

**Universidad Tecnológica Nacional
Mar del Plata**

**Carrera: Tecnicatura Superior en Acuicultura y
Procesamiento Pesquero**

**Tema de Práctica
"Cultivo masivo de microalgas marinas"**

Alumno: Nahuel Zanazzi

Profesor tutor: Lic. María Marta Pérsico

Año: 2010

INDICE

Marco teórico y trabajo experimental

1. Introducción a las Microalgas

- 1.1. Aspectos biológicos generales
- 1.2. Reproducción
- 1.3. Fotosíntesis
- 1.4. Aplicaciones en la Acuicultura
- 1.5. Otras aplicaciones. Biocombustibles

2. Criterios de selección de microalgas. Clases y especies más utilizadas en Acuicultura

3. Instalaciones y procedimientos generales para el cultivo de microalgas

- 3.1 Instalaciones
- 3.2 Procedimiento general para el cultivo de microalgas
- 3.3 Formas de cosecha de un cultivo
- 3.4 Aislamiento y purificación
- 3.5 Desinfección y esterilización

4. Crecimiento de una población microalgal

- 4.1. Requerimientos físico-químicos
- 4.2. Composición del agua de mar
- 4.3. Gases disueltos
- 4.4. Medida del crecimiento
- 4.5. Medios de cultivo

5. Trabajo experimental.

Experiencia de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* con medios alternativos: uso de barros cloacales como fuente de nutrientes

6. Bibliografía

1. Introducción a las Microalgas

1.1. Aspectos biológicos generales

Las microalgas son organismos unicelulares, planctónicos y autótrofos, cuyo tamaño es de 2-100 μ . Constituyen el primer eslabón de la cadena alimentaria, por lo cual son producidas como alimento directo de organismos acuáticos: moluscos bivalvos (fitófagos durante todo su ciclo de vida), crustáceos (primeros estadios larvales) y zooplancton (rotíferos y *Artemia*) utilizado en el cultivo larval de peces marinos. Además contribuyen a la estabilidad físico-química del agua.

También se consideran microalgas las algas filamentosas y coloniales de un número pequeño de células.

La importancia del cultivo de microalgas se debe a la posición que ocupan en la pirámide alimentaria, constituyendo el "cuello de botella" en operaciones de acuicultura.

En la Figura 1 se observa un esquema que representa el cultivo y las posibles aplicaciones de las microalgas.

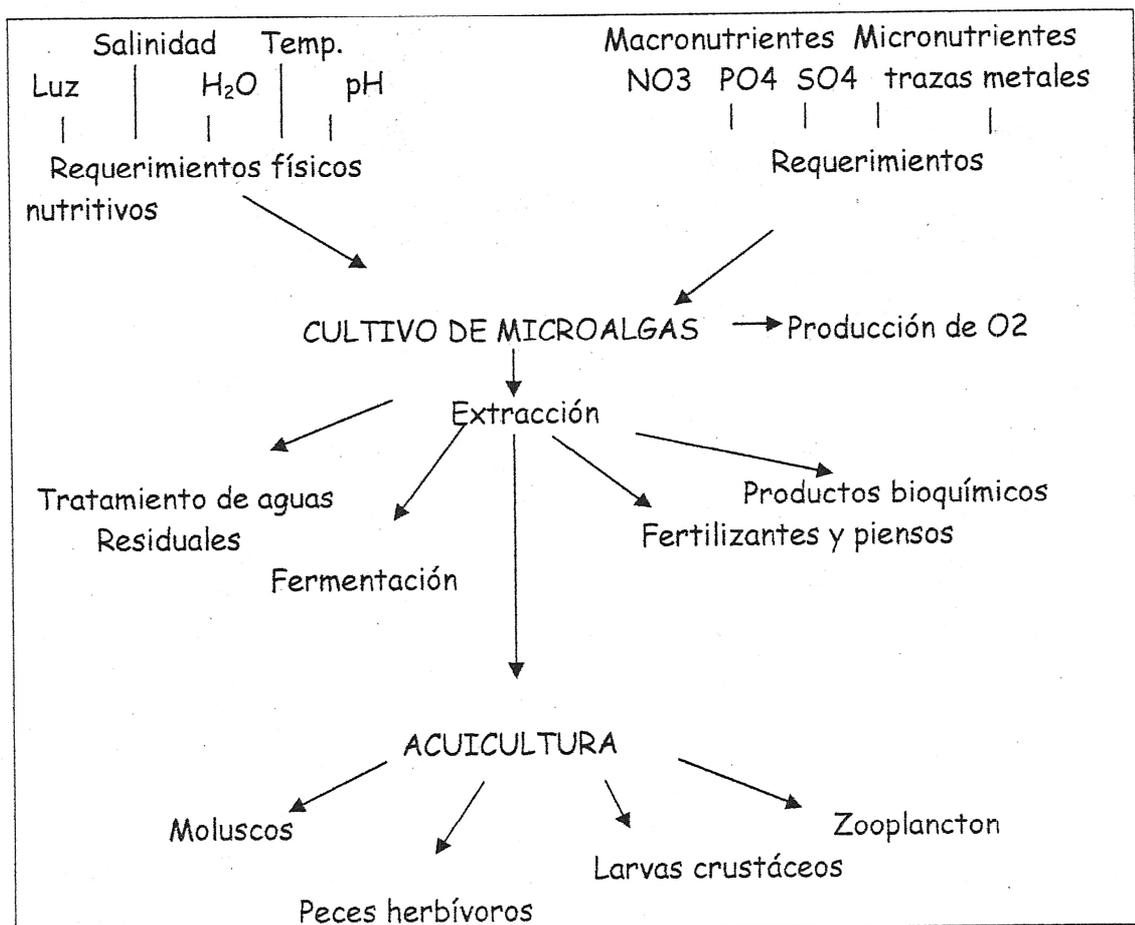


Figura 1. Esquema que representa el cultivo y las aplicaciones de las microalgas.

1.2. Reproducción

La reproducción de microalgas se lleva a cabo en condiciones óptimas por ciclos de división celular mediante mitosis (bipartición o fisión binaria), seguidos de aumento del volumen celular. Así a partir de una célula madre se genera una población de células genéticamente idénticas o clones. En condiciones especiales las células pueden reproducirse por meiosis, resultando células que funcionan como gametos. Estos se fusionan dando una célula 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.

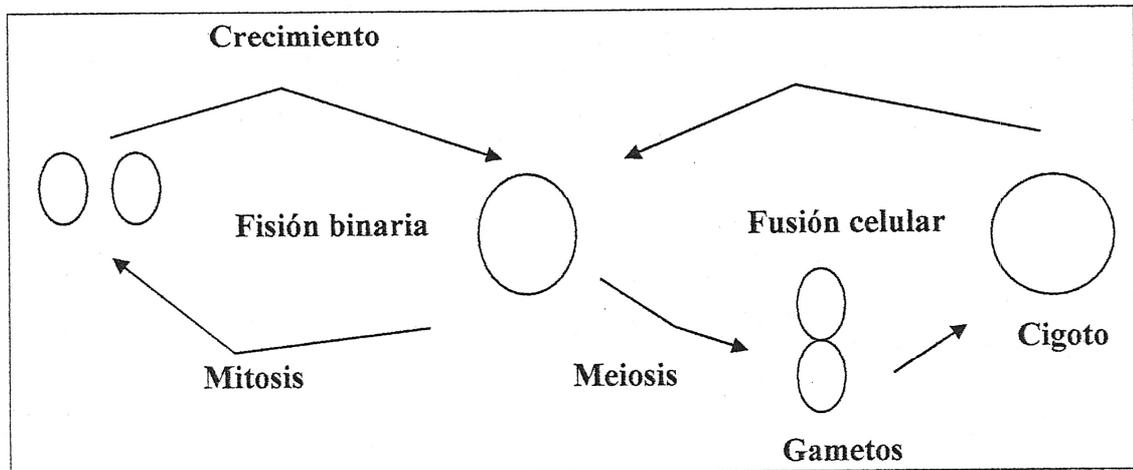
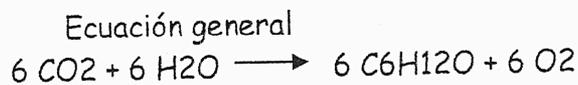


Figura 2. Esquema de los ciclos de reproducción asexual (fisión binaria) y sexual (fusión celular) de las microalgas en general.

1.3. Fotosíntesis

La fotosíntesis algal es básicamente el mismo proceso que ocurre en las plantas terrestres. 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 menor longitud, 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.



La adición de 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 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \longleftrightarrow \text{CO}_3\text{H}_2 \longleftrightarrow \text{CO}_3\text{H}^-$)

La deficiencia de 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.

1.4. Aplicaciones en la Acuicultura

El desarrollo de la acuicultura viene condicionada 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 de cualquier cultivo. Dentro del fitoplancton, 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 Crisofíceas, Bacilarofíceas y Clorofíceas, las cuales poseen características nutricionales excepcionales, principalmente gracias a su alto contenido en proteínas y relativamente fuertes en ácidos grasos poliinsaturados, ambos componentes esenciales para la alimentación de los animales marinos.

En función de los criterios de selección 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*.

1.5. Otras aplicaciones de las microalgas. Biocombustibles

El Sol constituye una fuente de energía casi inagotable, cuya radiación solar se aprovecha para producir cultivos como alimento y combustibles; pero la superficie terrestre apta para cultivos es muy limitada. Las microalgas pueden crecer en medio acuoso, en piletas ubicadas en tierras áridas, no necesitan herbicidas y permiten utilizar aguas subterráneas, de río o de mar. Se destacan por su alta eficiencia fotosintética, rápido crecimiento, posibilidad de ser cultivadas en gran escala, costo asociado con su cultivo y transporte relativamente bajo comparado con los cereales, crecer en condiciones no aptas o desfavorables para los cereales, ser capaces de

producir mucho más a igual superficie y fijar grandes cantidades de CO₂, lo que facilita su reducción en la atmósfera. La microalga Spirulina es una primitiva alga unicelular que contiene en promedio entre 60-70 por ciento de proteínas de fácil digestividad, 15-25 por ciento de hidratos de carbono, 7-13 por ciento de minerales y una importante cantidad de vitaminas. La spirulina en polvo es un alimento integral. Por su valor nutritivo y bajo costo se la recomienda para tratamientos de poblaciones con fuerte grado de desnutrición. La necesidad de obtener aceite para biodiésel a gran escala tecnológica llevó a experimentar con distintas microalgas en condiciones particulares para producir entre un 50-70 por ciento de su peso seco de aceite. Hasta ese momento los algacultores trabajan en pequeña-mediana escala fundamentalmente para elaborar productos farmacéuticos. Así muchas empresas cultivan spirulina y la comercializan como suplemento dietario de gran valor nutricional.

Los altos precios mundiales de los combustibles sumados a los graves perjuicios ambientales por la emanación de dióxido de carbono (CO₂) constituyen un gran estímulo para la búsqueda de alternativas energéticas a los combustibles fósiles por parte de los especialistas. Entre las posibilidades más representativas se encuentra la producción de biodiesel a partir del aceite obtenido de las microalgas (Figura 3).

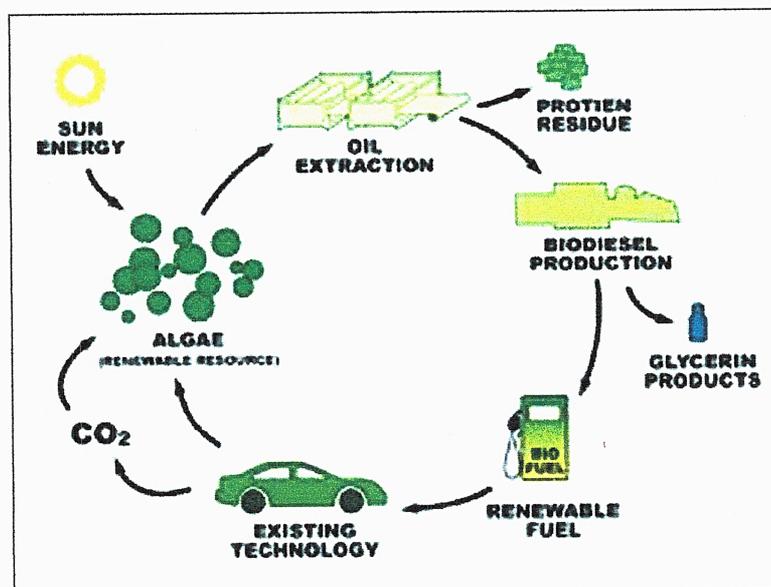


Figura 3. Generación y uso de biodiesel a partir de microalgas.

Las microalgas son mayoritariamente habitantes de distintos ambientes acuáticos. Las aproximadamente 50 especies estudiadas hasta el momento (sólo el 1,5 por ciento de las existentes) dan origen, entre otros, a bioproductos relacionados con

la industria farmacéutica y cosmética, la alimenticia, la de producción de fertilizantes, el acondicionamiento de suelos para agricultura y la depuración de aguas residuales.

Si comparamos en forma relativa, el volumen de aceite producido anualmente a partir de una misma superficie, para distintas fuentes, tomando al maíz como 1,0, la soja tendría un valor de 2,7, el girasol 6,6, la calza 7,0, la palma 35,2 y las microalgas entre 270 y 850.

Las microalgas son capaces de producir más de 25 veces la cantidad de aceite (por año por unidad de área de tierra) cuando se la compara contra las mejores fuentes terrestres productoras de aceite.

Las microalgas son fuentes alternativas de energía que pueden ser cultivadas en agua salada de baja calidad o en aguas residuales cargadas de nutrientes, lugares donde no hay cantidad o calidad de suelos para realizar los cultivos alimenticios convencionales.

En la Tierra, el agua cubre un 71 por ciento de su superficie: el 97 por ciento es agua de mar. A futuro debemos considerar no sólo un aumento en el consumo de cereales debido al incremento de la población mundial, sino también la paulatina fusión del hielo polar y un aumento del nivel del mar, responsable de la inundación de las regiones bajas fértiles con la consiguiente disminución del área cultivable. Queda por analizar la conveniencia o no, según cada región, de desarrollar este tipo de cultivos de modo de lograr mayor cantidad de aceite para incrementar la producción de biodiesel a nivel mundial.

2. Criterios de selección de microalgas. Clases y especies más utilizadas en Acuicultura

Las microalgas pueden ser procariontes (Reino Monera) o eucariontes (Reino Protista). Las más utilizadas en Acuicultura son algas verdes y diatomeas.

Su selección y uso depende de sus características en cuanto a valor nutritivo, capacidad de crecimiento, ciclo de vida, tolerancia a variación de factores ambientales, digestibilidad, tamaño, etc.

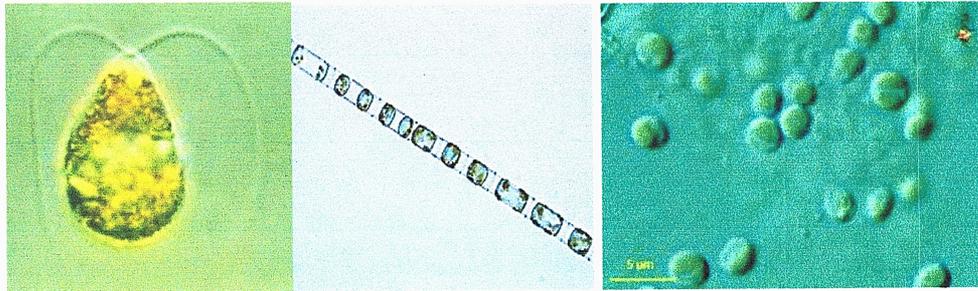


Figura 4 : *Dunaliella sp.*, *Skeletonema sp.* y *Nannochloropsis oculata*.

A continuación se describen las características de algunas de las microalgas más utilizadas en criaderos de Acuicultura tanto por su valor nutritivo, facilidad de cultivo y tamaño; algunas se observan en la Figura 4.

Clase Bacillariophyceae

Skeletonema costatum: Es una diatomea planctónica marina y de aguas salobres. Las células son de color café y con un diámetro promedio de 5-8 micras. Tiene una reproducción sexual y asexual. Es euritermica, eurihalina y tolera un amplio rango de intensidades de luz. Se cultiva a temperaturas de 15-25 grados centígrados y a salinidades de 18-35 partes por mil.

Se utilizan ampliamente para alimentar los primeros estadios lábreles de crustáceos.

Clase Eustigmathophyceae

Nannochloropsis sp. : Es una pequeña microalga de 2-8 micras de diámetro. Son células redondeadas, de color verdoso-amarillo, sin flagelos. Esta especie es euritérmica, eurihalina y fácilmente adaptable a condiciones ambientales diferentes, lo cual es evidenciado por su frecuente dominancia en cultivo al exterior. Su máxima tasa de crecimiento se encuentra entre salinidades de 28-30 partes por mil. Se ha probado que es un alimento confiable para productores secundarios como rotíferos, copepodos, etc.

Chlorophyceae

Chlorella sp. : Microalga de color verde de 8-10 micras de diámetro. Es eurihalina y euritermica. Las condiciones óptimas de cultivo se encuentran entre 18-25 grados centígrados 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 langostinos, camarones y rotíferos.

Dunaliella sp. : son 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 ± 1 °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 le considera como un buen alimento para bivalvos, crustáceas, microinvertebrados y ciertos peces de agua dulce.

Clase Haptophyceae

Isochrysis galbana : son 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 grados centígrados, a una salinidad de 25-28 partes por mil y una iluminación de 4000 lux. Su alto valor nutritivo la sitúa entre las especies más importantes para la alimentación de bivalvos marinos.

3. Instalaciones y procedimientos generales para el cultivo de microalgas

3.1. Instalaciones

- a. *Sala o Laboratorio de Cultivo*: Se recomienda para fines de mantenimiento de cepas, transferencias sucesivas de cultivos, crecimiento de cultivos en pequeños y medianos volúmenes.
 - 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).
 - Instalaciones tipo invernadero (ventanas de cristal o plástico con temperatura controlada).
- 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. 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. En zonas de clima templado se pueden desarrollar éstos a la intemperie, cubriendo los recipientes en caso de lluvia.



Figura 5. Cultivo masivo de *Nannochloropsis oculata* en tanques de fibra de vidrio dentro del invernadero de microalgas de la Universidad Tecnológica Nacional Mar del Plata.

3.2. Procedimiento general en el cultivo de microalgas

1. Mantenimiento de cepas (stocks)
 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 y de esterilidad (500-1000 lux; 15-18°C).
 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 en forma periódica y suave.
 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. Ejemplos de Laboratorios de mantenimiento de cepas y cultivos iniciadores e intermedios.

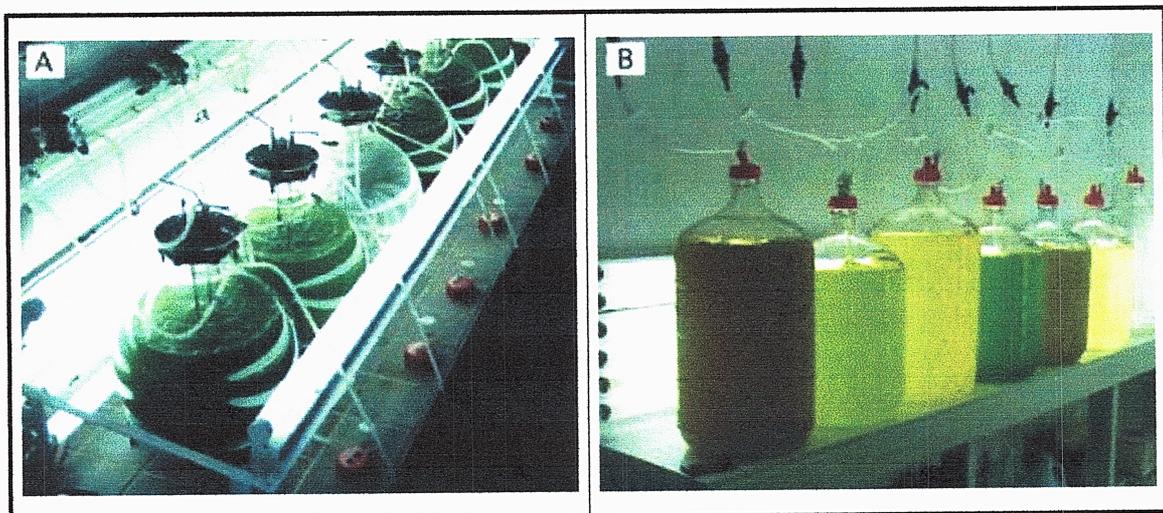


Figura 7. Recipientes con cultivos de microalgas a escala intermedia: A - Matracas redondos de 20 l de capacidad; B - Botellones de 15 a 20 l de capacidad

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. Es importante tener en cuenta la adición de CO_2 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.

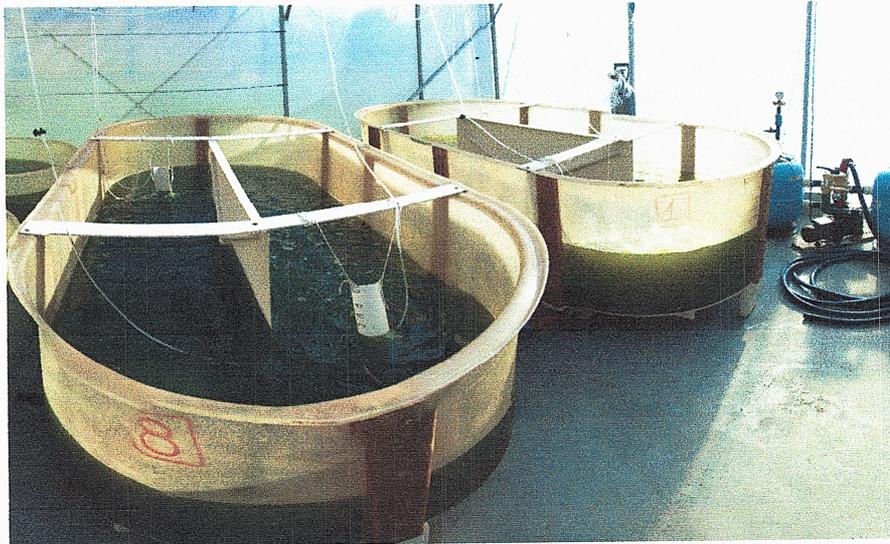


Figura 8. Cultivo masivo de microalgas en tanques barrow de fibra de vidrio dentro del invernadero de la UTN Mar del Plata.

3.3. Métodos de cultivo

Según la forma de cosechar las microalgas los cultivos se clasifican en:

Cultivos Continuos: La población algal, las características químicas del medio, la temperatura y finalmente la luz son mantenidas en un valor constante por periodos prolongados, procurando un flujo sostenido de requerimientos y de salida del producto.

Cultivos Batch: Estos cultivos son intermitentes, se implementan de una sola vez y son cosechados completamente después que la producción algal alcanza un nivel apropiado. En el momento de la cosecha el cultivo debe estar en la fase exponencial.

Cultivos Semicontinuos: Aquí se cosecha una parte del medio según la producción y se renueva el volumen cosechado por medio de un cultivo fresco.

3.4. Aislamiento y purificación de microalgas

1. Aislamiento
2. Purificación

1. Entre los métodos más utilizados se encuentran: pipeta capilar, rallado en agar (Figura 10), diluciones sucesivas (Figura 9), etc.

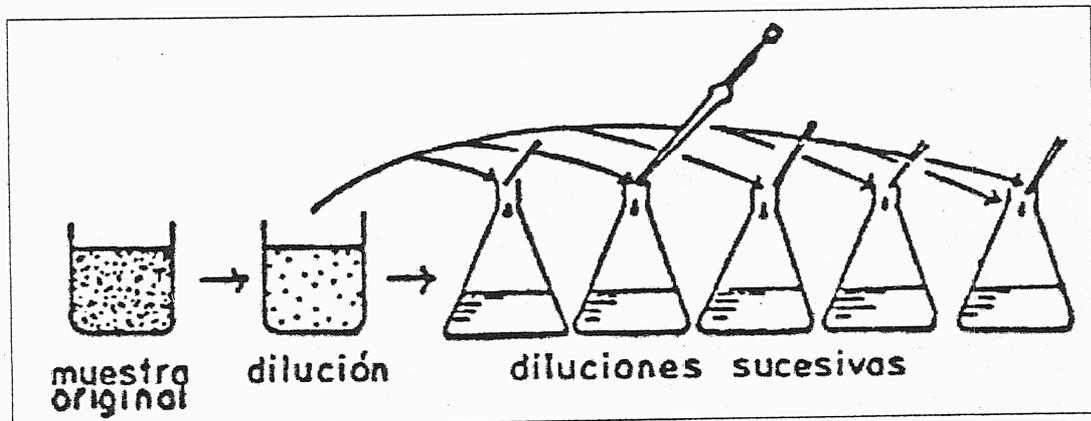


Figura 9. Técnica de aislamiento de diluciones sucesivas.

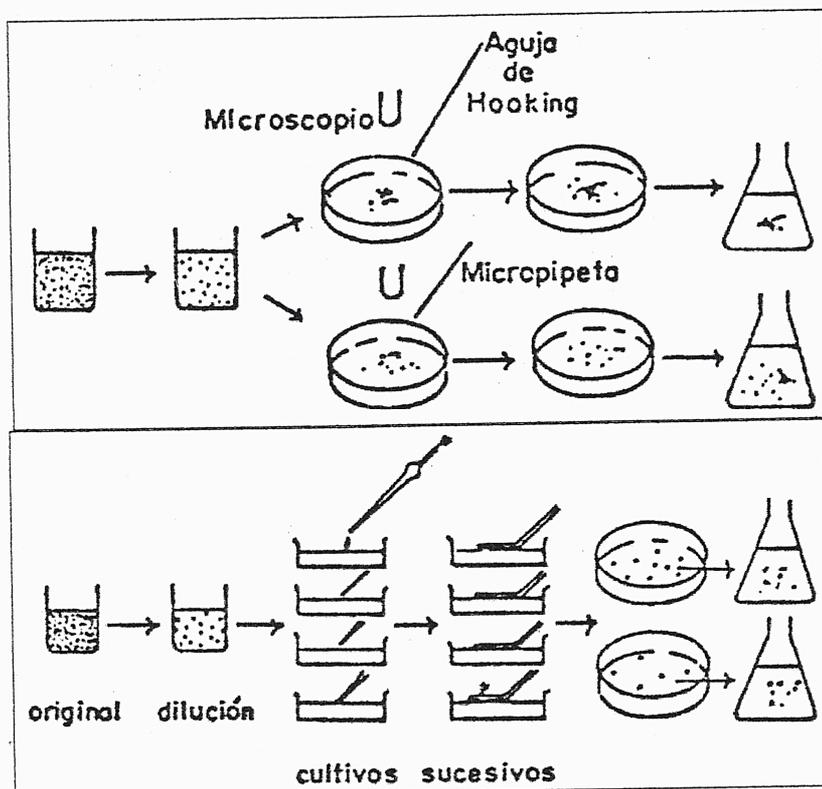


Figura 10. Técnica de rallado en agar.

2. La presencia de microorganismos contaminantes pueden eliminarse o inhibirse *in situ* mediante procedimientos químicos. Pueden utilizarse antibióticos (penicilina, estreptomina). Deben realizarse pruebas bacteriológicas y chequear los cultivos después de 2-3 semanas de crecimiento. Debe tenerse en cuenta el tiempo de exposición de las algas al tratamiento.

3.5. Desinfección y Esterilización

Desinfección significa reducción del número de bacterias hasta un nivel aceptable (bacteriostático).

Esterilización significa inactivación de todos los microorganismos (bactericida).

Desinfectantes no volátiles: formaldehído, fenol, alcohol al 70%, hipoclorito, etc.

Mecanismos de esterilización:

El calor húmedo es la forma más utilizada, para medios y materiales que de presión).

- Autoclavado: el tiempo requerido varía según el volumen a autoclavar: 100 ml requieren 10'; 2 litros, 20' y 5 litros aproximadamente 35'. Todo el aire debe salir del autoclave.
- Baño en agua hirviendo: sólo para emergencias
- Filtración: volúmenes de medios para cultivos iniciales e intermedios pueden esterilizarse con unidades de filtración al vacío y membrana de 0,5u de diám. de poro. Para grandes volúmenes, de 125 mm de diám. de poro.
- Cloración: utilizada para volúmenes de agua mayores de 10 litros.

- Esterilización del agua de mar por cloración

Para esterilizar grandes volúmenes de agua uno de los métodos más prácticos es esterilizar con cloro. 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 que no daña a los organismos a cultivar.

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 en lo posible.

4. Crecimiento de una población microalgal

4.1. Requerimientos físico-químicos

Luz

Tipos: natural (luz del sol) o artificial. Cada grupo de algas tiene un espectro de luz favorable para su crecimiento, reproducción y morfología.

Periodo de exposición: 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.

Temperatura

El grado de fotosíntesis es mayor cuando la temperatura sube al máximo de aceptación, pero disminuye agudamente con elevados aumentos 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/CO₂, adición de productos químicos, uso de tampones (sistema carbonato-bicarbonato). La fotosíntesis provoca un aumento de pH que se ha de contrarrestar aumentando el CO₂; 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 CO₂.

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 O₂ 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.

Todos estos factores no son independientes sino que se influyen mutuamente.

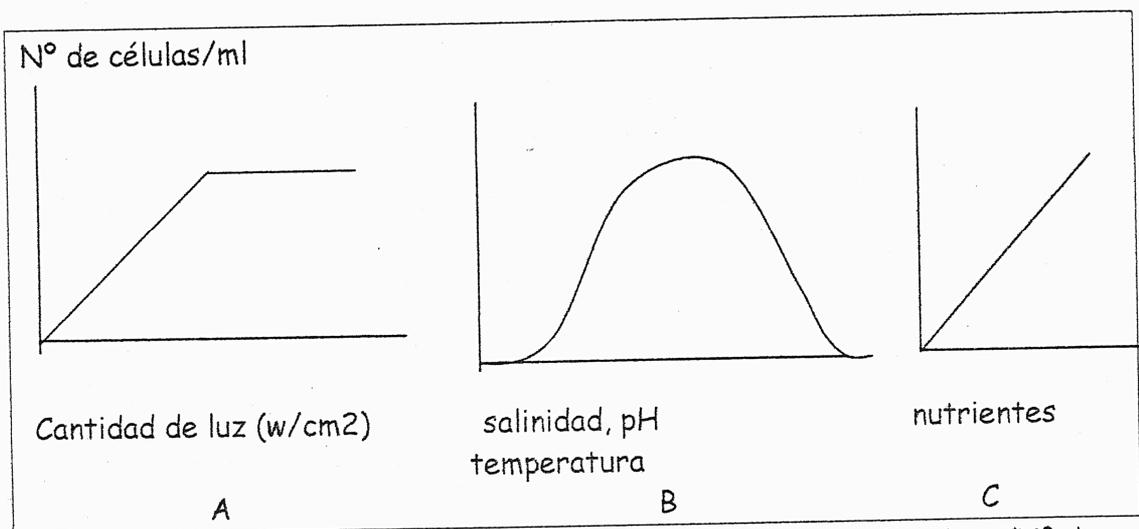


Figura 11. Tipos de relaciones generales entre crecimiento de las algas (Nº de células/ml) y variables de cultivo.

4.2. Componentes del agua de mar

Los componentes mayores del agua oceánica ($S = 35$ UPS; $pH = 7,8$), se muestran en la Tabla 1.

CONSTITUYENTES	g/Kg.
Sodio	10,77
Magnesio	1,30
Calcio	0,412
Potasio	0,399
Estroncio	0,008
Cloruro	19,34
Sulfato	2,71
Bromuro	0,067
Carbono, bicarbonato	0,028

Tabla 1. Componentes mayores del agua de mar.

Los componentes menores del agua de mar ($S = 35$ ups) se observan en la Tabla 2.

Elemento	Abundancia mg/l	Forma
N	0,5	NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , N_2 , comp.orgánic.
F	1,3	F^-
Al	0,01	$AlSO_4$, Al^+
Si	3	$Si(OH)_4$, $Si(OH)_3^-$
P	0,07	PO_4H_2 , PO_4H_3 , PO_4^-
Mn	0,02	Mn^{2+} , SO_4Mn
Fe	0,01	$Fe(OH)_3$
Co	0,0005	Co^{2+} , SO_4Co
Cu	0,003	Cu^{2+} , SO_4Cu
Zn	0,01	Zn^{2+} , SO_4Zn

Tabla 2. Componentes menores del agua de mar.

- Fórmulas para el cálculo de salinidad:

Se debe comprobar que la salinidad sea la adecuada para la especie que deseamos cultivar. Para trabajar con agua de mar de menor salinidad podemos calcular los litros de agua dulce que debo agregar, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen agua dulce} = \frac{\text{Volumen de agua} \times \text{salinidad agua de mar}}{\text{Salinidad deseada}} - \text{Volumen agua dulce}$$

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

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

4.3. 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 CO₂, el cual está presente como iones bicarbonato, CO₂ disuelto y CO₃H₂. A nivel de la superficie del mar el CO₂ disuelto tiene a equilibrarse con el atmosférico y así los océanos actúan como reguladores de la cantidad de CO₂ 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 NO₂⁻, NH₃, NO₃⁻ y NH₄⁺. 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. El fósforo aunque es un constituyente menor del agua es un limitante de la productividad en un ecosistema acuático.

4.4. Medida del crecimiento del cultivo

Para determinar la densidad de células de una población algal (Nº 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.

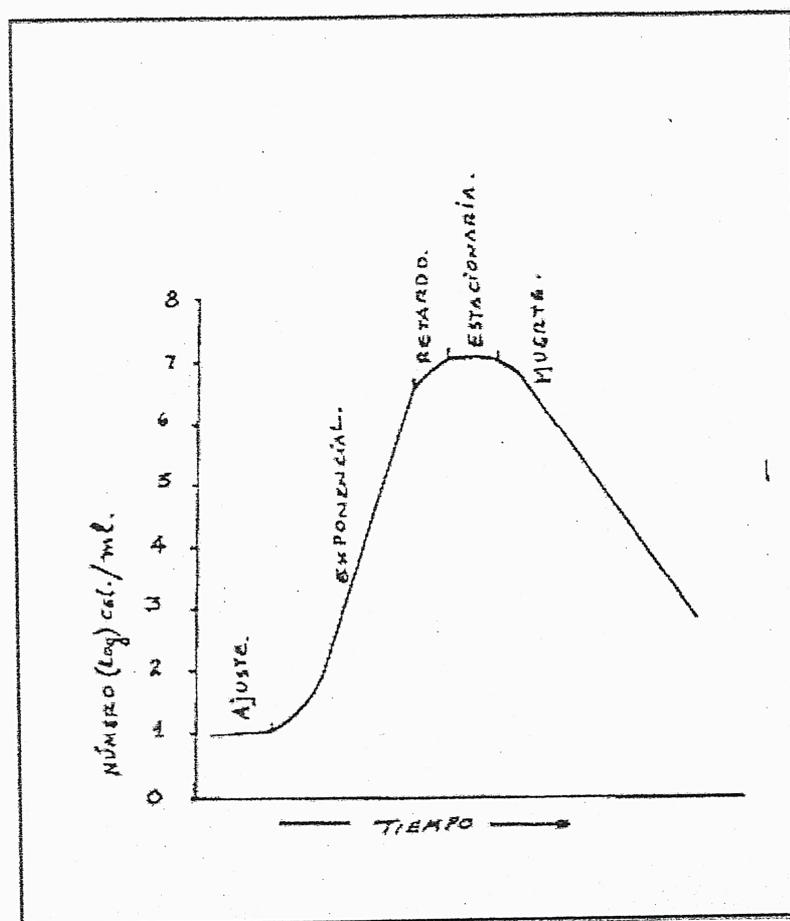


Figura 12. Fases del desarrollo de un cultivo de microalgas.

- Conteo del número de células de un cultivo

Para determinar la concentración de fitoplancton 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 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 12×12 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 $0,05 \times 0,05\text{mm}$.

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

- *Uso del hemocitómetro*

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 hemocitómetro 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. 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: 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 ul (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

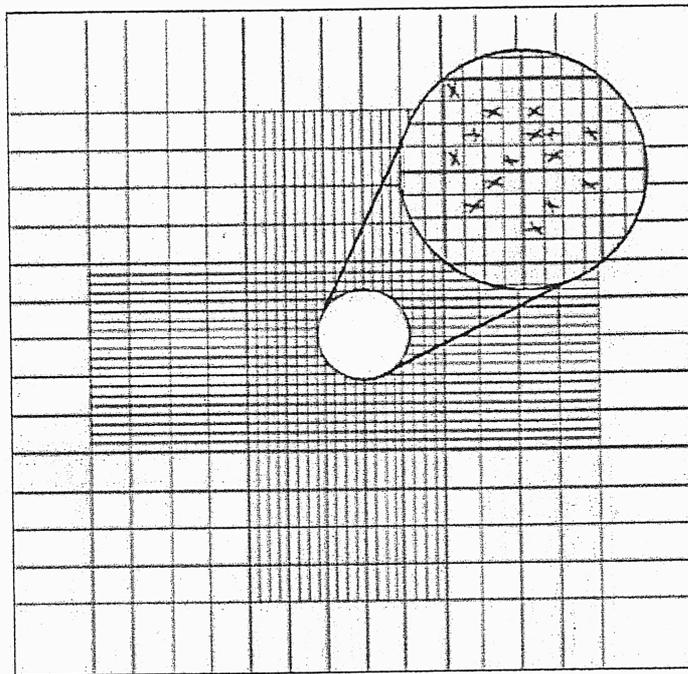


Figura 13. Diagrama de la rejilla marcada sobre un porta hematocitómetro.

4.5. 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 (Tabla 3).

<u>Nutrientes Mayores</u>		<u>Solución Primaria</u>
NaNO ₃	7.5	% w/v
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.5	% w/v
NH ₄ Cl	2.65	% w/v
Na ₂ SiO ₃ ·9N ₂ O	3	% w/v (calentar para disolver)

Usar un mililitro de estas soluciones por litro de agua de mar, para preparar el medio f/2. Sugerencia: Preparar el NaNO₃ junto con NaH₂PO₄·H₂O en 100 mililitros. La solución de silicatos se utiliza para el cultivo de diatomeas.

<u>Metales Trazas</u>	<u>Solución Primaria</u>
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.98 % w/v
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2 % w/v
ZnCl ₂	1.05 % w/v
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 % w/v
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18 % w/v
Na ₂ MnO ₄ ·2H ₂ O	0.63 % w/v

Es conveniente hacer las soluciones primarias en forma individual, y con una concentración menor de 10⁶ más concentrada que en el medio f/2.

Tabla 3. Medio de cultivo f/2 utilizado para el cultivo de microalgas marinas.

Equipos necesarios: autoclave, balanza analítica, balanza granera, pHmetro 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.

Agua de mar: debe provenir de mar afuera o de aguas costeras libres de contaminación y debe ser filtrada con membrana millipore(0,45um). Puede conservarse en recipientes plásticos (polietileno) o vidrio. Cuando es nuevo debe ser curado con ClH varios días y luego enjuagarse bien con agua de llave. Para el material de vidrio pequeño con agua destilada como paso final del enjuague. El agua debe almacenarse en lugar fresco y oscuro.

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.

5. Experiencia de cultivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* con medios de cultivo alternativos de bajo costo: barros cloacales primarios.

Resumen

Los residuos cloacales se producen en grandes volúmenes en Mar del Plata, por lo cual éstos pueden ser un medio de cultivo alternativo para las microalgas por su alto contenido de carbono, nitrógeno y fósforo. Los barros cloacales pueden suplir a los medios de cultivo masivos basados en fertilizantes agrícolas y en otros medios de cultivo orgánicos ya probados, como extracto de gallinaza (8), ensilado biológico de pescado (4). Se cultivó *Nannochloropsis oculata* (Eustigmaphyta) en lote hasta alcanzar la fase estacionaria. Las experiencias se realizaron en el mes

de abril del 2010, correspondiente a la estación de otoño. Se compararon dos medios de cultivo: uno usado como control (Tc), de origen inorgánico probado para el crecimiento de esta especie y otro alternativo basado en barros cloacales (Tb). Las experiencias realizadas demostraron que la solución de barros cloacales puede ser utilizada como medio de cultivo alternativo y de bajo costo para el crecimiento de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*.

Materiales y métodos

Los cultivos se realizaron en un invernadero destinado al cultivo masivo de microalgas marinas (desde ahora La Estacion), diseñado para proyectos de investigación y docencia en la Carrera Tecnicatura en Acuicultura y Procesamiento Pesquero de la UTN Mar del Plata. Las experiencias prácticas durante la pasantía fueron realizadas dentro del Proyecto del que formo parte como becario de la UTN.

La microalga marina elegida para llevar a cabo este trabajo fue *Nannochloropsis oculata* (Eustigmathophyta), rica en aceites, por ser seleccionada candidata para el Proyecto Microalgas como materia prima para biocombustibles.

Se utilizó agua de mar natural (que abastece a La Estación a partir de una conexión con la Central Termoeléctrica 9 de Julio lindante), tratada por decantación en dos tanques de 750 litros, luego por filtración a través de filtros mecánicos de arena y grava a presión, luego por filtros de cartucho y finalmente esterilizada con cloro (se utiliza lavandina de 55g/l marca Ayudín o Querubín) a 20 ppm durante 24 horas, sin aireación; por último la misma fue declorada con tiosulfato utilizando las fórmulas correspondientes. Los recipientes utilizados fueron tanques de fibra de vidrio con volúmenes de 200 litros, provistos de aireación; los tratamientos empleados por duplicado fueron: 1) Tratamiento control preparado con nutrientes inorgánicos y 2) Tratamiento alternativo de una solución orgánica, preparada con barros cloacales primarios de la ciudad de Mar del Plata (Tabla 4).

medio control (Tc)	solución barros cloacales (Tb)
nitrato de sodio, urea, fosfato y metales traza	
1ml/l de cultivo	10 ml/l de cultivo

Tabla 4. Tratamientos utilizados durante la experiencia de cultivo de *N. oculata*.

El cultivo se realizó hasta llegar a la fase de crecimiento estacionaria; la experiencia se realizó durante el mes de abril (otoño). La temperatura y la luz fueron impuestas por el ambiente. El pH se controló dentro del rango óptimo (8-9), por adición de dióxido de carbono.

La densidad inicial de los cultivos de *N. oculata* para ambos tratamientos fue de aproximadamente 20 millones de células por mililitro. Los inóculos se obtuvieron de un tanque de alta densidad celular en fase de crecimiento exponencial con las mismas condiciones ambientales de cultivo.

Todos los datos y observaciones fueron volcados en planillas diarias, que permitieron el registro y ordenamiento de los datos. Con los datos se realizaron gráficos, con el programa Microsoft office Excel o en tablas.

La temperatura se tomó diariamente con un termómetro digital (Delta OHM; md: Hd 9214) La aireación fue constante con aire no enriquecido con CO₂. El pH se verifico dos veces al día (a media mañana y a media tarde) con un pHmetro digital (HANNA instrument; md: pHep+), La intensidad luminosa fue medida con un luxómetro digital (V&A instrument; md: Ms 6610). La salinidad, con un refractómetro (Arcano; md: Fg-213).

Todos los días se realizó el conteo celular tomando muestras de cada réplica para cada tratamiento, utilizando una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad y un microscopio (Instrumentalia). Los resultados se expresaron en número de células por mililitro. Se utilizó la parte central de la cámara (cuadrados chicos) para el conteo de esta especie.

Resultados

- Condiciones ambientales

En la Tabla 5 se muestran los resultados promedio de temperatura media, máxima y mínima (°C) y precipitaciones (mm) del mes de abril del 2010. Las temperaturas promedio se corresponden con la estación de otoño. Las precipitaciones, no influyeron en los cultivos, pudiendo haber producido un aumento del volumen de los tanques o una disminución de la salinidad si no se hubieran protegido bajo el invernadero.

Mes	T	TM	Tm	Pp
Abril	13,4	21,1	7,3	64,01

Tabla 5. Temperaturas ambientales media (T), temperatura máxima (TM), temperatura mínima (Tm) y precipitaciones (Pp) promedio del mes de abril de 2010 en la ciudad de Mar del Plata, Argentina.

En el mes de abril dentro del invernadero las temperaturas máximas registradas (14 hs) fueron mayores que en el exterior y alcanzaron los 25°C. (Figura 14). Las

temperaturas de los cultivos tuvieron amplias fluctuaciones durante el transcurso de la experiencia, con valores máximos cercanos a los 20 °C (Fig. 15).

La salinidad inicial de los cultivos fue de 28 ‰ y se mantuvo en el rango de 28-30 ‰; Fue posible observar diferencias a simple vista de variación en los volúmenes de los tanques por haberlos marcado con un fibrón en el nivel de 200 litros en cada una de las réplicas.

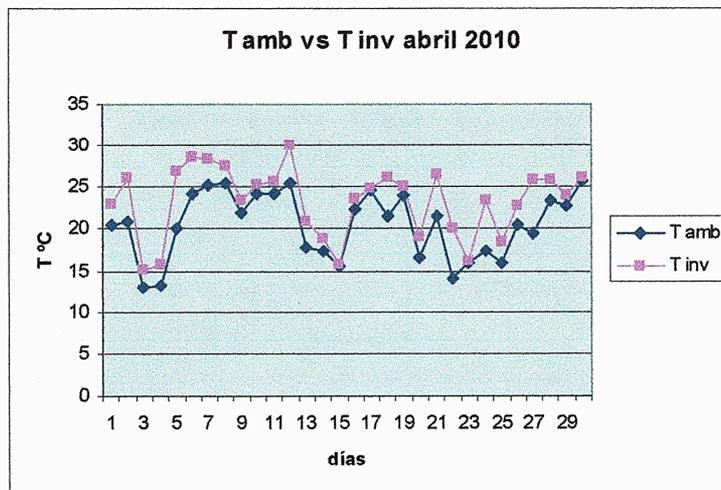


Figura 14. Registros de la temperatura ambiental y del invernadero durante el mes de abril de 2010 en horas

En cuanto a la intensidad luminosa los valores registrados estuvieron comprendidos entre 5400 y 54000 lux, con estados del tiempo que variaron entre despejado, nublado, situaciones intermedias y lluviosos.

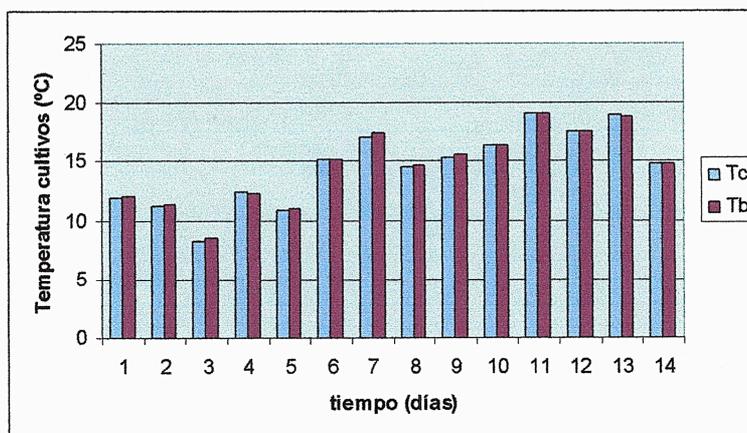


Figura 15. Registro de la temperatura de los cultivos (promedio de réplicas) durante la experiencia de abril de 2010 para el tratamiento control (Tc) y el de barros cloacales (Tb).

- Crecimiento de los cultivos

En la experiencia el uso de una solución de barros cloacales como medio de cultivo alternativo dio muy buenos resultados, alcanzándose densidades celulares mayores que con el medio control, entre 80 y 90 millones de células por mililitro. No superando los 45 millones en el tratamiento control. Se pueden observar las curvas de crecimiento de ambos tratamientos por réplica para la experiencia realizada en la Figura 16.

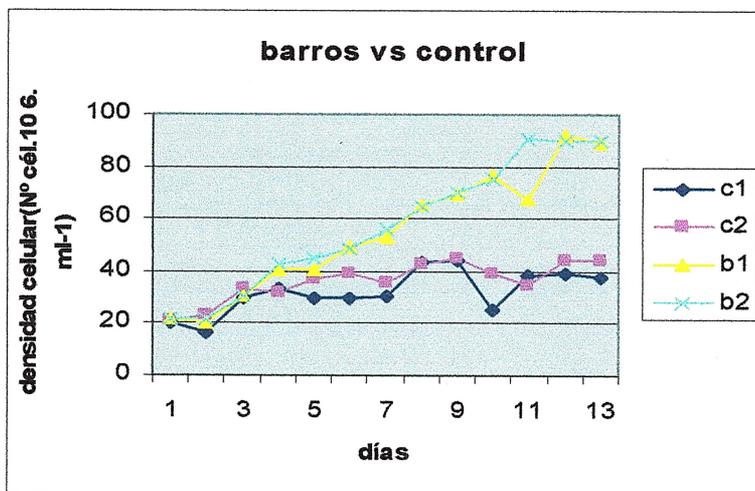


Figura 16. Curvas de crecimiento de *N. oculata* en ambos tratamientos control (c1 y c2) y barros (b1 y b2) durante la experiencia.

Discusión y Conclusiones

Los barros cloacales obtenidos en la ciudad de Mar del Plata, pueden ser utilizados para el cultivo masivo de *N. oculata*. Dependiendo de la época del año en esta ciudad con estacionalidad marcada, las densidades celulares máximas dependerán de las condiciones ambientales de temperatura y luz, y de la fuente de nutrientes, posibilitando las fuentes orgánicas un crecimiento en condiciones mixotróficas. En esta experiencia el estado del tiempo favoreció el crecimiento de esta especie.

Agradecimientos.

A la UTN Mar del Plata por posibilitarme realizar una pasantía y otorgarme la beca de estudiante para poder así cumplir con la finalización de mis estudios; por los conocimientos que adquirí no sólo durante el desarrollo de este trabajo sino a través de los Profesores, los cuales me brindaron su apoyo a lo largo de toda la carrera.

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Bernabé, G. 1991... Acuicultura. Vol. 1 y 2. Editorial Omega, Barcelona. 1099 pp.
- (2) Coll Morales, J. 1983. Acuicultura Marina Animal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- (3) "Cultivos accesorios: Cuadernillo de estudio". Cultivos Acuáticos II. Año 2008. UTN Mar del Plata. Apunte Cátedra. Prof. María Marta Pérsico y Gabriel Bambill.
- (4) Ecología Aplicada, 7(1,2), 2008
Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú.
"Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado."
Heidi Sánchez Torres, Juan Juscamaita Morales, Jessie Vargas Cárdenas y Ricardo Oliveros Ramos.
- (5) Escuela Superior Politécnica del Litoral, 1994. Folleto de Algas
- (6) FAO Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico.
- (7) Fundación Antonio Martín Escudero. 2000. Análisis de desarrollo de los cultivos: medio, agua y especies. Tomo I.
- (8) Rosales Loaisa N.; Jose Bermúdez; reina Moronta; Ever Morales
Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal.
Revista Colombiana de Biotecnología Julio, año /Vol.9, numero 001. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá Colombia pp. 41-48.
- (9) Hidrobiológica 1996, 5 (1-2): 39-42
"Efecto de la reducción de salinidad sobre la tolerancia a altas temperaturas en la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1981."
L. Álvarez-Lajonchere, O.G. Hernández Molejón, A. Comas Gonzáles, V. Martínez Almeida y B. Lozano León.
- (10) "*Nannochloropsis gaditana* sp. Nov., una nueva Eustigmatophyceae marina."
L.M. Lubian
Lazaroa, 4: 287-293 (1982).

(11) "Variaciones cuantitativas de los pigmentos de *Nannochloropsis gaditana*
Lubian, 1983 (Eustigmatophyceae) durante su crecimiento."
Luís M. Lubian y Rafael Establier.
Instituto de Investigación Pesquera de Cádiz.
Inv.Pesq. 47 (1) Págs. 29-37. Junio 1983.