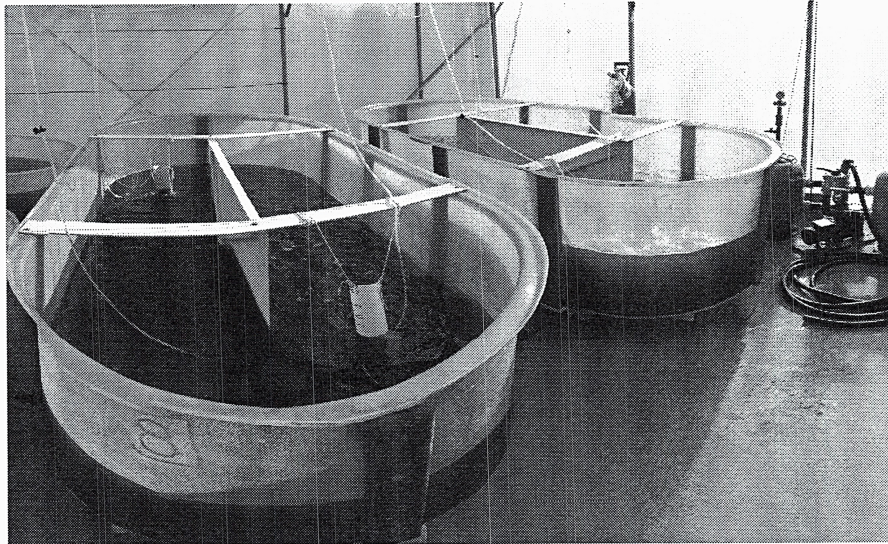


Figura 7. Cultivo de microalgas en tanques desarrollado bajo invernadero en Universidad Tecnológica Nacional Mar del Plata.

## 2.3. Limpieza y esterilización de materiales y medios de cultivo

Para el agua, dulce o marina, se utilizan diferentes mecanismos de esterilización:

- ✓ **Autoclavado:** El calor húmedo es la forma más utilizada, para medios y materiales que pueden resistir temperaturas de 100 a 120 ° C. (15 libras/pulgada cuadrada de presión). El tiempo requerido varía según el volumen a autoclavar, (100 ml requieren 10'; 2 litros, 20' y 5 litros aproximadamente 35').
- ✓ **Filtración:** volúmenes de medios para cultivos iniciales e intermedios pueden esterilizarse con unidades de filtración al vacío y membrana de 0,5u de diámetro. de poro. Para grandes volúmenes, de 125 mm de diámetro. de poro.
- ✓ **Cloración:** utilizada para volúmenes de agua mayores de 10 litros.

### 2.3.1. Esterilización del agua de mar por cloración

Para esterilizar grandes volúmenes de agua uno de los métodos más prácticos es la cloración. Es necesario tener el agua en un recipiente grande (bolsas de plástico, tanques o piscinas). Sobre el agua se vierte una cierta cantidad de cloro y se deja durante un cierto tiempo para que se produzca el efecto

esterilizador deseado. El tiempo dependerá de su concentración. Luego se neutraliza con tiosulfato o metabisulfito de sodio que no daña a los organismos a cultivar.

Para clorar el agua se determina primero la concentración de cloro que se quiere utilizar (ppm).

Se utiliza lavandina en cuyo envase están indicado los gramos de cloro por litro que contiene (generalmente 55g/l, 80 g/l o 100g/l).

Antes de utilizar el agua se realiza la prueba de Cloro total con el reactivo químico correspondiente, para estar seguros que la declaración fue efectiva.

## **2.3.2. Desinfección de equipos y materiales de laboratorio**

### Lavado de material de vidrio de laboratorio:

- ✓ Acido clorhídrico al 10 %
- ✓ Enjuague con agua corriente
- ✓ Detergente biodegradable
- ✓ Enjuagues con agua corriente
- ✓ Enjuagues con agua destilada
- ✓ Invertir cada recipiente para que escurra y luego tapar.
- ✓ Secado en estufa. Esterilización en estufa a 140 ° C – 2 hs.

### Lavado de tanques

Los tanques de cultivo masivo de microalgas deben lavarse bien para volver a ser utilizados, con lavandina y agua corriente, cepillar bien las paredes y el fondo, utilizar mangueras para enjuagar, varias veces, y dejar secar al sol al menos 24 hs.

## **3. Crecimiento de una población microalgal**

### **3.1. Requerimientos físico-químicos**

#### Luz

Se utilizan dos tipos de luz, natural o artificial. Cada grupo de algas tiene un espectro de luz favorable para su crecimiento, reproducción y morfología celular.

Periodo de exposición: puede ser continuo (luz artificial) o periódico (luz artificial o ciclo natural día-noche).

Una exagerada iluminación es perjudicial, siendo la luz violeta y ultravioleta del espectro las más dañinas. Para evitar el exceso de iluminación se pueden utilizar mediasombras.

#### Temperatura

La fotosíntesis está influenciada por la temperatura, pero disminuye agudamente con elevados valores de temperatura. Las temperaturas óptimas

varían entre 15-22 °C. La radiación luminosa ya sea natural o artificial incrementa en unos grados la temperatura del cultivo. El control de la misma puede realizarse con termostatos o cámaras de temperatura controlada.

### **Salinidad**

La cantidad de material inorgánico disuelto en el agua salada expresado como peso en g/Kg. de agua salada se llama salinidad, generalmente llega a 35 g/Kg. y se representa por 35 u.p.s. (unidades prácticas de salinidad). Los estudios cuantitativos de los componentes del agua de mar han servido de base para calcular y aproximar concentraciones de aquellos elementos necesarios para el enriquecimiento nutricional de los medios de cultivo algales. El fósforo, por ejemplo, aunque es un componente menor del agua tiene gran importancia biológica sobre todo en Acuicultura, porque es el elemento que más frecuentemente limita la productividad en un ecosistema natural o en un estanque.

La tolerancia a las variaciones en salinidad de las especies marinas suele ser amplia: 12-40 ‰. Sin embargo existe un rango óptimo que debe ser considerado al cultivar una determinada especie. La salinidad, al igual que todas las otras variables físicas, puede afectar la composición y por lo tanto su valor nutritivo.

### **pH**

El pH óptimo del medio de cultivo suele estar comprendido entre 7-8. Los métodos para controlarlo incluyen: aireación con aire/CO<sub>2</sub>, adición de productos químicos, uso de tampones (sistema carbonato-bicarbonato). La fotosíntesis provoca un aumento de pH que se ha de contrarrestar aumentando el CO<sub>2</sub>; en la oscuridad el metabolismo de las células reduce el pH, por lo cual se debe disminuir la cantidad o suspender la adición a los cultivos de CO<sub>2</sub>.

### **Oxígeno**

El recurso de oxígeno natural más importante en aguas naturales y estanques es la fotosíntesis. La profundidad en la cual el oxígeno producido mediante fotosíntesis iguala al consumido en la respiración se llama "Profundidad de Compensación" y corresponde a la profundidad de la zona eufótica. El punto de compensación en un estanque piscícola generalmente es menor de 1 m. Existe una fluctuación diaria de la concentración de oxígeno disuelto, debido a la mayor producción de oxígeno disuelto durante el día por fotosíntesis. El fenómeno se detiene por la noche y no así los procesos respiratorios que continúan consumiendo el oxígeno. Las máximas concentraciones de oxígeno ocurren durante la tarde y las mínimas al amanecer. Por ello normalmente los aireadores se encienden y los recambios de agua en los estanques se realizan en estos momentos, para compensar el déficit de oxígeno disuelto existente.

La producción de O<sub>2</sub> durante una activa fotosíntesis hace que el medio de cultivo sea oxidante. Este medio no es siempre favorable al crecimiento y en algunas especies cuando las concentraciones celulares son altas se hace burbujear nitrógeno o algún compuesto reductor (ej. sulfito sódico) para equilibrar el potencial redox.

### Otros gases disueltos

Todos los gases están presentes y en solución en el agua marina. El oxígeno varía de 0-8,5 mg / l. Las concentraciones son mayores en aguas frías por su mayor solubilidad que en las tropicales. Las algas disponen de una fuente ilimitada de CO<sub>2</sub>, el cual está presente como iones bicarbonato, CO<sub>2</sub> disuelto y CO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>. A nivel de la superficie del mar el CO<sub>2</sub> disuelto tiene a equilibrarse con el atmosférico y así los océanos actúan como reguladores de la cantidad de CO<sub>2</sub> de la atmósfera. El nitrógeno atmosférico es soluble en agua y se encuentra en concentraciones desde 8,4-14,5 mg/l. Otras formas inorgánicas son el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrito), NH<sub>3</sub> (amoníaco), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato) y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (amonio). El nitrógeno junto con el fósforo son elementos muy importantes para el crecimiento de las algas y junto con otros constituyentes esenciales son conocidos como nutrientes. La concentración de los mismos es mayor en aguas profundas que en las superficiales como resultado de la actividad bacteriana.

### 3.2. Medios de cultivo

En la preparación de medios de cultivo debe tenerse en cuenta la calidad de los materiales químicos y la exactitud en el peso de los mismos.

El agua para la preparación de las soluciones stock de los distintos medios de cultivo debe ser agua destilada.

Los medios de cultivo enriquecidos (agua fertilizada) pueden ser simples o complejos de acuerdo a la cantidad de componentes agregados. Un medio complejo tienen una solución básica de nutrientes, de metales traza y de vitaminas. Un sólo medio debe servir para la mayoría de las necesidades del cultivador. Este es el caso del medio R. Guillard f/2, en el cual crece un gran número de especies microalgales marinas.

Para cultivos masivos de microalgas se busca utilizar medios de cultivo alternativos y de bajo costo: fertilizantes agrícolas, residuos de la industria pesquera, estiércoles, aguas residuales, etc.. Se han probado con éxito en el cultivo masivo de *N. oculata* barros primarios cloacales de la ciudad de Mar del Plata (Pérsico *et al.*, 2010).

Medio de cultivo f/2 de Guillard utilizado para el cultivo de algas en criaderos de bivalvos

1.	Nitrato	NaNO <sub>3</sub>	75,0 g por l
----	---------	-------------------	--------------



2.	Fosfato	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0 g por l
3.	Silicato	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	30,0 g por l
4.	Metales traza	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,5 g
		$\text{Na}_2\text{EDTA}$	4,36 g

Se disuelven en 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Se añade 1 ml de cada una de las siguientes soluciones de metales traza:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,98 g por 100 ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,20 g por 100 ml
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,00 g por 100 ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18,00 g por 100 ml
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,63 g por 100 ml

Se prepara 1 l con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (pH ca. 2,0).

Se añade 1 ml por litro FSW de las soluciones anteriores (#1-4).

#### 5. Vitaminas

	Biotina	1,0 mg
	B <sub>12</sub>	1,0 mg
	Tiamina HCl	20,0 mg
Se disuelve en 1 l de $\text{H}_2\text{O}$ destilada y congele.		
Añada 1/2 ml de solución de vitaminas por cada 1 l de agua de mar.		

Tabla II. Medio de cultivo f/2 de Guillard utilizado para el cultivo de microalgas en criaderos de bivalvos.

**Equipos necesarios:** autoclave, balanza analítica, balanza granera, pH metro para estabilizar soluciones y el medio final; calentador eléctrico con agitador magnético para disolver compuestos, lavador automático de pipetas, baldes de 10-15 litros de capacidad, refrigerador-congelador para almacenar reactivos, soluciones stock y vitaminas.

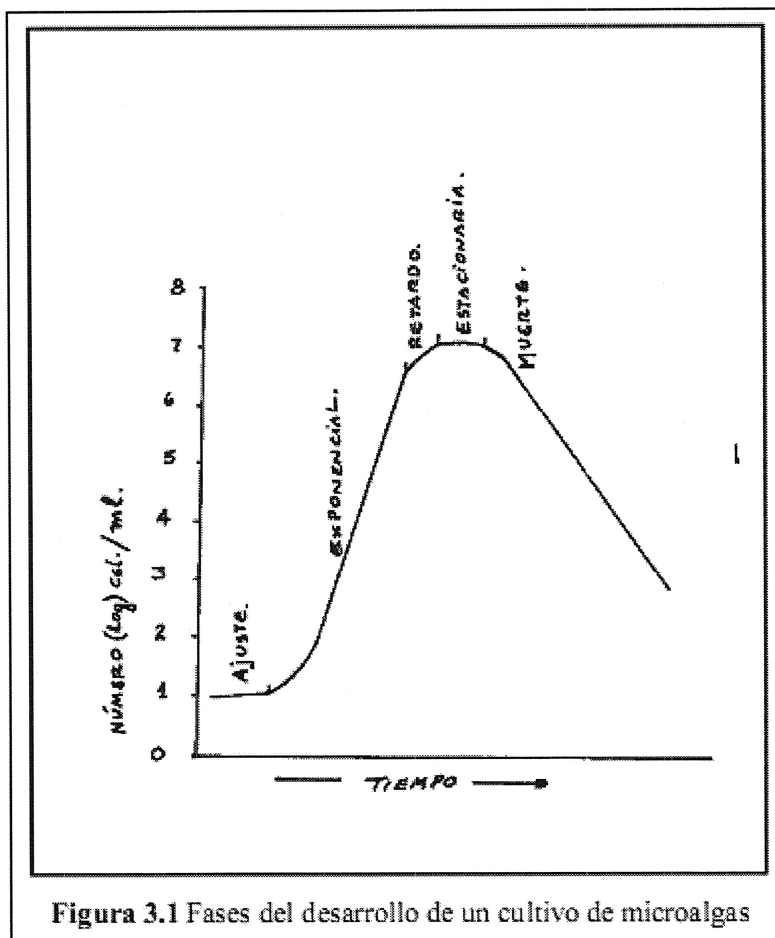
**Cristalería:** la vidriería marca PIREX es de buena calidad. Se necesitan: pipetas para medir varios volúmenes, tubos de ensayo con tapa rosca, botellas con tapa para reactivos, beakers de varias medidas, cilindros graduados,

cápsulas de petri, erlenmeyers de distinta capacidad, termómetros, mecheros, embudos de porcelana para filtración, tubos para aireación, entre otros.

Las soluciones stock de los medios de cultivo se guardan en refrigerador en botellas de vidrio o plástico. En la preparación de una solución stock de trabajo que contiene una mezcla de compuestos (sales, vitaminas, etc.) se disuelve cada una por separado en un volumen mínimo de agua destilada; luego se combinan y enrasan al volumen final correspondiente.

### 3.3. Medida del crecimiento del cultivo

Para determinar la densidad de células de una población algal ( $N^{\circ}$  de células/ml) de un recipiente de cultivo y además poder establecer el grado de división celular en un determinado tiempo, se utilizan cámaras de conteo o hematocitómetros. Los resultados permiten estimar la situación de un cultivo y relacionarlo con la curva de crecimiento de la población algal.



#### Conteo del número de células de un cultivo

Para determinar la concentración de microalgas en un cultivo hay que contar las células que hay en un volumen determinado de agua (células/ml). Existen varios métodos: recuentos al microscopio y recuentos automáticos. Uno de los métodos más utilizados, sencillo, para estimar la densidad de un cultivo

microalgal es el conteo microscópico de las células a través de un hematocitómetro (cámara cuenta glóbulos). Es una pieza de vidrio con tres plataformas: una central y dos laterales en las que se apoya una lámina de vidrio muy fina que se adhiere a las plataformas laterales, ya que la altura de la plataforma central es una décima de mm más baja. Cada cámara de cultivo tiene dos retículas o áreas rayadas, cada una con un volumen =  $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,9\mu\text{l}$ . Cada lado está dividido en 12 partes, formándose  $12 \times 12$  cuadrados de  $0,25\text{mm}$  de lado. Las cuatro divisiones centrales de cada lado

forman una especie de cruz, con la parte central dividida en cuadrados de 0,05 x 0,05mm.

**Materiales:** microscopio estándar, hematocitómetro de 0,1 mm de profundidad con cubreobjeto, pipeta con bulbo (gotero), pipeta con agua destilada, tubos de ensayo o pequeños recipientes con muestras unialgales, solución fijadora (lugol).

**Uso del hematocitómetro:** agitar suavemente una muestra de microalgas para que se distribuyan homogéneamente. Esperar unos segundos. Colocar un cubreobjetos limpio sobre los pilares de soporte de la cámara. Con una pipeta gotero tomar una muestra del cultivo de algas y en ángulo de 45° depositar una gota en la ranura del hematocitómetro para llenar la cámara. Esperar unos minutos para que se asienten las células.

Proceder al conteo siguiendo un orden en la secuencia de contaje para evitar errores de suma. Se debe tener en cuenta el tamaño de las células al realizar el conteo (ver figura N° 8). Para células grandes (ej. Tetraselmis) se cuentan los cuatro cuadros, se divide por cuatro y se multiplica por 10.000 para obtener la densidad de la población (N° de células/ml).

Para células pequeñas (ej. *Nannochloropsis*) se utilizan los cuadrados chicos (centro de la cámara).

**Ejemplo** (Pérsico, 2008).

En un cuadrado grande (0,25 x 0,25) el volumen es igual a

0,25 mm x 0,25 mm x 0,1 mm = 0,00625 mm<sup>3</sup> (microlitros).

Si contamos 40 células la concentración en células/ml será:

0,00625 ul ----- 40 células  
1000 ul (1 ml) ----- x = 6.400.000 células

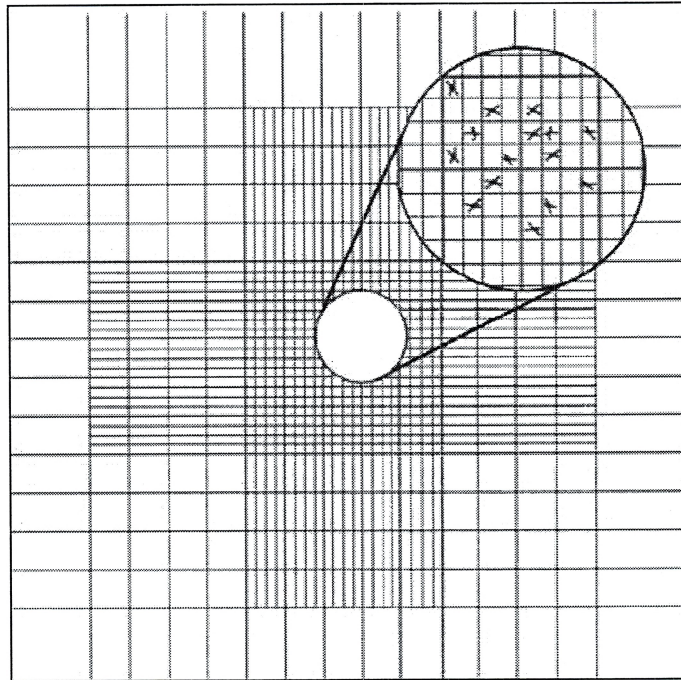


Figura 8: Cuadrícula de conteo de la cámara de Neubauer utilizada para estimar la densidad celular de los cultivos de microalgas.

## 4. Cosecha y obtención de biomasa

Para realizar exitosamente la cosecha y obtención de biomasa de microalgas es necesario separar las mismas de la fase líquida. Para lograrlo pueden utilizarse diferentes técnicas (Barnabé, 1991); algunas de las más utilizadas se describen a continuación:

### Coagulación - Flocculación

Productos tales como el sulfato de aluminio, el cloruro férrico, la cal y ciertos polielectrolitos han sido empleados con éxito. Las concentraciones, según se utilicen sales minerales o polielectrolitos, varían de 100 a 200 mg / l y de 2 a 5 mg / l. Este proceso se adapta muy bien para el tratamiento de grandes volúmenes, pero es caro. A los flóculos de algas que se forman en el seno del medio líquido por la acción de los aditivos citados, se les hace llegar a la superficie por las técnicas de flotación o bien decantados en decantadores tradicionales.

La harina de algas así obtenida puede ser utilizada en la alimentación animal, debido de su alto contenido en proteínas del (45 a 70 %).

### Centrifugación

Está basada en la ligera diferencia de densidad entre las algas y el medio líquido, permite extraer del 80 al 90 % de estos vegetales, en 2 a 5 minutos, con aceleraciones de 500 a 1000 g. A pesar de su costo energético es actualmente el único procedimiento empleado industrialmente.

Existen otros métodos como la ultra filtración, el micro tamizado, el filtrado complementario con láminas, filtrado con papel y la sedimentación espontánea, pero no esta probada su fiabilidad o no se acercan a la de las técnicas de floculación y centrifugación.

Así mediante el empleo de estas dos técnicas se puede obtener la biomasa de microalgas. (Col Morales, 1983).

## 5. Experiencia de cultivo de *Nannochloropsis oculata* en diferentes situaciones de salinidad

### 5.1. Introducción

La salinidad es el contenido de sal, mayormente inorgánica, disuelta en un cuerpo de agua. Por lo tanto es válida la expresión salinidad, para referirse al contenido salino en suelos o en agua. Por ejemplo, el contenido salino en el agua de mar, que hacia la costa de Mar del Plata es de 34-35 gramos por cada litro de agua. Sin embargo, dicha salinidad puede variar debido a la evaporación o al aporte de agua dulce. La determinación de la salinidad puede ser medida con un refractómetro (Figura 9).

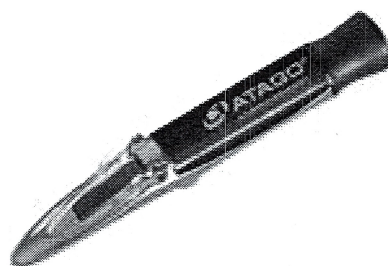


Figura 9: Refractometro utilizado para medir la salinidad de los cultivos.

El proceso de evaporación varía según dos factores principalmente: Conforme a la condición climática y la profundidad. Respecto al primer factor, la evaporación es más intensa en las zonas tropicales, y menor en las zonas polares. En relación a la profundidad, las aguas superficiales son más saladas, porque la evaporación hace que la concentración de sal aumente. En zonas de climas templados es en verano cuando se registra mayor evaporación.

La variación en la salinidad permite realizar una clasificación, como se muestra en la Tabla 3. (Unesco, 1981a; Unesco, 1981b).

Salinidad del agua			
Agua dulce	Agua salobre	Agua de mar	Salmuera
< 0,05 %	0,05 - 3 %	3 - 5 %	> 5 %
< 0,5 ppt	0,5 - 30 ppt	30 - 50 ppt	> 50 ppt

Tabla III. Clasificación de aguas según porcentaje de salinidad.

**Agua dulce:** Su concentración de sal alcanza un máximo de 0,5 ppt (partes por mil). Se incluye en este grupo a lagos, ríos y arroyos. El agua potable, también se considera propia de este grupo.

**Agua salobre:** Cuando la concentración es mayor a 0,5 ppt se considera como salobre. Generalmente son cuerpos semi-cerrados donde el agua de mar se diluye en forma medible con aportes terrestres de agua dulce. Pueden encontrarse casos donde las lagunas de agua dulce experimenten sequías, debido a la ausencia de precipitaciones, lo que conlleva a un aumento de salinidad y, en consecuencia, pase a considerarse como cuerpo de agua salobre.

**Agua de mar:** También definido como salino, cuando su concentración se encuentra entre 30 y 35 ppt.

**Salmuera:** Por encima de 50 ppt se la considera salmuera. Algunos lagos o mares son más salinos.

La salinidad es un factor ambiental de gran importancia ya que determina los tipos de organismos que pueden vivir en un cuerpo de agua.

Cada organismo presenta una tolerancia o rango óptimo para su desarrollo.

La microalga marina *Nannochloropsis oculata*, crece en forma óptima en un rango de salinidad de: 28 – 30 partes por mil.

La producción de lípidos al igual que su composición en las microalgas, a pesar de depender principalmente de la especie, y en última instancia de su constitución genética, son aportados por diversas condiciones físicas y químicas de cultivo. Éstas son, por ejemplo, la disponibilidad y el tipo de nutrientes, la luz, la temperatura, el pH y la salinidad; esta última modifica la síntesis de lípidos de diversas microalgas, sin embargo el tipo y cantidad de lípidos producidos también dependen de la especie y la magnitud del cambio de estas microalgas (Rodolfi *et al.*, 2009).

Por ello se han enfocado investigaciones para producir un aumento de lípidos en las células microalgales a través de la alteración de condiciones de cultivo, tales como la temperatura, salinidad, adición de dióxido de carbono y concentración de nutrientes (Chiu *et al.*, 2009) y se ha probado en algunas especies de microalgas la influencia de salinidad en la composición bioquímica celular, como así también en la concentración de pigmentos fotosintéticos y en el crecimiento. Se ha probado que cultivos de *Nannochloropsis oculata* deficientes en macronutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, contienen más lípidos que cultivos iniciados sin déficit de nutrientes (Beligni *et al.*, 2012).

## 5.2. Materiales y métodos

La experiencia se realizó en un invernadero destinado al cultivo masivo de microalgas marinas de la Universidad Tecnológica Nacional, Unidad Académica Mar del Plata.

La especie elegida para llevar a cabo este trabajo fue *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae), por ser seleccionada candidata para el Proyecto Microalgas de la mencionada institución como materia prima para la producción de aceites para biocombustibles.

Se utilizó agua de mar natural, proveniente de la Central Termoeléctrica 9 de Julio lindante. La misma fue previamente tratada a fin de alcanzar los siguientes objetivos:

### 1. Eliminación de residuos

- ✓ Se decanta en dos tanques de 750 litros.
- ✓ Se filtra a través de filtros cartucho.

### 2. Regular la concentración al nivel deseado

- ✓ Se la agrega agua dulce, a fin de alcanzar la concentración de sal deseada.

#### Cálculos para obtener el nivel de salinidad deseado

Debe comprobarse que la salinidad sea la adecuada para la especie que deseamos cultivar. La salinidad del agua de mar es de 35 ‰. Para trabajar con agua de mar de menor salinidad podemos calcular los litros de agua dulce que debo agregar, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. de agua dulce} = \frac{(\text{Vol. de agua} \times \text{salinidad del agua de mar})}{\text{Salinidad deseada}} - \text{Vol. de agua}$$

Ejemplo: Si deseo preparar 30 litros de agua a una salinidad de 28 ‰, será:

$$\text{Volumen de agua dulce} = \frac{30 \text{ l} \times 35 \text{ ‰}}{28 \text{ ‰}} - 30 \text{ l} = 7,5 \text{ litros de agua dulce}$$

### 3. Esterilización del agua

- Se utilizó una concentración de 20 ppm de cloro activo
- Se dejó reposar durante 24 horas sin aireación.
- Se eliminó el cloro, mediante el agregado de metabisulfito de sodio, facilitándose con aireación.

### 5.3. Metodología de la experiencia

Se realizaron tres tratamientos en cultivos de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, desarrollados en tanques de fibra de vidrio, con capacidad de 200 litros, provistos de aireación, y a una concentración inicial aproximada de  $25 \times 10^6$  cel/ml.

I) El primer tratamiento (T1) fue el cultivo control; la salinidad se mantuvo dentro del rango óptimo para la especie: 28-30 partes por mil. Para llevar a cabo dicho cultivo, se realizaron los siguientes pasos:

- ✓ Se vertieron en el tanque 60 litros de un inóculo de *N. oculata* (es el mismo para los tres cultivos), cuya densidad era de 75 millones de células por mililitro.
- ✓ Se agregaron 140 litros de agua a 28 partes por mil de salinidad.
- ✓ Se adicionaron 200 mililitros de medio de cultivo Yashima.

II) En el segundo tratamiento (T2), se disminuyó la salinidad, partiendo de 30 partes por mil, a 25 partes por mil final. Para llevar a cabo dicho cultivo, se realizaron los siguientes pasos:

- ✓ Se vertieron en el tanque 60 litros de inóculo.
- ✓ Se agregaron 100 litros de agua a 28 partes por mil de salinidad.
- ✓ Se adicionaron 40 litros de agua dulce corriente, tratada con cloro, para alcanzar la salinidad deseada.
- ✓ Se incorporaron 200 mililitros de medio de cultivo Yashima.

III) En el tercer tratamiento (T3), se disminuyó la salinidad, partiendo de 30 partes por mil, llegado a 20 partes por mil finalmente. Para llevar a cabo dicho cultivo, se realizaron los siguientes pasos:

- ✓ Se vertieron en el tanque 60 litros de inóculo.
- ✓ Se agregaron 50 litros de agua a 28 partes por mil de salinidad.
- ✓ Se adicionaron 90 litros de agua dulce corriente, tratada con cloro, para alcanzar la salinidad deseada.
- ✓ Se incorporaron 200 mililitros de medio de cultivo Yashima.

Todos los cultivos pertenecientes a los tres tratamientos se mantuvieron bajo invernadero del 31/05/2012 hasta el 07/06/2012.

#### 5.3.1. Metodología para el análisis de lípidos

Para realizar el análisis de los lípidos en los distintos tratamientos se realizaron los siguientes procesos en laboratorio:

##### Floculación

Se tomó una muestra de 5 litros de cada tratamiento de la experiencia y a cada uno de ellos se le agregó 5 mililitros de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), el cual fue utilizado como floculante. Se colocó la muestra con el cloruro férrico en un



agitador (JONOMEX) durante 10 minutos a baja intensidad, de manera que la solución se mezclara suavemente facilitando la floculación. Se retiró del agitador pasado los diez minutos y se dejó reposar durante 24 horas, para luego eliminar la fase líquida y obtener las microalgas. Al excedente no floculado se le agregó nuevamente floculante a razón de 1ml por litro de material a flocular y se lo agitó durante diez minutos. A este excedente no hizo falta dejarlo 24 hs, ya que el proceso de floculación ocurrió casi inmediatamente después de la agitación.

### Centrifugación

Una vez obtenidas la biomasa húmeda de *Nannochloropsis oculata*, se procedió a la centrifugación. En los vasos de la centrifuga (marca Rolco, ver figura N° 11) se colocó la biomasa de manera tal que todos los vasos presentaron el mismo peso (en esta centrifuga el peso máximo de muestra fue de 300g y la diferencia entre los vasos no fue mayor a  $\pm 0.5g$ ). Las muestras se centrifugaron durante un tiempo de 8 a 10 minutos y a una velocidad de 2800 revoluciones por minuto. Transcurrido el tiempo de centrifugado se retiró el excedente de agua (fase sólida húmeda) y se procedió al secado en estufa.

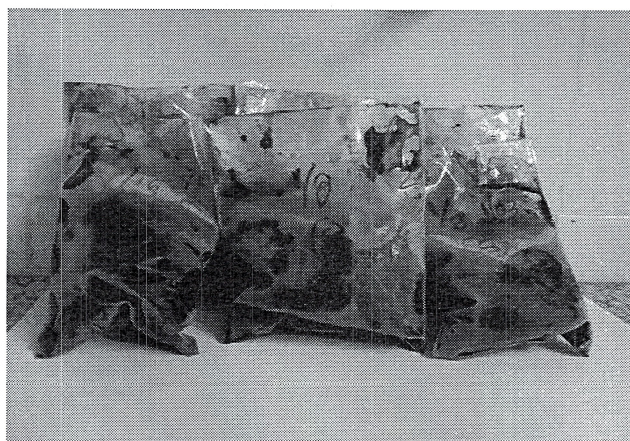


Figura 11. Centrifuga y biomasa húmeda obtenida por centrifugación.

### Secado

La biomasa de *Nannochloropsis oculata* obtenida del proceso de centrifugación, se colocó en una cápsula de Petri, dentro de una estufa marca Dalvo (Figura 12), teniendo en cuenta no superar los 60 ° C para evitar la desnaturalización de lípidos. Pasadas las 24 hs se retiró todo el contenido de humedad y se procedió al raspado de la placa para retirar la biomasa seca de microalgas. Luego se procedió a realizar el análisis de lípidos.

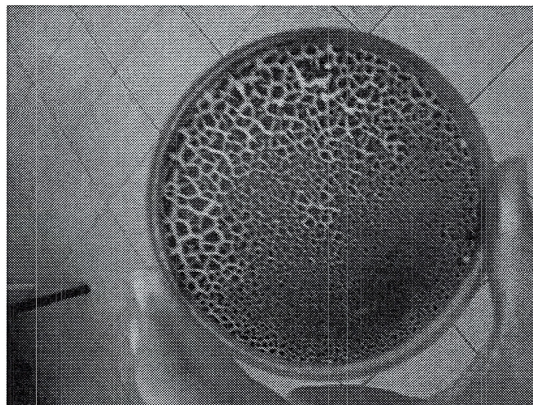
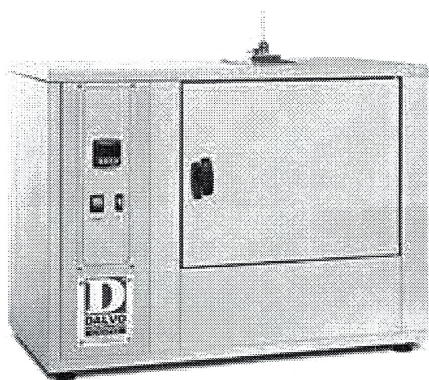


Figura 12. Imagen de la estufa empleada en el secado, y biomasa seca en cápsula de Petri.

### 5.3.2. Metodología de extracción directa de los lípidos

#### **Método de Soxhlet :**

El método consistió en una extracción de lípidos semi-continua con un solvente o mezcla de solventes orgánicos adecuados, según el tipo de lípido a extraer. La marca del equipo utilizado es VELD SCIENTIFICA, modelo SOLVENT EXTRACTOR SER 148, perteneciente al Laboratorio de Análisis de la UTN Mar del Plata (Figura 13).

Preparación de la muestra y extracción de los lípidos: En un cartucho de papel de filtro se colocó la muestra seca y pesada, y se dispuso en el tubo extractor. Se taro el balón del equipo y se lo conectó al mismo. Por la parte superior del tubo extractor se agregó el solvente adecuado (cloroformo), se agregó además alrededor de la mitad del contenido del tubo extractor. Se calentó para que se produzcan al menos 7 ciclos de llenado y sifonado del tubo extractor (durante 2 horas aproximadamente).

Recuperación y eliminación del solvente: Se quito el cartucho del tubo extractor con el resto de la muestra. Se armo nuevamente el equipo y se recuperó el solvente limpio que se acumuló en el tubo extractor. Se colocaron las muestras conteniendo los lípidos unos 10 minutos en estufa y se pasaron para eliminar totalmente el cloroformo residual.

Cálculos: una vez que se conoció la masa de lípidos libre de solvente orgánico, se calculó el porcentaje de lípidos en la muestra teniendo en cuenta la masa inicial de muestra colocada en el cartucho de extracción, el peso de las capsulas de Petri y la biomasa húmeda de *Nannochloropsis oculata*.

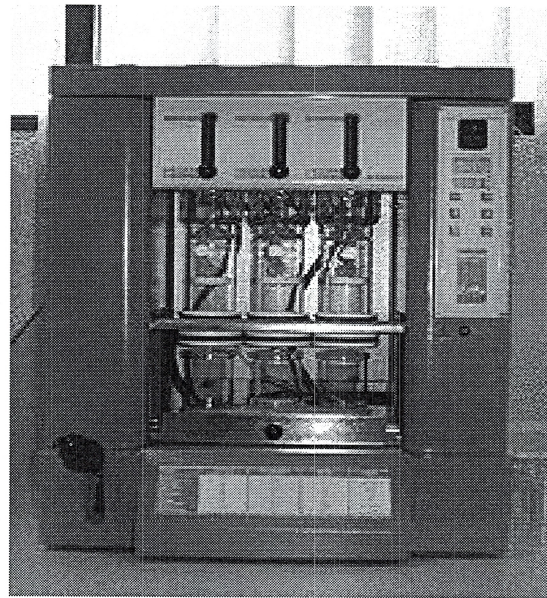


Figura 13. Imagen del equipo Soxhlet utilizado para la extracción de lípidos de la biomasa de *N. oculata*

## 5.4. Resultados

### 5.4.1. Parámetros de los cultivos, ambientales y densidad celular de *N. oculata*

A continuación se muestran tres tablas, una para cada tratamiento, con los parámetros pH, temperatura (T), densidad celular ( $\delta$ ), flujo de luz, temperatura ambiente y estado del tiempo (tablas 2,3 y 4).

#### T1-Cultivo control - 28 ppt

Día	pH	T (°C)	$\delta$ (Cel/ml)	Flujo de luz (Lux)	T Amb (°C)	Estado del tiempo
0			25	20800	17,2	Nublado
1	8,13	10,5	30,1	12000	14,7	Nublado
2	8,37	8,6	32	12700	11,3	Nublado
3	8,26	14,1	38,1	30300	18,9	Despejado
4	8,37	9,3	39,8	10900	12,4	Nublado
5	8,05	7,7	50,2	30200	17,3	Despejado
6	8,10	7,5	60,1	9400	6,9	Nublado
7	8,11	5,7	56,9	27200	12,8	Despejado

Tabla IV. Datos de los parámetros registrados para el cultivo control (T1)

### **T2-Cultivo 25 ppt**

Día	pH	Temp. (°C)	$\delta$ (Cel/ml)	Flujo de luz (Lux)	Temp. Amb. (°C)	Estado del tiempo
0			25	20800	17,2	Nublado
1	8,16	10,4	28,2	12000	14,7	Nublado
2	8,18	8,5	28,8	12700	11,3	Nublado
3	8,22	14,3	33,7	30300	18,9	Despejado
4	8,4	9,4	46,3	10900	12,4	Nublado
5	8,15	7,5	50,5	30200	17,3	Despejado
6	8,13	7,4	54	9400	6,9	Nublado
7	8,04	5,6	52,6	27200	12,8	Despejado

Tabla V: Parámetros registrados para el cultivo de *N. oculata* a 25 partes por mil de salinidad.

### **T3-Cultivo 20 ppt**

Día	pH	Temp. (°C)	$\delta$ (Cel/ml)	Flujo de luz (Lux)	Temp. Amb. (°C)	Estado del tiempo
0			25	20800	17,2	Nublado
1	8,28	10,6	31,3	12000	14,7	Nublado
2	8,32	9,1	44,1	12700	11,3	Nublado
3	8,29	14,7	48,8	30300	18,9	Despejado
4	8,58	9,6	52,4	10900	12,4	Nublado
5	8,35	8,1	51,4	30200	17,3	Despejado
6	8,38	8,2	54,2	9400	6,9	Nublado
7	8,32	6,4	58,2	27200	12,8	Despejado

Tabla VI. Parámetros registrados para el cultivo de *N. oculata* a 20 partes por mil de salinidad.

## 5.4.2. Resultados de las densidades celulares

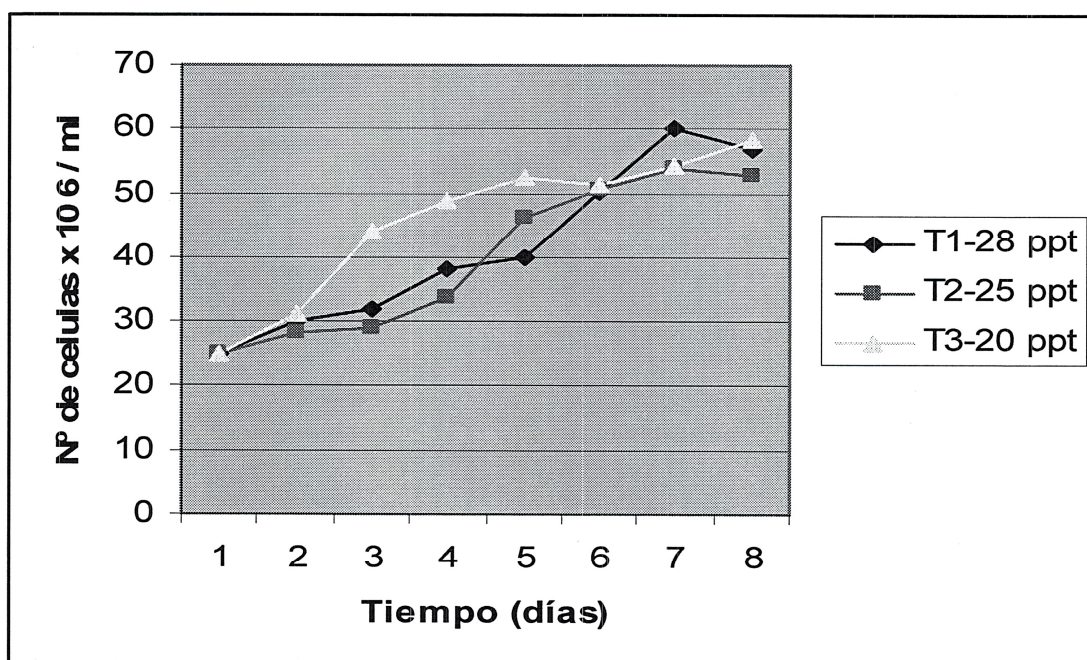


Figura 14. Densidad celular de *Nannochloropsis oculata* en los diferentes tratamientos de salinidad: 20, 25 y 28 ppt, durante la experiencia.

Como se observa en la Figura 14, los datos obtenidos en el tratamiento a 28 partes por mil son similares a los del cultivo a 25 partes por mil, con la excepción que en el día cuatro, la densidad del cultivo a 25 partes por mil es superior a las 40 millones de células por mililitro. Tanto el cultivo a 28 partes por mil como el cultivo a 25 partes por mil, logran llegar a la duplicación de la densidad inicial en el día seis de cultivo. Sin embargo, en el caso del cultivo a 20 partes por mil, el comportamiento es totalmente distinto a los otros dos cultivos, logrando la concentración de 40 millones de células por mililitro en el día dos y llegando a la duplicación de la densidad inicial en el día cuatro. No se observa fase de latencia.

## 5.4.3. Resultados del análisis de la concentración de lípidos

Para obtener los resultados de la concentración de lípidos en los tres tratamientos se realizaron los cálculos que se exponen en las Tablas 5, 6 y 7.

En la tabla VII se encuentran los valores de los pesos de las cápsulas de Petri vacías y de las biomásas de microalgas correspondientes, obtenidas luego del proceso de centrifugación de la biomasa de *N. oculata*.

En la tabla VIII se muestran los resultados de los lípidos extraídos según el método soxhlet.

En la tabla IX se exponen los porcentajes de aceites obtenidos para cada muestra procesada de cada tratamiento de salinidad.

Peso cápsula de Petri vacía (g)	Peso cápsula + biomasa de <i>N. oculata</i> (g)	Tratamiento	Biomasa seca <i>N. oculata</i> (g)
40,0308	41,0733	T1-28 partes por mil	1,0425
42,6968	44,0449	T2-25 partes por mil	1,3481
40,2483	41,2427	T3-20 partes por mil	0,9944

Tabla VII. Cápsulas de Petri vacías, cápsulas de Petri + biomasa y biomasa seca de *N. oculata* para cada tratamiento.

Peso vaso vacío (g)	Peso vaso + lípidos obtenidos (g)	Tratamiento	Lípidos obtenidos (g)
74,5782	74,6586	T1-28 partes por mil	0,0804
75,7508	75,8416	T2-25 partes por mil	0,0908
76,1218	76,1826	T3-20 partes por mil	0,0608

Tabla VIII. Peso vaso vacío, peso vaso + lípidos obtenidos y lípidos obtenidos por el método soxhlet.

Porcentaje de lípidos por tratamiento	
Salinidad del tanque	Porcentaje
T1-28 partes por mil	7,71%
T2-25 partes por mil	6,73%
T3-20 partes por mil	6,11%

Tabla IX. Porcentaje de lípidos extraído para cada tratamiento de salinidad en cultivos de *N. oculata*..

## 5.5. Discusión y conclusiones

Las microalgas constituyen una fuente alternativa potencial para la producción de biodiesel. Rodolfi *et al.*, (2009), investigaron 30 especies para seleccionar aquellas con alta productividad en biomasa y alto contenido de lípidos, encontrando que *Nannochloropsis* sp es particularmente promisorio.

Estudios recientes se han enfocado en aumentar la concentración de lípidos mediante la alteración de condiciones de cultivo, como la temperatura, concentración de nutrientes (principalmente nitrógeno) y salinidad. El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90% del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo (Spolaore *et al.*, 2006; Chisti, 2007). Cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos y físicos, solos o en combinación, ocurre síntesis y acumulación de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos.

La microalga marina *Nannochloropsis oculata* es altamente productiva, con importantes concentraciones de aceites en cultivos realizados en "ponds" abiertos y ubicados en el exterior.

En la ciudad de Mar del Plata, Argentina, se ha llevado a cabo con éxito el cultivo masivo de *N. oculata* en un sistema exterior (Pérsico *et al.*, 2011) y se han evaluado diferentes métodos de extracción de lípidos para su apropiación industrial (Lospennato *et al.*, 2012).

La biomasa y composición bioquímica de las algas tiende a decaer con cambios rápidos de salinidad (Schenk *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2012). También se ha reportado que altas salinidades inhiben el crecimiento y acumulación de lípidos en *Dunaliella* sp (Takagi *et al.*, 2006). Se ha observado en tanques con cultivos de esa especie ubicados a la intemperie en la UTN Mar del Plata que debido a precipitaciones intensas que producen una disminución de salinidad de 28-30 a 23 ‰, los cultivos se pierden y no se pueden recuperar. Procesos de evaporación también han ocasionado la pérdida de cultivos en la estación estival. Estos sistemas entonces están influidos por cambios repentinos de salinidad, ocasionados por procesos de evaporación y precipitaciones (Schenk *et al.*, op.cit.).

Na Gu *et al.*, 2012, han reportado que el crecimiento de *Nannochloropsis oculata* es mayor para tratamientos con valores de salinidad de 35g/l, 25g/l y 15g/l con respecto a valores comprendidos entre 45g/l y 55 g/l.

Durante este trabajo los cultivos sufrieron leves modificaciones de volumen que fueron debidas a evaporación (menores de 10 litros), al encontrarse protegidos por un invernadero y realizarse durante la estación invernal.

Las densidades celulares alcanzadas al final de la experiencia (ocho días) en los distintos tratamientos (T1- 28‰; T2- 25‰ ; T3- 20‰) estuvieron dentro del rango 50-60 millones de células/ml, siendo en T3 > T1 > T2. Se debe aclarar que a los siete días de experiencia se alcanzó el mayor valor de

densidad celular, correspondiente al control (T1) con 60 millones de células/ml. Si bien se han reportado densidades mayores en el mismo año o en otros anteriores para el tratamiento control dentro de la estación invernal, se deben tener en cuenta la influencia de factores ambientales como flujo de luz y temperatura, los cuales no son controlados para el periodo de estudio correspondiente y son muy variables.

En cuanto a la concentración de lípidos los resultados fueron:  $T1 > T2 > T3$ . Sin embargo, estas diferencias no se consideran significativas y son bajas, considerando los valores obtenidos por efecto de déficit de nutrientes en primavera y verano (Beligni *et al.*, 2012); en ese trabajo las productividades lipídicas estacionales fueron variables, debido a efectos del clima sobre la división celular.

La presente experiencia realizada en invierno deberá repetirse para obtener réplicas y además en otras estaciones del año, ya que en la ciudad de Mar del Plata, Argentina, las condiciones climáticas son muy variables, inclusive dentro de la misma estación.

Si bien los resultados del efecto de salinidad no mostraron diferencias significativas en la concentración de lípidos en los diferentes tratamientos, se tratará de experimentar, además, con valores más elevados y observar cómo afectan la densidad celular de *N. oculata*, ya que se debe lograr un balance entre biomasa y concentración de lípidos.

## 6. Bibliografía

- Barnabé, G. 1991. La captura de las microalgas. En: Acuicultura. Editorial Omega, Barcelona. 1(4): 165-169.
- Beligni M.V., Pérsico M.M., Tranier E.D., M.A. Palomeque M.A., Zanazzi A.N. y González S.M. 2012. Optimización de la producción de aceites para biodiesel en cultivos exteriores de *Nannochloropsis oculata*, en la ciudad de Mar del Plata. Argentina y Ambiente 2012. I Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental y I Congreso de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental. 28 de mayo al 1 de junio de 2012. Mar del Plata. Argentina.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*. 25, 294-306.
- Col Morales, J. 1983. Acuicultura Marina Animal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 670 pp.
- Lospennato, M., Sequeira, A., Beligni, M.V., Chamorro, E. 2012. *Nannochloropsis oculata*: Evaluación de métodos de extracción de triglicéridos saponificables para la apropiación industrial. II Jornadas en Ingeniería del NEA y países limítrofes. "Hacia dónde van la Ciencia y la Tecnología en el Mercosur". 6 pp.



- Lubian, L.M., y Establier, R. 1983. Variaciones cuantitativas de los pigmentos de *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae) durante su crecimiento. *Invest. Pesq.* Vol.47: 29-38.
- Na Gu, Qiang Lin, Gang Li, Geng Qin, Junda Lin, Liangmin Huang. 2012. Effect of Salinity Change on Biomass and Biochemical Composition of *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the World Aquaculture Society.* 43(1) 97–106.
- Pérsico, M.M.. 2008. Cultivos accesorios: Cuadernillo de estudio de la cátedra. Cultivos Acuáticos II. Tecnicatura en Acuicultura y Procesamiento Pesquero. UTN Mar del Plata.
- Pérsico, M.M., Beligni, V., Bambill, G., Lucero, M., Saubidet, A. 2010. Barros cloacales como fuente de nutrientes para el cultivo masivo de *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd. En: Memorias Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (SOLABIAA). 2(1): 30-48.
- Pérsico, M.M., Moris, M., Tranier, E., Zanazzi, A.N., Saubidet, A.A., Beligni, M.V. 2011. Evaluación de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (Relbaa)*. 2(1), 30-48.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 1(2):87-96.
- Takagi, M., Karseno, S., Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 101(3):223-6.
- UNESCO. 1981a. Escala práctica de salinidad 1978 y la Ecuación Internacional de estado del agua de mar 1980. *Tech. Pap. Mar. Sci.*, 36: 25 pp.
- UNESCO. 1981b. Documentos de base y datos en la Escala Práctica de Salinidad 1978. *Tech. Pap. Mar. Sci.*, 37: 144 pp.

## **7. Agradecimientos**

Agradezco a mi directora de tesis por sus correcciones y su apoyo constante, a mis compañeros del Laboratorio de Acuicultura de la UTN Mar del Plata, por su colaboración en las actividades realizadas para el desarrollo de mi trabajo final, y a la Sra. Directora de la Universidad Tecnológica Nacional, Unidad Académica Mar del Plata, Lic. Juana Bau, por haberme brindado la posibilidad de llevar adelante este trabajo final para optar al título de Técnico en Acuicultura y Procesamiento Pesquero en esta Institución.