



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA SUR
ÁREA INTERDISCIPLINARIA DE CIENCIAS DEL
MAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MARINA



MANUAL PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

**MEMORIA TÉCNICA DE UN TRABAJO
PROFESIONAL**

**QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

BIÓLOGO MARINO

PRESENTA:

ABRIL KARIM ROMO PIÑERA

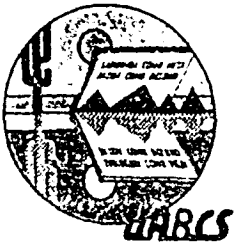
La Paz, B.C.S., diciembre de 2002



BIBLIOTECA

054616✓

TE
1366
EJ.3



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR



Apartado Postal 19-B
Codigo Postal 23080
La Paz, B.C.S.

Tels. 128 04 40, 128 04 69
y 128 04 32
Fax 128 08 01 y 128 08 80

AREA INTERDISCIPLINARIA
DE CIENCIAS DEL MAR

Departamento de Biología Marina

Fecha: 29 de noviembre 2002

BIOL. MAR. EMELIO BARJAU GONZALÉZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MARINA

PRESENTE.

Los abajo firmantes comunicamos a Usted, que habiendo revisado el Trabajo de Tesis que realizó (ron) el (la) pasante (s): Abril Karim Romo Piñera

Con el Título: Manual para el cultivo de microalgas

Otorgamos nuestro voto aprobatorio y consideramos que dicho trabajo está listo para su defensa a fin de obtener el título de Biólogo Marino.

MARCO RUBENIO GARCIA REA

Nombre Completo

[Firma]

Firma

PRESIDENTE

CARLOS RAFAEL DAVALOS

Nombre Completo

[Firma]

Firma

SECRETARIO

Alejandra Olivera Bonilla

Nombre Completo

A. Olivera

Firma

VOCAL

Mu. Esther Ruiz López

Nombre Completo

[Firma]

Firma

SUPLENTE

Roberto Carmona

Nombre Completo

[Firma]

Firma

SUPLENTE

CARLOS RAFAEL DAVALOS

Nombre Completo

[Firma]

Firma

DIRECTOR

DEDICATORIA

A Dios.

A Osmar, por existir, por su amor y por ser lo mejor de mi vida.

A Daniel, por su amor, comprensión, compañía y apoyo, siempre y en todos aspectos.

A mis padres Laura y Francisco, por su cariño, confianza y apoyo en toda mi vida.

A mis hermanos Paco, Laura y Yazmín, por su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a Erika, por su amistad, ayuda y enseñanza tanto profesional como personalmente, por las revisiones, ideas, correcciones y demás cosas hechas a este documento; además de ser la persona que me inicio en ésta área. Gracias amigocha, ahora si quedo listo.

Al Doc. Rangis por su amistad, sus enseñanzas, las comidas y por toda la ayuda que me ha brindado. Jefe, ¡por fin!, aquí esta la tesis.

A los demás integrantes del proyecto Cultivo de Pteridos, Hector, Hugo, Champ y Alex a quien agradezco también la ayuda en la revisión de este documento, además del acomodo de gráficas, índices, fotografías, etc.

A mis compañeros de generación Xchel, Ofelia y Carlitos con quienes logre además de un trabajo en equipo, una gran amistad. En especial a Marichu por su cariño y bastantes platicas y parrandas; junto a Ella, al Negrito por su amistad, y a ambos gracias por adoptar a mi hijo como su sobrino y en la impresión de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo en la Unidad, Don Cuiti, por sus dulces y platicas; A Micke por la ayuda eléctrica e hidráulica en el laboratorio; a Edgar por su ayuda para los cultivos masivos; a Esther por sus platicas, además de su ayuda con los análisis bacteriológicos; a Efraín por su amistad, por darme una mano cuando necesitaba ayuda y por ser nano de mi hijo cuando lo he necesitado.

Gracias también a Marco Cadena por ser parte de mi comité revisor, al igual que a Roberto Carmona por la ayuda en la parte estadística de este trabajo.

ÍNDICE

PRÓLOGO	1
GLOSARIO	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVO	9
3. CONTROL DE LOS REQUERIMIENTOS FÍSICOS Y QUÍMICOS EN EL LABORATORIO	9
3.1 PARÁMETROS FÍSICOS	9
3.2 PARÁMETROS QUÍMICOS	11
4. EQUIPO DE TRABAJO	12
4.1 ÁREA DE GABINETE	12
4.2 AREA HÚMEDA	18
4.2.1 TRATAMIENTO DEL AGUA UTILIZADA.....	18
4.2.2 CULTIVOS MASIVOS.....	20
5. ASPECTOS IMPORTANTES DEL CULTIVO DE MICROALGAS	22
5.1 CONTAMINACIÓN	22
5.1.1 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN QUÍMICA	23
5.1.2 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA	23
5.2 CONTROL DE LA CALIDAD DEL AGUA MARINA	23
5.3 INÓCULO	24
5.4 NIVEL CEPARIO	25
5.4.1.SIEMBRA EN LIQUIDO.....	28
5.4.2 SIEMBRA EN SÓLIDO.....	30
5.5 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS	33
6. EVALUACIÓN DE LA BIOMASA	35
6.1 HEMATOCITÓMETRO O CÁMARA DE NEUBAUER	35
6.2 ESPECTOFOTÓMETRO	37
6.2.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	38

7. ESPECIES EXISTENTES EN EL LEAP	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXO I FORMULACIÓN PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO F/2 DE GUILLARD Y RYTHER (1973)	47
ANEXO II. BITÁCORAS DE APARATOS.....	49
BITÁCORA AUTOCLAVE.....	50
BITÁCORA MICROSCOPIO.....	51
BITÁCORA BALANZA	52
BITÁCORA DESTILADOR.....	53
BITÁCORA SISTEMA DE FILTRACIÓN E IRRADIACIÓN DE AGUA MARINA...54	
ANEXO III CRISTALERIA (INVENTARIO)	55
ANEXO IV PROTOCOLO DE USO DEL SISTEMA DE FILTRACION E IRRADIACION DE AGUA MARINA.	56

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas ..8	
Figura 2. Cristalería. Material utilizado para cultivos estáticos	13
Figura 3. Autoclave para esterilización de material	15
Figura 4. Campana de flujo laminar. Utilizada para siembras y elaboración de vitaminas esterilizadas	16
Figura 5. Destilador de agua	18
Figura 6. Sistema de filtración e irradiación de agua marina.....	19
Figura 7. Sistema hidráulico marino	20
Figura 8. Cultivos masivos.	21
Figura 9. Bolsa de plástico montada en el sistema de columpio	21
Figura 10. Estante con cultivos a nivel cepario y cultivos estáticos	25
Figura 11. Horno de precisión	27
Figura 12. Siembra del cepario en la campana de flujo laminar.....	28
Figura 13. Tubos con agar, colocados sobre una pipeta de 5 mL.....	31
Figura 14. Sembrado en zig-zag sobre agar	32

Figura 15. Diilución del cultivo, para la toma de muestra en un análisis bacteriológico	34
Figura 16. Cámara de conteo Neubauer. Utilizada para conocer la concentración de un cultivo	35
Figura 18. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de <i>Isochrysis galbana</i> en cultivos de 100L.....	39
Figura 19. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de <i>Monochrysis lutheri</i> en cultivos de 100L.....	39
Figura 20. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de <i>Dunalliella tertiolecta</i> en cultivos de 100L	40
Figura 21. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de <i>Chaetoceros gracilis</i> en cultivos de 100L.....	41
Figura 22. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de <i>Isochrysis galbana</i> en cultivos de 400L.....	42
Figura 23. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de <i>Monochrysis lutheri</i> en cultivos de 400L.....	42
Figura 24. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de <i>Dunalliella tertiolecta</i> en cultivos de 400L	43
Figura 25. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de <i>Chaetoceros gracilis</i> en cultivos de 400L.....	44
Tabla I. Relación de interruptores y lámparas	10
Tabla II. Tiempos de irradiación para los matraces	14
Tabla III. Relación del volumen de agua marina y agua destilada	26
Tabla IV. Proporción de vitaminas y silicatos de acuerdo al volumen a utilizar	29

PRÓLOGO

La Unidad Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, se ubica en el km 16 de la carretera La Paz-Pichilingue, en un área concesionada junto al mar. La Unidad depende académica y administrativamente de la Coordinación de Ciencias del Mar debido a la naturaleza de las actividades que se desarrollan como son la acuicultura y la pesca.

Para el año de 1993 el Laboratorio Experimental de Acuicultura de la Unidad Pichilingue (LEAP) de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, inicia sus actividades para respaldar la docencia a nivel superior y la investigación, teniendo como líneas prioritarias el cultivo de moluscos y el cultivo de peces marinos. Siendo también sede de la Maestría en Ciencias en Acuicultura del Programa Regional de Posgrado en Acuicultura.

El LEAP, consta de áreas especializadas divididas en dos secciones: El laboratorio seco, donde se localizan las áreas de Histología, Química, Microbiología y Microalgas. El laboratorio húmedo, donde se encuentran las áreas de Cultivo de Microalgas, Cultivo de Moluscos, Cultivo de Peces, Planta de Alimentos Balanceados y área de Temperatura Controlada.

Todas las áreas tienen como principio dar respaldo a las labores docentes y de investigación, en particular para la realización de prácticas, capacitación y entrenamientos específicos; así como para el asesoramiento continuo de los trabajos de tesis para los estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado, tanto de nuestra Institución como de las Instituciones de educación superior o investigación con las que se tengan convenios vigentes.

GLOSARIO

AGAR	Polisacarido extraído de <i>Gelidium</i> y otras algas marinas, utilizado como agente solidificante en medios de cultivo.
AISLAMIENTO	Obtención de cultivos monoalgales a partir de una muestra de agua.
ASEPSIA	Estado libre de microorganismos patógenos.
BACTERIA	Procariota unicelular.
CEPA	Cultivo puro de una especie determinada de microorganismos.
COSECHA	Extracción de microalgas del recipiente de cultivo una vez que han alcanzado una densidad deseada.
ESTERILIZACIÓN	Destrucción total de todos los organismos que viven en un volumen de agua.
FOTOAUTÓTROFOS	Organismo capaz de sintetizar su propio alimento a partir de sustancias inorgánicas usando la luz como fuente de energía.
FOTOSÍNTESIS	Proceso de síntesis de carbohidratos a partir de bióxido de carbono y agua utilizando energía radiante de la luz captada por la clorofila en las células vegetales.
HETERÓTROFOS	Organismo que necesita compuestos orgánicos complejos como fuente de carbono.
INOCULAR	Procedimiento de transferencia de microalgas en los diferentes niveles del cultivo.
MEDIO DE CULTIVO	Solución u otro substrato utilizado para cultivar microorganismos.
MIXOTRÓFICOS	Organismo capaz de reproducirse en presencia de luz u oscuridad.
NUTRIENTE	Término genérico para cualquier sustancia que pueda utilizarse en los procesos metabólicos de un ser vivo.
pH	Logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno por virtud de la cual se expresa el grado de acidez o alcalinidad de un líquido.
SOLUCIÓN STOCK	Solución que contiene el medio de cultivo concentrado para su fácil manejo.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de microalgas, conocido como "cultivos de apoyo" o "cultivos anexos" (considerando en esta definición también al cultivo de zooplancton) es primordial en el desarrollo de los "cultivos principales", esto es, para los moluscos durante todo su ciclo de vida, crustáceos y peces en su etapa larvaria. Las microalgas son las encargadas del suministro de energía por medio de biomoléculas sintetizadas de elementos menos complejos transformados a través de la fotosíntesis. Estas microalgas son las que mayormente contribuyen a la producción de biomasa en los océanos, estuarios, lagos y reservorios. La posición de estos organismos dentro de las redes tróficas forman los pilares o bases de éstas debido al aporte de energía de las biomoléculas sintetizadas por estos (Hoff y Snell, 2001). Es así, como hasta el momento estos microorganismos no se han podido sustituir como fuente nutricional para cualquier organismo en cultivo (Cañizares et al., 1994).

El término microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis. Este término no tiene sentido taxonómico alguno y dentro del mismo se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos: cianobacterias que tienen estructura celular procariota y las restantes microalgas con estructura celular eucariota. Pese a las grandes diferencias estructurales, fisiológicamente ambos tipos de microalgas (eucariota y procariota) son similares, con un metabolismo fotosintético similar al de las plantas superiores. La reproducción es generalmente por división binaria, con tiempos de duplicación de una hora o menos para los procariotas (cianobacterias), y de 8 a 24 horas o más para las eucariotas (Carpenter, 1979; Dawes, 1991).

Éstos organismos fotosintetizadores, son considerados como los productores primarios de biomoléculas sintetizadas a partir de la transformación de energía luminosa a energía química. Son organismos unicelulares, los cuales dependiendo de la composición de su pared celular, el tipo de clorofila y de pigmentos accesorios entre otras características utilizadas para clasificarlas, permiten que de tal diversidad se puedan seleccionar aquellas que puedan cultivarse (Carpenter, 1979; Hoff y Snell, 2001).

No todas las especies incluidas en este grupo son fotoautótrofas, como se explicó al principio de esta sección, algunas otras son verdaderas heterótrofas debido a que no requieren de luz y toman la energía de compuestos orgánicos tales como los azúcares y ácidos orgánicos, de igual forma, muchas otras especies son mixotróficas, esto es, que pueden reproducirse en presencia de luz o en la oscuridad (Hoff y Snell, 2001).

Las microalgas heterótrofas y mixotróficas se encuentran virtualmente en cada clase taxonómica del grupo. El alga fotoautótrofa tiene la capacidad de obtener la energía heterotróficamente, dependiendo de sus necesidades alternando en la utilización de la energía luminosa y su transformación a la química utilizando bióxido de carbono, así como sustancias orgánicas (Droop, 1974).

Cabe mencionar, que algunos integrantes de este grupo en análisis han sido etiquetados como "fotoautótrofos obligados", con base a experimentación con niveles de nutrientes. Aún cuando algunas de estas especies pueden transformarse en heterótrofas cuando los niveles de nutrientes se encuentran sustancialmente arriba o por debajo de las condiciones naturales (Gladue, 1991).

El crecimiento microalgal se rige por la ley del mínimo, es decir, el factor limitante del crecimiento es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario para la microalga. Es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de una microalga para todos o el mayor número de parámetros. Ahora bien, estas condiciones o límites para un parámetro, generalmente cambian cuando un segundo parámetro fluctúa (Cañizares, 1994).

En el cultivo masivo, el rendimiento alcanzado depende tanto de la concentración de las células en el cultivo como del grado en que las células pueden desarrollar su potencial de crecimiento. Por tanto, para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo, es necesario: un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos, adecuadas condiciones químicas y físicas (luz, aireación, temperatura, salinidad) y energía (Cañizares, 1994).

Al igual que como cualquier otro organismo vivo, las condiciones físicas tienen gran influencia en el crecimiento de la microalga. Cada especie presenta un particular intervalo de temperatura, intensidad de luz, preferencias espectrales, salinidad, bióxido de carbono y oxígeno para la producción de un máximo crecimiento. También se debe mencionar que más que la influencia de un solo parámetro es el conjunto de parámetros

lo que crea determinadas respuestas en el crecimiento de las microalgas (Cañizares 1994).

Como parámetros físicos se consideran: La **luz**, las microalgas son fotoautótrofas encargadas de convertir la energía luminosa en metabólica por medio de la fotosíntesis y sus periodos de exposición a ésta pueden ser continuos (mediante luz artificial), discontinuos (periodos de iluminación alternados con periodos de oscuridad, también con luz artificial) o el ciclo natural día y noche (Richmond, 1986).

La **aireación**, asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, dejándolos disponibles para su mejor aprovechamiento, mejora la distribución de la luz a las células asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, evitando que se sedimenten, y previene una estratificación térmica (Richmond, 1986).

En el caso de la **temperatura**, las microalgas en las que se está interesado generalmente para su cultivo, son las consideradas como especies tropicales, debido a que su crecimiento no sufre alteraciones en un intervalo de 16 a 27°C presentando un óptimo de 24°C. Bajas temperaturas en referencia con el intervalo anterior no matan a la microalga, sin embargo, puede provocar una disminución de crecimiento, temperaturas arriba de 35°C provocarían que la mayoría de las microalgas colapsaran (Hoof y Snell, 2001).

El intervalo de **salinidad** óptimo para una microalga dependerá de la especie. Generalmente en el cultivo a interiores este parámetro no es controlado y se maneja la salinidad presente en el agua de mar. En un cultivo a exterior la salinidad se convierte en el parámetro control en el crecimiento de la microalga (Abalde et al., 1995).

Dentro de los requerimientos químicos necesarios para un buen crecimiento de las microalgas en cultivo se encuentran, entre otras cosas, el balance entre los **macronutrientes** específicos y los **micronutrientes**. Un desbalance en la proporción suministrada de estos nutrientes, invariablemente se manifiesta ya sea como un descenso en el crecimiento o hasta la detención del mismo (Hoof y Snell, 2001).

Otro aspecto a considerar es la disminución de la fuente de nutrientes como factor importante limitativo en el cultivo y como control de calidad nutricional en los denominados cultivos masivos (Provasoli et al., 1957).

Por macronutrientes se consideran la fuente de nitratos, fosfatos y en el caso de las diatomeas la adición de silicatos. Con respecto a los micronutrientes son aquellos que se

suministran en poca cantidad (trazas) en comparación con los anteriores mencionados pero no por ello menos importantes. Se sabe que en soluciones alcalinas algunos metales se precipitan, agentes quelantes tales como el EDTA (Acido Etilen-diamino-tetracético) se utilizan para mantener los metales en solución haciéndolos disponibles para las microalgas (Kaplan et al., 1986).

Además de los macro y micronutrientes, existen otras sustancias que son requeridas por las microalgas para obtener mejor crecimiento. La mayoría de las microalgas son auxotróficas, esto es, que no son capaces de sintetizar todas las **vitaminas** necesarias y tienen que assimilarlas del medio. La tiamina (B1), la cianocobalamina (B12) y la biotina (B6) son consideradas esenciales para la mayoría de las microalgas (Spotte, 1979). De hecho se ha estimado que cerca del 70% de todas las microalgas planctónicas requieren de cianocobalamina (B12) (Hoff y Snell, 2001).

Para proporcionar estos nutrientes se debe seleccionar el medio de cultivo que se va a utilizar. El agua marina es un medio de cultivo ideal para el crecimiento de las microalgas marinas; sin embargo, es necesario enriquecerla con nutrientes. Los medios de cultivo son muy diversos, pero todos coinciden en una fuente principal de nitrógeno, fósforo y una mezcla de metales traza con solución de quelante y vitaminas (Provasoli et al., 1957; Stein, 1973).

Existen diversas formulaciones de medios de cultivo, algunos de estos han sido seleccionados de diferentes laboratorios y utilizados durante muchos años. De igual forma se han formulado medios específicos para algunas especies de microalgas (Provasoli et al., 1957), además es práctica común que a partir de un medio formulado se realicen modificaciones empíricamente hasta que se satisfagan los requerimientos de diversas microalgas utilizadas para investigación (Myers, 1962).

La tasa de oxígeno y **bióxido de carbono** suministrado al cultivo puede convertirse en un factor limitativo en el cultivo. Mejorando la circulación o la adición adecuada de bióxido de carbono o bicarbonato de sodio puede provocarse la prolongación del crecimiento exponencial de la población. Sin embargo, el bombear aire a los cultivos conteniendo más del 5% de bióxido de carbono puede tener un efecto inhibitorio (Hoff y Snell, 2001).

El bióxido de carbono y el bicarbonato de sodio pueden afectar el pH del cultivo, así que éste debe ser revisado periódicamente para mantenerlo en condiciones óptimas. Como se ha mencionado, las microalgas utilizan bióxido de carbono para la fotosíntesis

y liberan oxígeno, a escala comercial el bióxido de carbono es inyectado en los cultivos durante los periodos de luz. Sin embargo, en cultivos utilizados para acuicultura una aireación moderada es suficiente (Hoff y Snell, 2001).

Un alta o baja excesiva en el pH disminuye el crecimiento de la microalga por el rompimiento de muchos procesos celulares. Si el nitrógeno no es suministrado al cultivo como sal de amonio, la mayoría de las microalgas selectivamente tomaran el ion amonio provocando una baja en el pH. Si los iones nitratos son eliminados por el alga, el pH tiende a incrementarse, pero usualmente controlado por suministro de bióxido de carbono del cultivo. Sin embargo, si el bióxido de carbono es limitante, el pH del cultivo puede elevarse hasta 11 matando microalgas. Si el cultivo es mantenido en condiciones de ambiente o controlando los ciclos de luz-oscuridad, se observa elevado pH durante los periodos de luz y bajo durante el periodo de oscuridad, tendiendo a balancear el pH. (Hoff y Snell, 2001).

Además de los factores físico-químicos mencionados anteriormente, otro aspecto importante a considerar en el cultivo de microalgas es la asociación de estas con las bacterias, la cual comienza a ser mejor entendida. Se ha sugerido que el mejor crecimiento se da en cultivos libres de bacterias (axénicos), condiciones que son difíciles y costosas de conseguir. Sin embargo, parece ser que muchas especies de microalgas crecen mejor en asociación con las bacterias. En los casos en los que esto se ha podido observar se sabe que se debe a la producción de cianocobalamina (B12) que lleva a cabo la bacteria y que la proporciona a la microalga (Hoff y Snell, 2001).

En el cultivo de microalgas se hace necesario el conocimiento de la cinética de crecimiento de cada especie en cada determinado volumen. Independientemente de la especie y el volumen al que es cultivada se reconoce un patrón estándar de crecimiento indicado por las siguientes fases (Fogg y Thake, 1987) (figura 1).

Lag o fase de adaptación: En donde no ocurre incremento en el número de células, pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial.

Exponencial: Ya una vez adaptadas al medio de cultivo, las microalgas comienzan a multiplicarse; puesto que la división da lugar a nuevas células que son capaces de dividirse, el aumento en número de microalgas se acelera continuamente en forma exponencial.

De declinación relativa de crecimiento: En este caso, conforme el cultivo va creciendo se da una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como

consecuencia del incremento de la población; de ahí que las microalgas disminuyan su tasa de división celular.

Estacionaria: Cuando ya no se aprecia una división celular neta, esto es que el número de células alcanzado se mantiene constante por cierto periodo de tiempo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo.

De muerte: Las células pueden durar en la fase anterior semanas e incluso meses, aunque lo más normal es que comiencen a morir, es entonces cuando se presenta esta fase.

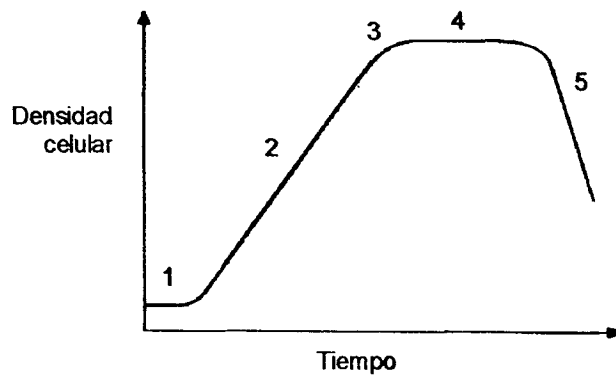


Figura 1. Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas (Modificado de Fogg y Thake, 1987). 1- Fase de adaptación; 2- Fase de crecimiento exponencial; 3- Fase de declinación relativa de crecimiento; 4- Fase estacionaria; 5- Fase de muerte

La medición de la biomasa es importante en el cultivo de microalgas para tener un recuento directo de la población celular y se puede hacer a través de diferentes métodos como son: el conteo celular, a través de una cámara de conteo; este es uno de los métodos más comunes. La medición de la densidad óptica o absorbancia, con ayuda de un espectrofotómetro; que tiene la ventaja de poder leer varias muestras en un corto tiempo y es un método de alta precisión. El método de fluorimetría que mide la concentración de clorofilas a través de un fluorímetro; la desventaja de este método radica en que la concentración de clorofila a, no permanece constante durante toda la curva de crecimiento del alga, por lo que los valores no son constantes. Otro método es

el de la cuantificación de la biomasa a través del peso seco; este método también es muy utilizado (López et al., 1993).

2. OBJETIVO

Este manual contiene información con respecto a las técnicas más comunes utilizadas para el cultivo de microalgas, con base a metodologías ya propuestas, probadas y respaldadas por investigadores versados en el tema. El formato en el cual se presenta este documento consiste en proporcionar el marco teórico de dichas técnicas y metodologías y su aplicación con base en las características de la infraestructura que presenta el Laboratorio Experimental de Acuicultura de la Unidad Pichilingue (LEAP) de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Este laboratorio de cultivo de microalgas es utilizado tanto para docencia como para investigación, la existencia de un manual de procedimientos es fundamental para cualquiera de las dos actividades. Sin embargo, su elaboración se realizó no solo para la compilación de información bibliográfica a considerar durante el cultivo de estas especies sino también para proporcionar al lector los elementos básicos necesarios para realizar esta actividad con el objetivo de aportar más allá que una receta a seguir.

3. CONTROL DE LOS REQUERIMIENTOS FÍSICOS Y QUÍMICOS EN EL LABORATORIO

3.1 PARÁMETROS FÍSICOS

LUZ: Se utiliza luz artificial constante (períodos de 24 horas) por medio de lámparas del tipo "cool-white" (2500-lux) en todos los niveles de cultivo (desde el cepario hasta las tolvas de 400 L). Estas lámparas están conectadas por pares a sus respectivas balastras, éstas, a su vez se conectan a un interruptor (Tabla I) de seguridad que se encuentra localizado en la pared exterior al cuarto de cultivo.

Para efecto de mantenimiento de las lámparas se hace necesaria una limpieza semanal de la sal que se adhiere a éstas debido al agua de mar que llegase a salpicar al momento de trabajar con los cultivos; de igual forma el verificar las condiciones de uso de cada lámpara detectando de manera preventiva la presencia de coloración oscura, la

cual es indicativo de que la lámpara esta próxima a fundirse y tomar las medidas necesarias.

Tabla I. Relación de interruptores y lámparas

No. de Interruptor	Serie de lámparas
1	Tolvas 100 L, 400 L (1,2,3,y 4)
2	Tolvas 400 L (5,6,y7)
3	Tolvas 400 L (8,9,y 10)
4	Bolsas 20 L
5	Cultivo estático y estante central

AIREACIÓN: Al cepario o cultivos estáticos no se le proporciona aireación y sólo se agitan manualmente para homogenizar el cultivo. Se sugiere que esta agitación se realice diariamente con el objeto de evitar que se sedimenten y permitir que todas las células reciban la luz durante su crecimiento. El tiempo de duración de estos cultivos, dependerá de los fines para los cuales se prepararon, (ya sea recambio de cepas, mantenimiento o cambios de volumen de cultivo), procurando que el tiempo máximo de cultivo de ninguna manera supere los 5 días para cambios en volumen y de 7 días para el cepario.

En el caso de los cultivos masivos (a partir de 20 L) se utiliza aireación constante, con ayuda de un compresor ("blower") de baja presión de 1/2 hp el cual se encuentra conectado al área de cultivo a través de una tubería flotante de PVC.

Para las tolvas de 100 y 400 L, se utilizan "air-lift" que constan de un tubo delgado de PVC, dentro del cual va la manguera que se encuentra conectada a la salida de aire.

TEMPERATURA: Esta se mantiene constante por medio de un aire acondicionado integral de 3 toneladas. En verano (de mayo a octubre) se sugiere mantener el área a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ para tratar de evitar que al momento de utilizar la microalga como alimento ésta "disminuya de calidad" es decir, que sus paredes celulares comiencen a reventarse debido al brusco incremento en la temperatura que presenta el

cultivo principal. Para el periodo de invierno (noviembre-abril) se sugiere mantener el cultivo a $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se tiene un termómetro de máximos y mínimos para ir verificando la temperatura del laboratorio, se recomienda hacer una bitácora para efectos de detectar cualquier cambio en el funcionamiento del aire acondicionado integral y llevar acabo las medidas de seguridad correspondientes.

SALINIDAD: Para los cultivos masivos (a partir de 20 L) el agua marina utilizada es filtrada e irradiada, sin necesidad de disminuir su salinidad. En el caso de los cultivos estáticos (incluyendo el cepario) se disminuirá la salinidad (de 35 ups a 30 ups) agregando el 15% de agua destilada del volumen del agua marina a preparar. Esto debido a que al aumentar la temperatura al momento de la esterilización, existe una evaporación de agua, por lo que aumenta la salinidad y esta debe mantenerse en 35 ups.

3.2 PARÁMETROS QUÍMICOS

NUTRIENTES: El medio de cultivo utilizado en éste laboratorio se elabora con base en la formulación sugerida por Guillard y Ryther (1973); cuya preparación y especificaciones se enumeran en el ANEXO I.

BIÓXIDO DE CARBONO: En el laboratorio no se suministra bióxido de carbono a los cultivos debido a que el suministro de aire ha sido suficiente para estos hasta la fecha.

BACTERIAS Y SU ASOCIACIÓN CON LAS MICROALGAS: En los cultivos estáticos del nivel cepario hasta el volumen de 1,500 mL (matraz Fembach) se mantienen cultivos lo más axénico posible, procurando tener todas las condiciones asépticas requeridas en su mantenimiento. En los cultivos masivos (bolsa 20 L, tolvos de 100 y 400 L) aun cuando se encuentran bajo riguroso sistema de asepsia, no se consideran axénicos.

4. EQUIPO DE TRABAJO

El equipo de trabajo a utilizar se basa principalmente en cumplir con los mínimos requisitos de limpieza, facilidad y maniobrabilidad adecuados, para lograr que el cultivo de microalgas se lleve a cabo.

Dependiendo del área donde se trabaje, el material será así de diverso. En la mayoría de los laboratorios donde se cultivan microalgas se cuenta con 2 áreas específicas: área de gabinete y área húmeda.

La primera cubre los requerimientos principales de preparación de nutrientes, esterilización, cristalería y área de mantenimiento del material. La segunda área es donde se lleva a cabo el cultivo de estos microorganismos y consta de una toma de agua para cultivo (canal de desagüe), sistema de filtración e irradiación de agua de mar, aireación, luz y contenedores para cultivo.

4.1 ÁREA DE GABINETE

Esta área, con una superficie de 6x6 m, es la que proporciona todo el material necesario para el cultivo. En este caso y generalmente cuenta con lo siguiente: cristalería (matraces, probetas, pipetas, tubos de ensaye, vasos de precipitado), refrigerador para mantenimiento de reactivos, autoclave, horno de microondas, campana de flujo laminar, microscopio compuesto y balanza (las bitácoras para registrar el uso de cada aparato se encuentran en el ANEXO II).

Además de estantería para el material del almacén y material accesorio como son tubos de vidrio, pipetas, probetas, bolsas de polietileno, selladora de bolsas, guantes, alcohol, agua de mar y agua destilada.

CRISTALERÍA: La cristalería utilizada en el área de gabinete está determinada principalmente por los requerimientos del usuario (figura 2). El nivel al que se utiliza es en cepario y cultivos estáticos, en volúmenes de 10 mL a 2500 mL. Los diferentes tipos de cristalería que se tienen en éste laboratorio se encuentran enlistados en el ANEXO III.

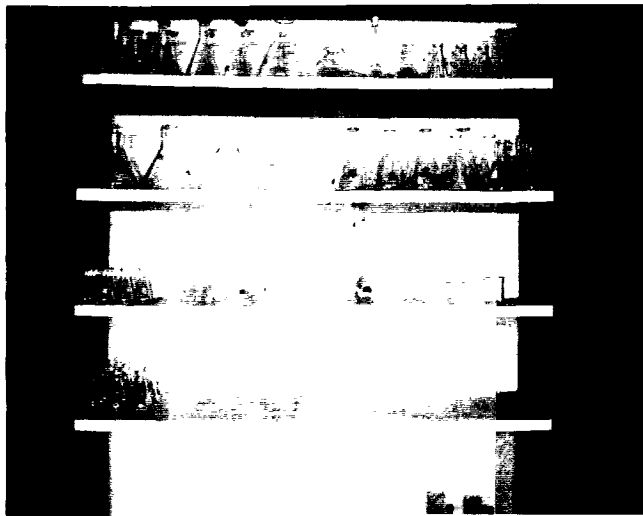


Figura 2. Cristalería. Material utilizado para cultivos estáticos

Debido a que el uso de la cristalería en el cultivo exige medidas de limpieza estrictas, es necesario que antes de utilizarla se lave con un día de anticipación. El método de limpieza sugerido es el siguiente:

1. El matraz deberá enjuagarse con agua de la llave.
2. Con una solución de ácido clorhídrico al 10% contenido en una piseta, limpiar las paredes del matraz para asegurarse que no queden residuos de materia orgánica.
3. Enjuagar con abundante agua de la llave.
4. Lavar con jabón (libre de fosfatos) y enjuagar con abundante agua de la llave.
5. Dar un último enjuague con agua destilada y dejar secar escurriendo.

NOTA: El ácido utilizado para limpieza, es reutilizable, de tal forma que se sugiere un enjuague previo de los matraces con agua de la llave para desechar cualquier residuo de microalga y poder reutilizar el ácido.

Para el caso de los tubos de ensaye será necesario sumergirlos en esa solución (HCl al 10%) mínimo por 24 h. Cuando se utilice cristalería nueva, esta debe ser desengrasada primeramente con hidróxido de sodio al 10%, y después lavada de manera rutinaria y luego esterilizada en autoclave.

REFRIGERADOR: El refrigerador con el que se cuenta en el laboratorio es un SAMSUN, modelo-SR-458DV. Se recomienda que toda solución que sea guardada ahí contenga los

siguientes datos: nombre de la sustancia y tiempo de caducidad, fecha de elaboración (día, mes y año), usuario y elaborador.

Es recomendable que cada usuario se responsabilice de las sustancias preparadas de tal manera que al término de su uso se les dé el destino correspondiente, para efectos de verificar caducidad en las soluciones o sustancias aquí almacenadas.

HORNO DE MICROONDAS: El laboratorio cuenta con un SAMSUNG modelo-MW8610T, de 1.4 Kw de potencia. Este aparato se usa principalmente para esterilización de matraces, aunque su utilización se encuentra cuestionada por el hecho de la existencia del autoclave. Sin embargo, su uso es recomendable pues ya se realizó un análisis bacteriológico en el laboratorio que avala los resultados de esterilización. Para cada volumen y número de recipientes existe un tiempo determinado de irradiación (Tabla II).

Tabla II. Tiempos de irradiación para los matraces

Tipo de recipiente	No.	Volumen	Tiempo en la máxima potencia
Erlenmeyer	12	75 mL	6 min
Erlenmeyer	12	100 -150 mL	8 min
Erlenmeyer	4	500 mL	10 min
Fembach	1	1500 mL	13 min

AUTOCLAVE: El que se encuentra en el laboratorio es una MARKET FORGE modelo STM-EL. Este aparato (figura 3) nos permite esterilizar con mayor seguridad los medios de cultivo así como el material utilizado en los cultivos estáticos. Se utiliza calor húmedo a 121°C; por lo cual se necesita vapor a presión de 15 lb/pulg² para lograr esta temperatura.

Este aparato consta de un reloj para el control de la temperatura, un manómetro, un termómetro y un indicador de nivel de agua. Presenta dos opciones para esterilizar:

1) "*Fast (instruments)*" y 2) "*Slow (liquids)*" cuya diferencia radica en la forma en que el aparato libera la presión utilizada para lograr la temperatura requerida.

Se recomienda utilizar capuchones de papel encerado para evitar que se humedezcan los tapones de algodón de los matraces. Dadas las características de la

puerta del autoclave es importante la distribución del material dentro de la misma, para evitar algún accidente al momento de cerrar el aparato, no se deberá por ningún motivo sobrellenarlo de matraces con objeto de ahorrar tiempo en su uso. Otro aspecto a considerar es el verificar el llenado correcto con agua, no sobrepasando el nivel indicado para el cilindro y de ningún modo descuidar el mismo una vez puesto a trabajar. Cuando se esterilicen medios de cultivo o se prepare agar para cultivo se utilizará el dispositivo de "Slow" para efectos de que la liberación de presión no afecte las propiedades de las sustancias esterilizadas; de tal forma que para el caso de instrumentos, en donde no es necesario ese control de presión, se utilizara el dispositivo "Fast ". Al utilizar el autoclave para la eliminación de agar en placas se recomienda meterlas en un recipiente de plástico para efectos de que el agar disuelto no se derrame en el aparato y obstruya posteriormente el drenado del agua.

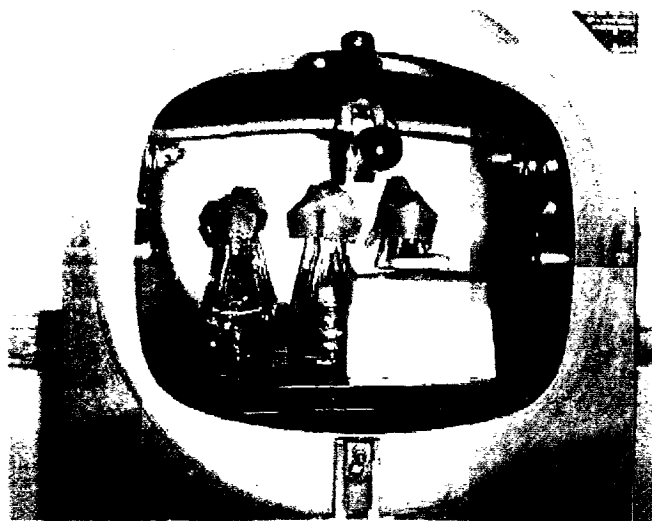


Figura 3. Autoclave para esterilización de material

Se sugiere utilizar agua destilada o agua de garrafón para el llenado del aparato. La operación del aparato es la siguiente:

1. Llenarlo con 4 L (aproximadamente) de agua de garrafón o destilada por debajo del nivel indicado en el cilindro
2. Introducir el material a esterilizar y cerrar la puerta
3. Seleccionar el dispositivo de liberación de presión ("*select exhaust*"),
4. Activar el reloj (15 minutos)

El dispositivo de temperatura presenta las siguientes opciones:

230°F/110°C, 240°F/118°C y **250°F/121°C**; utilizar esta última para esterilización.

CAMPANA DE FLUJO LAMINAR: Es aquí donde se realiza la siembra de matraces y tubos de ensaye de los cultivos estáticos. Está provista de un ventilador que arroja aire a través de un filtro de fibra de vidrio (el cual debe ser verificado cada 3 meses para su mantenimiento) y que con ayuda de los mecheros crea un ambiente aislado del resto del laboratorio (figura 4).

Para su utilización se recomienda lo siguiente:

1. Limpiar el área en su totalidad con alcohol.
2. Prender los mecheros
3. Encender la campana y esperar cinco minutos antes de iniciar. Después de su uso limpiar el área de trabajo, nuevamente.

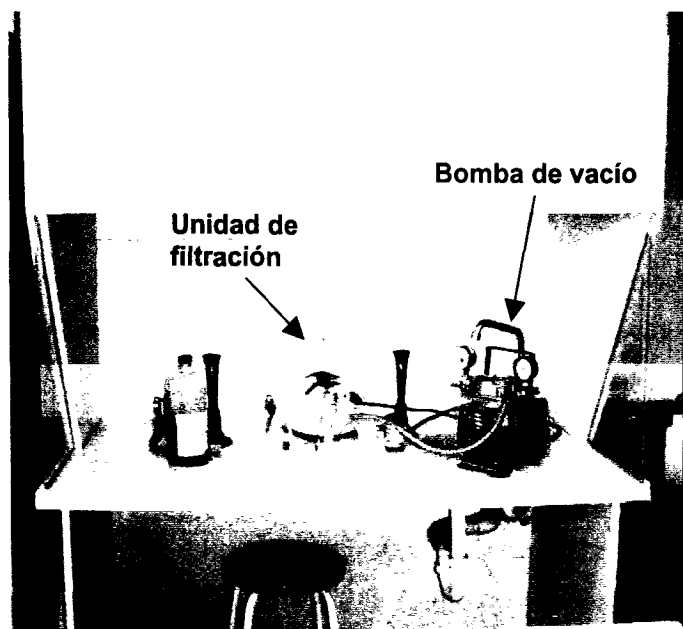


Figura 4. Campana de flujo laminar. Utilizada para siembras y elaboración de vitaminas esterilizadas

MICROSCOPIO: El microscopio utilizado es de tipo compuesto marca AMERICAN OPTICAL, el cual consta de 4 objetivos: 4X, 10X, 40X y 100X; utilizando para las observaciones del último objetivo aceite de inmersión.

BALANZA: La balanza que se tiene en este laboratorio es de tipo analítica Sartorius-2842 de 160g de capacidad. Se recomienda utilizarla para pesar sustancias de 1 a 150 g. Para pesar vitaminas, metales traza, EDTA y cloruro férrico se recomienda utilizar la balanza analítica que se encuentra en el área de histología del laboratorio.

Los botones utilizados para pesado son A (1 a 9 g), B (10 a 150 g) y E (denominado botón de bloqueo).

El proceso de pesado es el siguiente:

1. Pesado previo del contenedor de la sustancia. El botón E se mueve hacia abajo y se regresa a botón de inicio; se anota el peso observado.

2. Se suma la cantidad del peso observado del contenedor mas el de la sustancia a pesar.

EJEMPLO:

Contenedor = 2 g

Cantidad a pesar = 75 g

Total = 77 g (Con los botones A y B se coloca la cantidad a pesar)

3. Se enciende la balanza y se va agregando la cantidad correspondiente hasta que la balanza marque las décimas de gramo observadas al pesado previo

4. Una vez alcanzado el peso deseado se regresa a ceros la balanza, con los botones A y B.

DESTILADOR DE AGUA: El laboratorio consta de un destilador de agua (*Autostill - Jençons*) conectado al agua corriente del laboratorio (figura 5). El aparato se encuentra instalado en el cuarto anexo al laboratorio de cultivo de microalgas; y consiste en lo siguiente: un dispositivo "suavizador" de agua (por medio de iones, "water softener"), un serpentín de vidrio y calentador de agua.

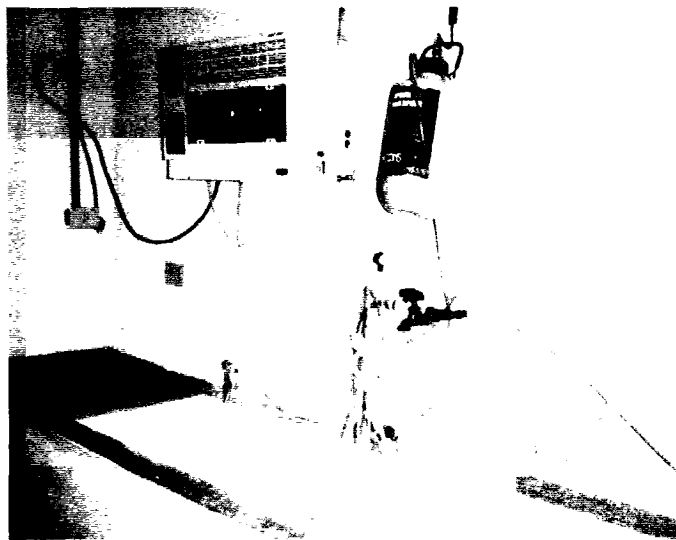


Figura 5. Destilador de agua

Este aparato funciona de manera automática; sólo, es necesario que se conecte y se enciendan los calentadores (2 botones de encendido). Estos tienen un sensor con el cual controla la entrada del agua y la evaporación de ésta, por lo que será necesario entonces estar verificando que el contenedor a llenar con agua destilada no se desborde; el resto lo realiza el aparato automáticamente.

4.2 AREA HÚMEDA

Ésta área presenta una superficie de 6x9 m, comprende aquella donde se llevan a acabo los cultivos. Esta provista de agua marina, canal de desagüe, luz, aireación y temperatura controlada. Debido a la importancia de ésta área es recomendable tomar en cuenta normas y medidas de limpieza, de las cuales se hablará posteriormente.

4.2.1 TRATAMIENTO DEL AGUA UTILIZADA

El tratamiento del agua de mar utilizada es de vital importancia para un óptimo desarrollo de los cultivos. Toda aquella agua utilizada para el cultivo de microalgas debe ser tratada para remover materia particulada, protozoarios, otras especies de microalgas, bacterias y ciertos metales disueltos. El tratamiento puede ser simple o complejo dependiendo de la fuente de agua utilizada.

SISTEMA DE FILTRACIÓN E IRRADIACIÓN DE AGUA MARINA: El sistema utilizado en este laboratorio consta de cuatro lámparas UV de 30 W cada una, dando un total de 120 W lo que da una capacidad de esterilización de 258.5 L/min., además, presenta cuatro filtros de cartucho que van de 15 μm , 10 μm , 5 μm y hasta 1 μm (Figura 6). El protocolo para su uso se encuentra en el ANEXO III.

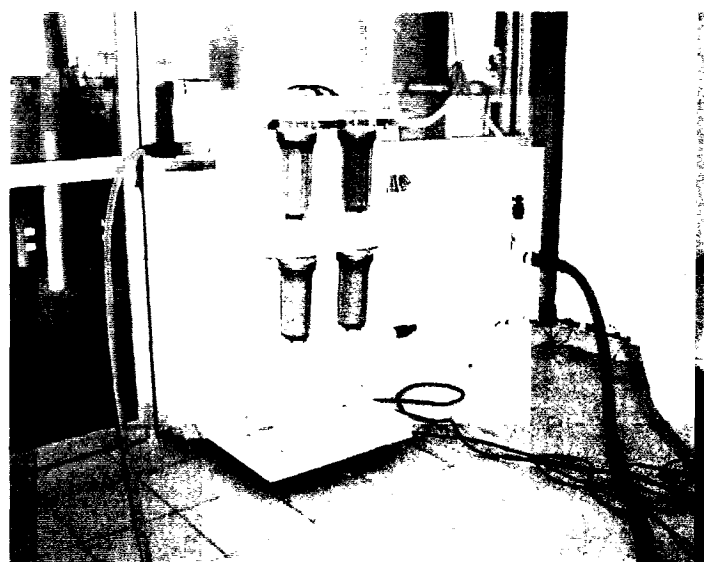


Figura 6. Sistema de filtración e irradiación de agua marina

SISTEMA HIDRÁULICO MARINO: El agua proviene de la bahía a través del denominado “canal de llamada” el cual presenta una longitud de 200 m de largo y una serie de decantadores; después del canal el agua pasa a través de un primer filtro de arena, se vierte en dos contenedores de donde es bombeada a un segundo filtro de arena (figura 7), llegando finalmente al área húmeda donde pasa por el sistema de filtración e irradiación de agua marina. El protocolo para su uso se encuentra en el ANEXO III.

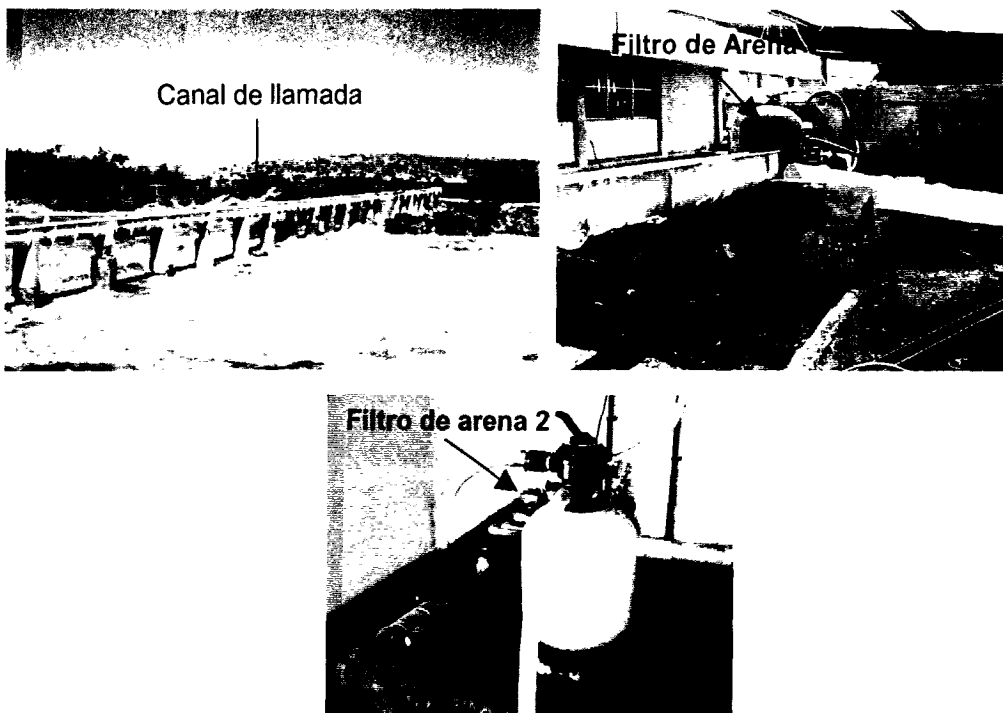


Figura 7. Sistema hidráulico marino

4.2.2 CULTIVOS MASIVOS

Definiremos así a los cultivos de microalgas en los cuales se suministra aire con el objetivo de permitir que los microorganismos reciban la misma intensidad de luz y específicamente son utilizados de forma directa como alimento de la especie de organismo en cultivo.

El tipo de cultivo utilizado en este nivel es el denominado Semicontinuo o Continuo, dependiendo de los requerimientos de producción. Un cultivo semicontinuo se caracteriza por la remoción regular de un volumen estándar de cultivo a ciertos intervalos de tiempo y el reemplazo de éste con medio nuevo para obtener el volumen original; lo que se conoce como razón de dilución. Un cultivo continuo es aquel en donde la cosecha y renovación de nutrientes es constante dependiendo de la tasa de división de la microalga. Lo anterior permitiendo teóricamente el crecimiento exponencial continuo del cultivo.

A partir de las bolsas de 20 L hasta las tolvas de 400 L, consideraremos a estos cultivos como masivos (figura 8). A éstos se les proporciona agua de mar tratada con el sistema anteriormente mencionado, luz constante y aireación.



Figura 8. Cultivos masivos. Bolsas de 20 L y tolvas de 400 L.

Prácticamente, el inicio de los cultivos masivos se realiza con la bolsa de polietileno con capacidad para 20 L, esta, a su vez siendo sembrada a partir de un matraz Fernbach (*cultivo estático*) de 3 a 5 días dependiendo de la especie a cultivar.

El proceso de elaboración de las bolsas se realiza de la siguiente manera:

1. Del rollo de plástico de 50 cm de ancho se corta la bolsa de 120 cm de largo.
2. Con la selladora previamente calentada (esperar 5 minutos después de encenderla) se forma un ojal en uno de los extremos de la bolsa para que se pueda colgar en el sistema de columpios y el extremo opuesto será sellado en su totalidad (figura 9).

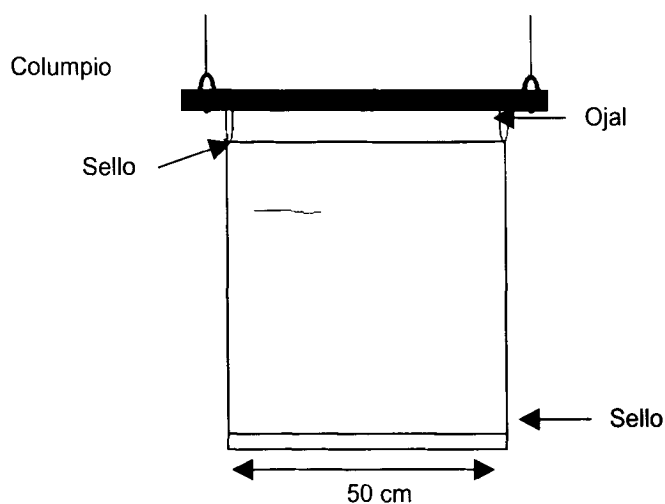


Figura 9. Bolsa de plástico montada en el sistema de columpio

La permanencia de este volumen de cultivo (bolsas de 20 L) será de entre 3 y 5 días dependiendo de la especie, pero no deberá exceder de este tiempo.

La siguiente etapa de cultivo es la tolva; ya sea de 100 ó 400 L. Son tolvas cilíndricas de fibra de vidrio translúcido, las cuales se siembran con la bolsa, añadiendo 80 L de agua marina y los nutrientes correspondientes.

El tiempo de duración de estos cultivos dependerá de los requerimientos para su utilización. Se recomienda que los cultivos semicontinuos no pasen de más de 15 días en este sistema; lo anterior para asegurar la calidad de la microalga a utilizar, además de servir como medida de seguridad para el control de las condiciones higiénicas y asépticas del área.

Se hace necesario que una vez terminadas de utilizar las tolvas, cada usuario las enjuague con agua dulce y cloro, cepillando las paredes y el cono. Se sugiere que en caso de que quedasen restos de microalgas en el cono, se deje con cloro y agua por no más 24 horas, para evitar dañar el contenedor. Una vez transcurrido este tiempo se enjuaga con agua dulce por y se dejan reposar por lo menos 24 horas antes de volver a usarla. Antes de llenarla con el agua de cultivo se sugiere enjuagarla con agua de mar filtrada e irradiada.

5. ASPECTOS IMPORTANTES DEL CULTIVO DE MICROALGAS

Si bien es un hecho que lo anteriormente escrito presenta una importancia en su mención, los aspectos contemplados en esta sección del texto se tomaron en cuenta a manera de puntualizarlos ya que se consideran como parte medular dentro del cultivo de microalgas.

5.1 CONTAMINACIÓN

La contaminación de los cultivos de microalgas puede ser biológica, química o física, sin embargo, puede afectar de manera particular o ser una combinación de estos tres tipos.

5.1.1 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN QUÍMICA

Existen diversos patrones indicativos de este tipo de contaminación, si el cultivo se ha "caído" (alta disminución en el número celular) recién sembrada la microalga; conservando ésta su color natural; el problema podría deberse a la composición del agua, poca circulación o cambio repentino de temperatura. En este caso las células están vivas y deben reponerse incrementando la agitación.

Cuando el cultivo se toma blanco dentro de las 24 h de sembrado probablemente se debe al cloro residual y otros químicos disueltos en el agua.

Si el cultivo conserva un color claro después de 3 ó 4 días observando poco crecimiento, se puede deber a que la fuente de luz es poca o existe un desbalance en los nutrientes.

Cultivos viejos (de 15 o más días de cultivo) que inician una deficiencia en nutrientes generalmente se toman turbios y algunos otros levemente claros. Esfuerzos por recobrar estos cultivos ya carentes de nutrientes son inútiles.

5.1.2 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA

Los tipos más comunes de contaminación biológica son excesivos niveles de bacterias, otras microalgas, protozoarios o macroalgas. Si un cultivo después de 3 ó 7 días cambia de color y eventualmente se aclara la causa más común se debe considerar provocada por protozoarios. Excesivo crecimiento de bacterias se manifiesta como agua turbia, bajo crecimiento y colapso del cultivo.

5.2 CONTROL DE LA CALIDAD DEL AGUA MARINA

Como ya se mencionó en la sección 4.2.1, en este laboratorio el agua es tratada con filtración e irradiación a través de rayos ultravioleta, teniendo la seguridad que es suficiente para asegurar agua marina de buena calidad

Otra manera para tratar el agua puede ser mediante la cloración de la misma neutralizándola después con tiosulfato de sodio. El procedimiento en caso de que se desee realizar se hace a partir de la bolsa de 20 L a las tolvas de 400 L agregando 1 mL de cloro por cada 5 litros de agua marina y se deja con aireación hasta el día siguiente; para neutralizar agrega el tiosulfato de sodio en una concentración de 1.5 g por cada 4 mL de cloro utilizado. Sin embargo, el tratar el agua con luz UV y filtración ha sido

suficiente y eficiente para efectos del cultivo. Se recomienda de ser posible no utilizar cloro para preparar el agua de cultivo.

Un aspecto importante a considerar para evitar cualquier contaminación es pedir a los usuarios que mientras estén trabajando en el laboratorio utilicen botas de hule de manera tal que pueda introducir los pies en un recipiente de plástico conteniendo cloro diluido que se encuentra a las entradas al laboratorio de cultivo (área húmeda). Es necesario entonces que al regreso del cuarto de bombas enjuaguen su calzado con agua y después pisen el recipiente con cloro.

No es posible permitir que los cultivos a cualquier nivel pasen del tiempo estricto de cultivo, esto es para evitar que una vez que estos cultivos estén viejos y sean propensos a la bacterización puedan ser foco de infección para otras tolvas.

Se hace necesario que el usuario marque las mangueras utilizadas para cosecha de tal forma que se hagan responsables de su mantenimiento y limpieza y que estas no sean fuente de contaminación. Se deberán enjuagar con agua dulce y secar antes de guardarlas.

Se recomienda después de las cosechas de las tolvas o de haber trabajado en el área, que esta sea enjuagada con agua dulce y secada con un trapeador limpio; en algún caso se hará necesaria la limpieza con cloro.

5.3 INÓCULO

Una vez que se tiene evaluada la cinética de crecimiento de la microalga se debe tomar en cuenta que la mayoría de las células inoculadas (sembradas) pueden ser viables pero no en una condición de dividirse inmediatamente, específicamente si el cultivo de donde proviene el inóculo ("cultivo madre") es viejo, las enzimas pueden estar inactivas y las concentraciones de metabolitos pueden decrecer a niveles insuficientes para la división celular (Cañizares et al., 1994).

Se sabe que existe una relación entre la longitud de la fase lag y la edad del inóculo; esto es, la duración de la fase lag en el cultivo iniciado será menor mientras que el inóculo sea tomado durante la fase exponencial del "cultivo madre" (Fogg y Thake, 1987).

5.4 NIVEL CEPARIO

En esta etapa de cultivo se hace necesaria la mayor precaución en medidas asépticas y en control y verificación de las condiciones de la microalga. Se deberá observar cada 15 días a las microalgas para verificar las condiciones de cultivo (figura 10).

Los volúmenes recomendados a utilizar a nivel cepario son:

Tubos con 10 mL de medio de cultivo

Matraces Erlenmeyer de 75 mL de medio de cultivo

Cajas de Petri con agar

Agar inclinado

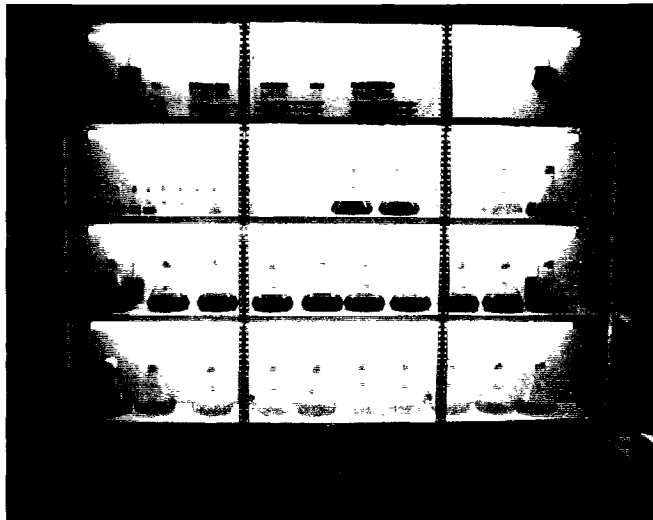


Figura 10. Estante con cultivos a nivel cepario (tubos con 10 mL y matraces con 75 mL) y cultivos estáticos (matraces con 1500 mL)

ESTERILIZACIÓN: Se utiliza estrictamente el autoclave y el material debe estar previamente con HCl al 10% tal cual se describió anteriormente.

Los matraces o tubos se llenan con el volumen de medio requerido 10 mL, 75 mL, 100 mL ó 150 mL. Se recomienda tener ya preparada agua de mar filtrada e irradiada con medio de cultivo (macronutrientes y micronutrientes).

El agua utilizada en este nivel antes de ser preparada con nutrientes se baja en salinidad. Esto es de 35 ups que presenta a 30 ups con agua destilada, dependiendo del volumen que se va a preparar (Tabla III).

El agua de cultivo preparada para este nivel puede ser refrigerada por un tiempo no mayor a 15 días, se recomienda entonces al momento de su elaboración fechar el contenedor.

Una vez que los matraces ya contienen el agua de mar preparada con nutrientes se introducen al autoclave con el medio de cultivo (a excepción de las vitaminas y silicatos para el caso de diatomeas) por 15 minutos en el dispositivo "slow liquids"; esto es para los tubos y matraces; para el caso de la preparación de agar se describirá posteriormente.

Tabla III. Relación del volumen de agua marina y agua destilada

Volumen a Preparar	Agua marina	Agua destilada
2000 mL	1700 mL	300 mL
1000 mL	850 mL	150 mL
500 mL	425 mL	75 mL

NOTA: se puede tener agua de mar filtrada e irradiada sin nutrientes en un contenedor de 20 l. se recomienda mantenerlo lejos del sol, en este caso se guarda en el estante del laboratorio. el tiempo de duración de esta agua viable dependerá de la temporada, esto es, en invierno puede durar 20 días, en verano no mas de 10 días. Se recomienda durante cada llenado del contenedor lavar y enjuagar previamente el recipiente.

VITAMINAS: Las vitaminas se colocan hasta el momento en que se va a sembrar, para evitar que se desnaturalicen con el calor y la presión del autoclave, por lo que éstas deben estar esterilizadas a través de una unidad de filtración (Figura 4).

Modo de preparación:

1. Todo el proceso deberá realizarse en la campana de flujo laminar.
2. Se coloca un filtro whatman GFC de 25 mm de diámetro en la unidad de filtración, la cual estará conectada a un matraz kitasato de 250 mL, que a su vez se conecta a través de una manguera a una bomba de vacío.
3. Se procede a encender la bomba de vacío y se comienza a filtrar la "solución primaria" de vitaminas.
4. Una vez terminada de filtrar la "solución primaria", se vierte el agua destilada necesaria para hacer la solución de trabajo.
5. Ya lista la solución de trabajo, esta deberá colocarse en un tubo o frasco previamente esterilizado y guardarse en el refrigerador.

IMPORTANTE: Todo el material utilizado deberá estar previamente esterilizado en el horno a una temperatura de 80°C durante 6 horas (Figura 11); el agua destilada también deberá estar esterilizada en el autoclave y estar fría al momento de usarse.

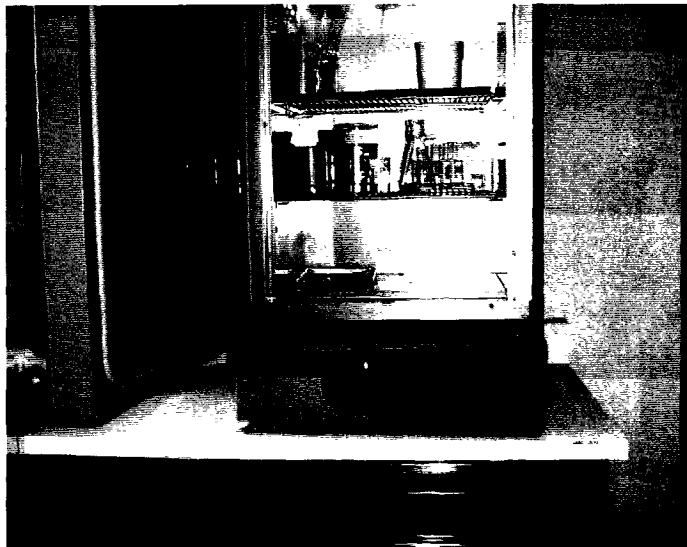


Figura 11. Horno de precisión

SILICATOS: Los silicatos también se esterilizan en el autoclave en un tubo de ensaye por separado del resto de los nutrientes debido a la tendencia que presentan a precipitarse.

SIEMBRA: La siembra o inoculación de los matraces, tubos, cajas o agar inclinado para cultivo se lleva a cabo con el siguiente proceso (figura 12):

1. Limpiar con alcohol el área de trabajo.
2. Prender ambos mecheros de la campana de flujo laminar.
4. Encender el interruptor de la campana y esperar 5 minutos.



Figura 12. Siembra del cepario en la campana de flujo laminar

5.4.1. SIEMBRA EN LIQUIDO

Los volúmenes que se siembran en la campana van desde tubos de 10 mL hasta matraces Fernbach de 1500 mL. Previo al sembrado de los tubos y matraces, hay que asegurarse que el agua donde se transferirá la microalga está a la misma temperatura que las microalgas de las que se tomara el inóculo. Para lograr lo anterior se recomienda dejar los matraces o tubos ya esterilizados en el área de cultivo (área húmeda). Al momento de la siembra en la campana de flujo laminar, se agregan primero a los matraces las vitaminas y los silicatos y después el cultivo.

Las proporciones de vitaminas y silicatos serán según el volumen (tabla IV), tomando en cuenta la formulación del medio f/2 de Guillard y Ryther (1973) de 0.5mL/L de vitaminas y 1mL/L de silicatos.

Tabla IV. Proporción de vitaminas y silicatos de acuerdo al volumen a utilizar

VITAMINAS		SILICATOS	
VOLUMEN (mL)	PROPORCIÓN	VOLUMEN (mL)	PROPORCIÓN
10	5 μ L	10	10 μ L
75	0.0375	75	0.075
100	0.050	100	0.100
150	0.075	150	0.150
1500	0.75	1500	1.5

Para agregar estas cantidades se utiliza una pipeta automática (Eppendorff) con puntas previamente esterilizadas. Para la esterilización de las puntas se colocan en un frasco de vidrio para autoclave con tapadera y un algodón en el fondo o en cajas de plástico resistentes al calor (el primero para puntas de 100 μ l y el segundo para el caso de las puntas de 1 mL) se meten en el autoclave junto con los matraces a esterilizar y solo se abrirán para su uso en la campana de flujo laminar.

El inóculo utilizado en este tipo de volúmenes dependerá del propósito de los mismos. Si se está transfiriendo el cultivo para aumentarlo en volumen se utilizará el 5 ó 10% del volumen a sembrar. Si sólo se requiere como respaldos para los trabajos de investigación se sembrara 1 mL de microalgas en los matraces y 0.5 mL en los tubos.

Al realizar la siembra se deberá agitar la muestra y esperar de 2 a 3 minutos para que las microalgas se distribuyan en la columna de agua. Una vez hecho esto, con la ayuda de la pipeta automática, se toma la muestra de la superficie para asegurarse de tomar microalgas activas. Para las especies de microalgas sin flagelo funciona de la misma manera a diferencia que la permanencia de estas en la columna de agua es menor, pero a la vez, suficiente para realizar las inoculaciones.

Cada vez que se abra un tubo o matraz, antes y después de tomar o depositar la muestra se pasará la boca de cada uno por la flama del mechero como medida de seguridad.

El tiempo de cultivo de estos volúmenes es de máximo 7 días para los matraces de 75,100 y 150 mL y de 15 días para los tubos de 10 mL.

5.4.2 SIEMBRA EN SÓLIDO

Este tipo de rutina se realiza para tener en medio sólido las especies de microalgas del cepario. Se pueden tener cajas de Petri o tubos de ensaye; todo dependerá de las disponibilidades del laboratorio.

1. Se utiliza agar bacteriológico, utilizando 14.5 g por cada litro de agua marina a preparar.
2. Al agua marina filtrada e irradiada y previamente calentada (3 minutos en el microondas) se le agrega el agar, y los nutrientes (macros, micros y silicatos) en proporción a la cantidad de medio que se desee preparar.
3. La mezcla se agita un poco hasta observar que toda la solución se encuentre en suspensión para que no se pegue en el matraz.
4. Cuando la mezcla se observe transparente inmediatamente se mete a el autoclave a 15 lb/pulg² , 121°C, por 15 minutos.
5. Antes de sacarlo del autoclave es necesario abrir parcialmente la puerta, para evitar un cambio brusco de temperatura que afecte a la mezcla; ésta presentará un color amarillo cristalino.
6. Esperar aproximadamente de 15 a 20 minutos para que la mezcla baje de temperatura adecuada para poder manejarla y llenar las cajas de Petri o los tubos de ensaye.
7. Antes de iniciar el llenado se deben de agregar las vitaminas en el agar.
8. Es importante etiquetar tanto las cajas como los tubos con el nombre de la especie y la fecha de siembra.

LLENADO DE LAS CAJAS DE PETRI

1. Se realiza en la campana de flujo laminar.
2. Se vierte la mezcla dentro de la caja en un volumen de 30 mL aproximadamente (esto es sin pasar del primer borde de la caja).
3. La caja semicerrada se coloca en un lugar dentro de la campana, esperando a que enfíe un poco para evitar condensación.
4. Una vez terminado de llenar las cajas se van poniendo una sobre otra para dejarlas que se solidifiquen (estas columnas no deberán ser mayores de 5 cajas),

aproximadamente 1 h, durante este tiempo únicamente la campana se dejará encendida (los mecheros se apagan) ya solidificadas se guardan en el refrigerador.

5. Al día siguiente se revisan las cajas y si alguna presenta condensación se mete a la incubadora a 30°C por 4 horas.

6. No es recomendable utilizar aquellas cajas donde la condensación no se elimine por completo.

LLENADO TUBOS DE ENSAYE (AGAR INCLINADO)

1. La mezcla se vierte en los tubos con ayuda de una pipeta de 10 mL en una proporción de entre 9 y 10 mL aproximadamente.

2. Después se meten en el autoclave para la esterilización.

3. Una vez esterilizados se colocan en el ángulo de inclinación (figura 13), que se obtiene colocando los tubos sobre una pipeta de 5 mL.

4. Se dejan solidificar hasta el día siguiente.

5. En caso de condensación se meten a la incubadora a 30°C por 4 horas.

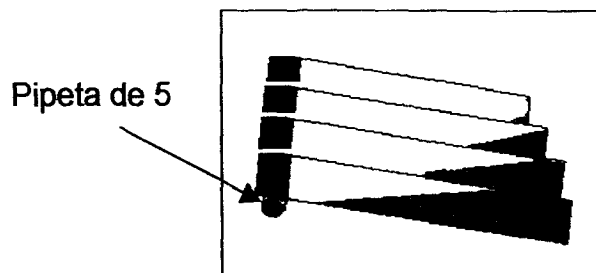


Figura 13. Tubos con agar, colocados sobre una pipeta de 5 mL.

SEMBRADO EN AGAR

1. Se realiza en la campana de flujo laminar.
2. Se utiliza un asa bacteriológica.
3. El asa se pasa por el mechero hasta el rojo vivo.
4. Se abre la caja o tubo respectivo de donde se sembrara.
5. El asa se enfría (1 segundo) en las paredes de la caja o tubo y se toma la muestra de microalga.
6. El rayado es en zig-zag, en la caja o en el tubo (figura 14).
7. Después de descargar el asa, esta se pasa por el mechero, hasta rojo vivo antes de iniciar otra siembra
8. Las cajas de Petri se sellan con papel "parafilm", se colocaran para cultivo invertidas (el lado del agar hacia la fuente de luz) en el área del cepario.
9. Los tubos se colocaran en la gradilla de manera invertida (con el tapón hacia abajo).



Figura 14. Sembrado en zig-zag sobre agar

Los resultados de crecimiento en placa se observaran entre los 7 y 10 días de sembrado. Se deberá observar el crecimiento de cada una de las colonias de manera tal que se pueda detectar si presentan alguna alteración en el color o forma; esto sería un indicativo de contaminación. La coloración dependerá del color de la microalga en medio líquido, y generalmente su aspecto es brillante y homogéneo.

Se sugiere para el sembrado de transferencia, escoger las colonias que se encuentren al final del rayado de la placa o el tubo, pues estas presentan una carga menor de bacterias.

El tiempo de cultivo de las microalgas en sólido dependerá de la especie, pero este va de 15 a 20 días en placa y hasta 1 mes en tubo, dependiendo de la carga bacteriana del cultivo.

Una vez pasado éste tiempo en el caso de las cajas de Petri si son de plástico se meten a la autoclave ("Fast-Instrument", 10 min) en un recipiente de plástico para evitar que el material diluido se escurra dentro del aparato y estas cajas se desechan.

En el caso de cajas de Petri de vidrio y los tubos de ensaye (colocados en una gradilla con el tapón hacia arriba) es el mismo procedimiento. Estas se pueden recuperar, solo se lavan siguiendo el procedimiento de limpieza ya mencionado.

5.5 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS

Se recomienda que se realicen monitoreos periódicos de la población bacteriana presente en los cultivos de microalgas. En el laboratorio se realizan estos una vez cada 3 ó 4 meses.

Estos análisis se realizan a través del método de extensión en superficie, utilizando dos diferentes medios bacteriológicos; agar marino para la observación de bacterias en general y TCBS (Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa DIFCO 0650-01-2) para observar si existe la presencia *Vibrio*.

MEDIO DE AGAR MARINO

1. El agar marino se prepara utilizando 55.1 g de este por cada litro de agua destilada (previamente calentada) a preparar, luego se sigue el procedimiento del sembrado en sólido para la esterilización y llenado de las cajas (sección 5.4.2.)
2. Para el sembrado en placa (que se realiza en la campana de flujo laminar) se hacen diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-10} es decir, cada tubo tendrá 9 mL de agua destilada, al tubo número 1 se le coloca 1 mL de la microalga, de este tubo se toma 1 mL que se coloca en el tubo número 2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo número 10 (figura 15).
3. Del tubo número 10 se va a tomar 0.1 mL que será colocado en la placa cuidadosamente con ayuda de una pipeta automática.

- Este 0.1 mL será distribuido en la placa con ayuda de una varilla de vidrio estéril doblada en un ángulo de 90° (mojada en alcohol y luego pasada por el mechero y dejando que se enfríe), mientras se gira la placa con la mano simultáneamente, hasta que se absorba completamente el inóculo. Es decir, una vez que se ha colocado el 0.1 mL de cultivo en el agar, este se extenderá por toda la placa con la varilla hasta que se observe que no queda líquido sobre el agar.
- A continuación las placas sembradas se invierten y son colocadas en la incubadora a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h.
- Transcurrido el tiempo se prosigue al conteo de colonias, colocando las placas en un contador de colonias Quebec.

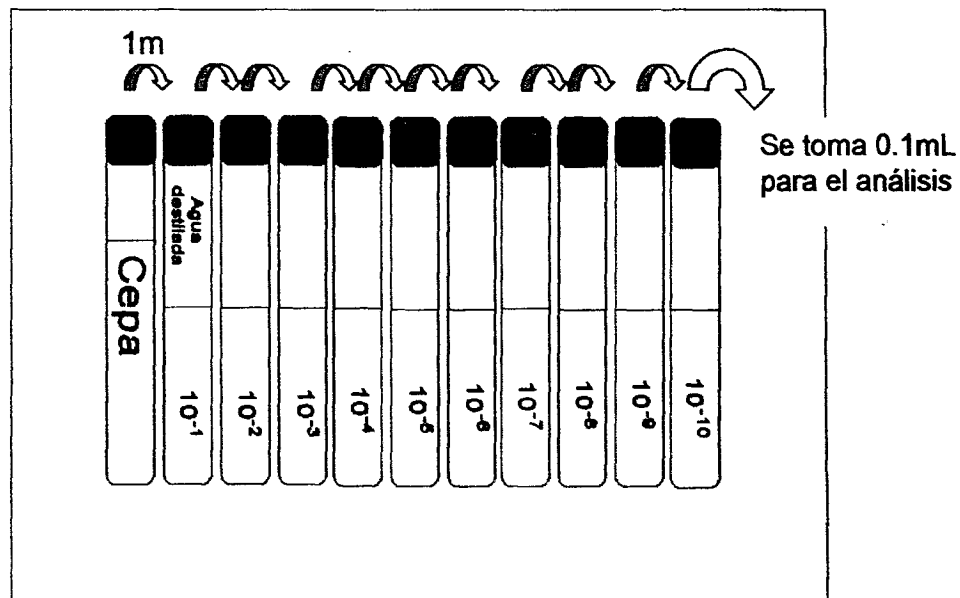


Figura 15. Dilución del cultivo, para la toma de muestra en un análisis bacteriológico

MEDIO DE TCBS

- Se utilizan 89 g por cada litro de agua destilada (previamente calentada hasta la ebullición) a preparar. NO se utiliza el autoclave.
- Se deja enfriar un poco (aproximadamente 15 minutos) para el llenado de las placas.
- A continuación se sigue la misma metodología que para el medio de agar marino a partir del punto número 2.

6. EVALUACIÓN DE LA BIOMASA

Para alimentar a los cultivos principales es necesario conocer cual es la concentración de biomasa que presentan los cultivo de microalgas, para así saber cual es la proporción de alimento que se va a suministrar. Los métodos utilizados en este laboratorio para medir biomasa se describen a continuación.

6.1 HEMATOCITÓMETRO O CÁMARA DE NEUBAUER

Presenta dos cámaras. En la cara superior del portaobjetos, se encuentran cuatro canales longitudinales y un canal transversal central, a cuyos lados superior e inferior existen grabados dos cuadros de 9 mm^2 de superficie, subdivididos a su vez en una cuadrícula más fina (Figura 16).

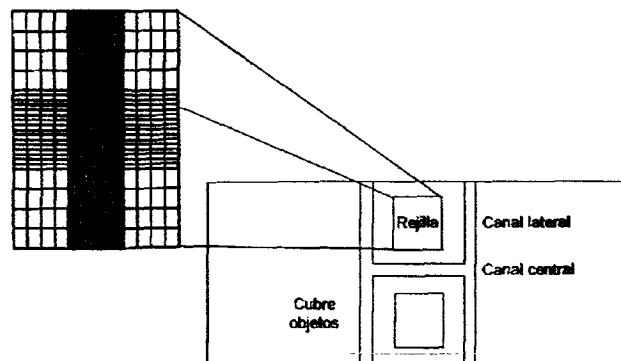


Figura 16. Cámara de conteo Neubauer. Utilizada para conocer la concentración de un cultivo

Al colocar el cubreobjetos encima de la superficie donde se encuentra grabada la cuadrícula, existe entre ellos (cuadrícula y cubreobjetos) una distancia fija (profundidad) de 0.1 mm , misma que viene indicada en el portaobjetos. Por lo tanto, el volumen de la muestra problema en uno de los cuadros grandes (de 1 mm^2 de superficie) será igual a $1.0 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3$. Las técnicas de conteo consideran el número de individuos presentes en la muestra de volumen determinado y comúnmente se expresan como número de individuos por cada mililitro. Ya que $1 \text{ mL} = \text{cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$ y como $1000 \text{ mm}^3 = 10,000 \times 0.1 \text{ mm}^3$, entonces $1 \text{ mL} = 10,000$ veces el volumen de la muestra, que como ya se vio es siempre de 0.1 mm^3 .

Vamos a suponer que se hizo un conteo de células en el cuadro central de la cuadrícula, obteniéndose la cifra de 320 células. Para expresar el número de células por mililitro, se multiplica $320 \times 10,000$ ya que son 320 las células existentes en 0.1 mm^3 y $1 \text{ mL} = 10,000 \times 0.1 = 1000 \text{ mm}^3$. El resultado es de 3,200,000 células / mL.

El procedimiento para el conteo es el siguiente:

1. Se toman dos muestras de 1 mL cada una en un tubo de ensaye.
2. Una de las muestras se observa el microscopio sin fijar para efecto de observarla *in vivo*, esto tiene como objetivo verificar las condiciones de la microalga.

NOTA: ESTO SE DEBE HACER CADA SEMANA CON EL CEPARIO, SOLO PARA EFECTOS DE REVISIÓN DEL CULTIVO.

3. La otra muestra se fija con lugol (1 gota); el lugol puede ser preparado de la siguiente forma:

solución tipo 1: Tinción Gram = 1:5 (lugol: agua destilada) (*utilizada en el laboratorio*) o

solución tipo 2: 1:1:1(lugol:formol:agua destilada).

4. Dependiendo de la densidad del cultivo se puede hacer dilución de la muestra para efecto de conteo. Para la determinación de la dilución a usar se observara la muestra en la cámara de conteo y si el número de microalgas localizadas en los cuadros de 4×4 de la cámara es mayor a 100 se procede a diluir la muestra. Por ejemplo: si se agregan 5 mL de agua marina filtrada e irradiada + 1mL de muestra la dilución es de f.d.(factor de dilución) = 6 mL y así sucesivamente.

5. El llenado de la cámara que se utiliza en el laboratorio es por cualquiera de los canales laterales, iniciando en uno de ellos hasta que la muestra pase al otro lado y se cubran ambas rejillas de la cámara.

6. La fórmula para obtener el número de células por mililitro dependerá de las cuadrículas utilizadas en la cámara (Figura 15) esto es:

1) $(\text{No. de células contadas} / \text{No. de cuadros contados}) (10,000)$ ó $\{[\text{No. de células contadas}](\text{f.d})\} / \text{No. de cuadrantes contados} (10,000)$.

Quando se cuentan los cuadros 4L se dividirá entre 4, esto por cada una de las rejillas de la cámara.

2) $(\text{No. de células contadas}) (10,000)$ ó $(\text{No. de células contadas})(\text{f.d})(10,000)$

esto cuando se cuenta solo un cuadro L.

3) $(\text{No. de células contadas}) (10,000) (5)$ ó $(\text{No. de células contadas}) (\text{f.d.}) (10,000) (5)$

cuando se cuenta el cuadro del centro de la rejilla (las 4E + E central), este tipo de conteo se realiza para las microalgas menores a 8 μm (*Nannochloris sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Micromonas pusilla*).

6.2 ESPECTROFOTÓMETRO

Este tipo de metodología de densidad óptica o absorbancia es muy utilizado para la determinación de biomasa de las microalgas, presentando la ventaja de poder leer rápidamente. Para poder basarse en este método es necesario realizar curvas de calibración para cada especie que se desee medir.

Para la lectura de la muestra el procedimiento es el siguiente:

1. Se homogeniza la muestra y se toma un volumen de aproximadamente 20 mL en un recipiente.
2. Se procede a leer en el espectrofotómetro (figura 17) a una longitud de onda de 750 nm (donde no exista interferencia por pigmentos).
3. Se calibra con un blanco (de agua de mar filtrada e irradiada) a 0 de absorbancia.
4. Se lee la muestra y se registra la absorbancia.

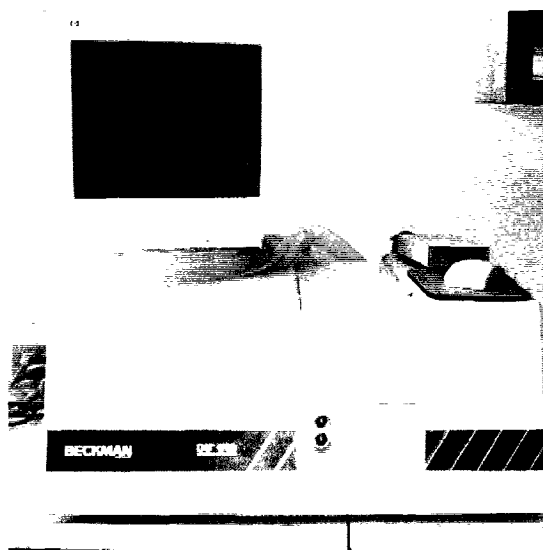


Figura 17. Espectrofotómetro. Utilizado para medir biomasa a través de longitudes de onda

6.2.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Las curvas de calibración que se dan a continuación fueron hechas para las especies más utilizadas en el este laboratorio: *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Dunaliella tertiolecta* y *Chaetoceros gracilis*, en cultivos semicontínuos, ya que es el tipo cultivo masivo que se mantiene en este laboratorio. Es importante recalcar que para utilizar estas curvas se deben mantener las condiciones de cultivo ya mencionadas en el presente manual.

Para obtener las curvas de calibración se realizaron cultivos semicontínuos, en volúmenes de 100 y 400 L, los cuales se mantuvieron durante 15 y 13 días respectivamente. Diariamente fueron tomadas muestras de los cultivos para hacer conteos celulares con el hematocitómetro y lecturas de absorbancia con el espectrofotómetro. Tanto los conteos como las mediciones se hicieron por cuadruplicado. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de regresión lineal para obtener la ecuación de la recta para cada especie y volumen de cultivo. Estas ecuaciones son las que se utilizarán para conocer la concentración en cel/mL del cultivo, utilizando la lectura de absorbancia como nuestra variable independiente.

ECUACIÓN $y = a + bx$

Donde y= variable dependiente (células/mL)

a= ordenada al origen

b= pendiente

x= variable independiente (absorbancia)

CULTIVOS DE 100 L

Isochrysis galbana

Donde a= 580680.943

b= 7069008.38

x= absorbancia

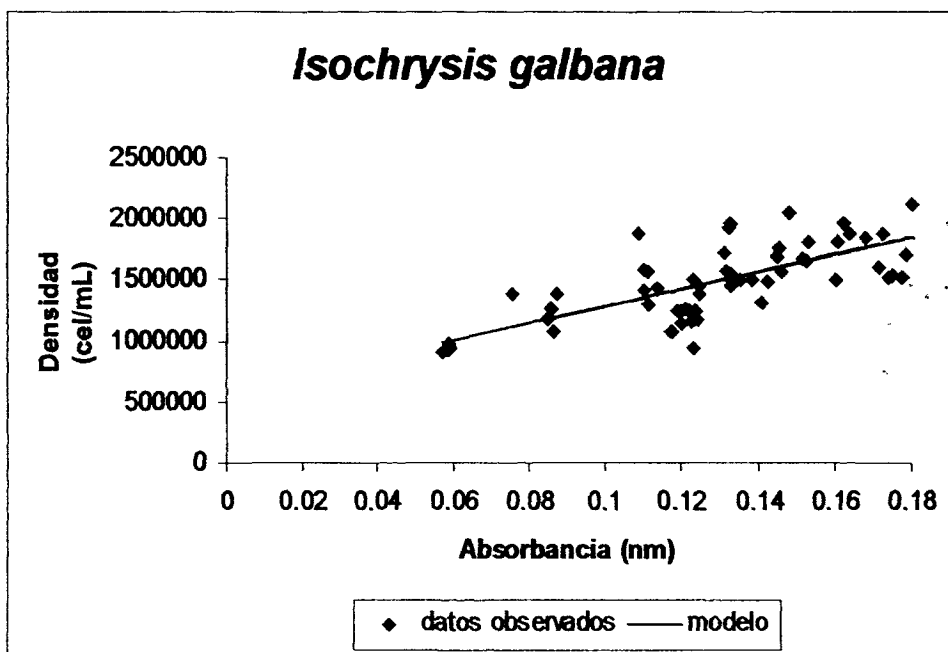


Figura 18. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de *Isochrysis galbana* en cultivos de 100L

Monochrysis lutheri

Donde $a = 534024.34$

$b = 7355434.98$

$x =$ absorbancia

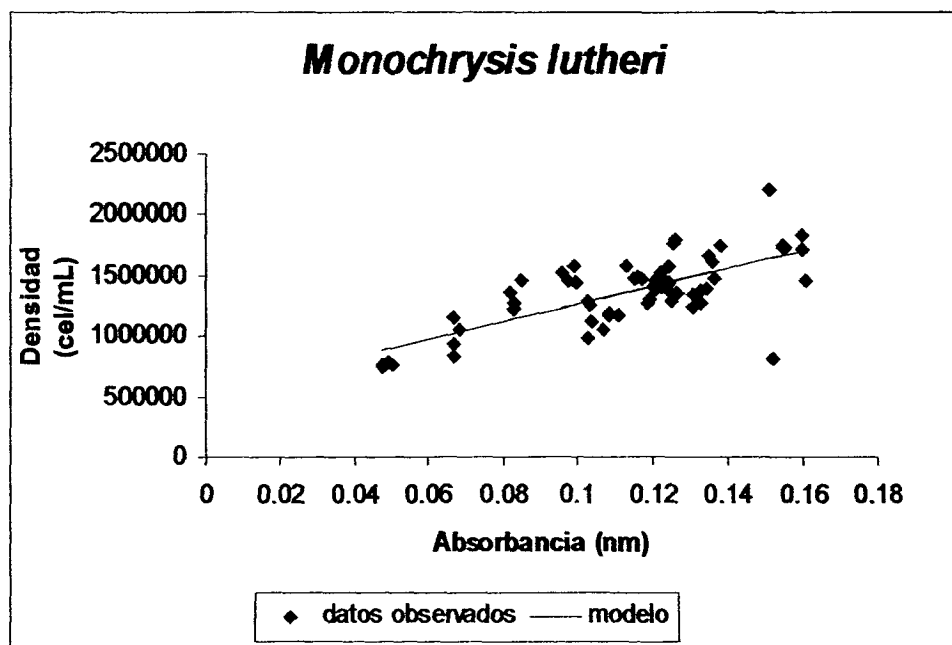


Figura 19. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de *Monochrysis lutheri* en cultivos de 100L

Dunallia tertiolecta

Donde $a = 161737.936$

$b = 2738972.75$

$x = \text{absorbancia}$

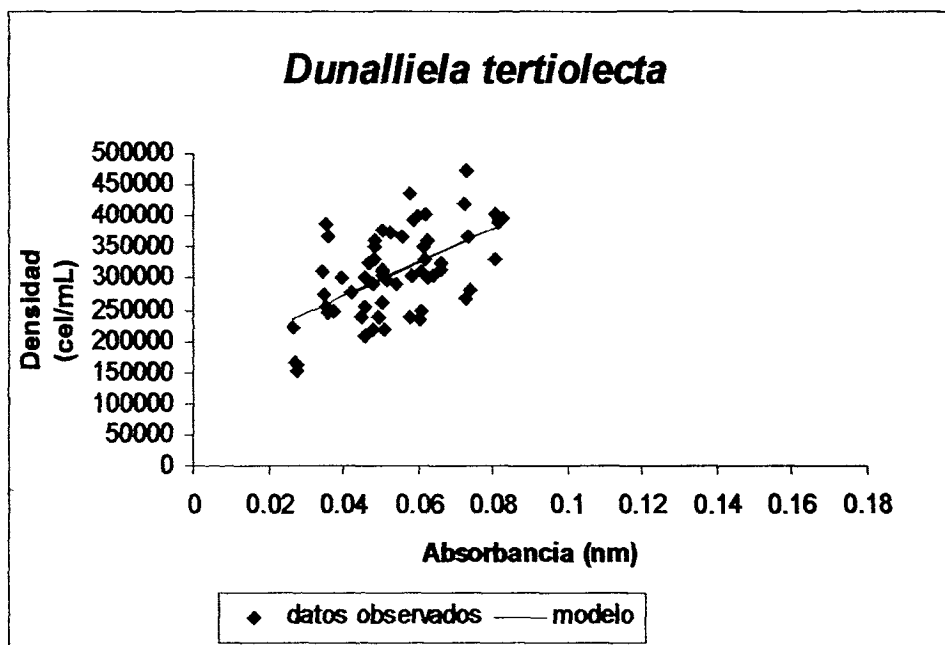


Figura 20. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de *Dunallia tertiolecta* en cultivos de 100L

Chaetoceros gracilis

Donde $a = 354705.199$

$b = 6228837.89$

$x = \text{absorbancia}$

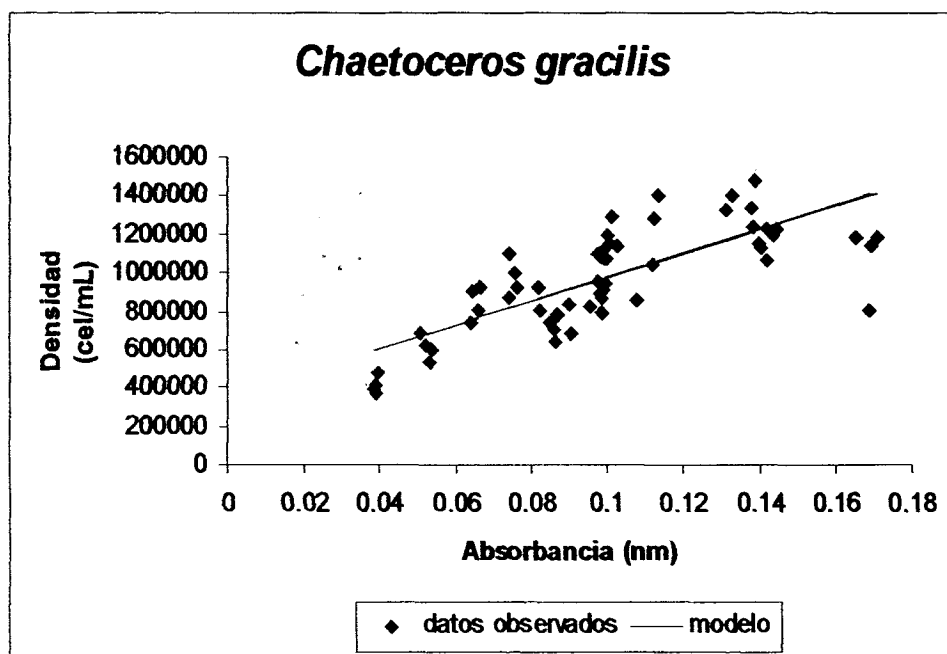


Figura 21. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de *Chaetoceros gracilis* en cultivos de 100L

CULTIVOS DE 400 L

Isochrysis galbana

Donde $a = 100504.156$

$b = 10189981.4$

$x =$ absorbancia

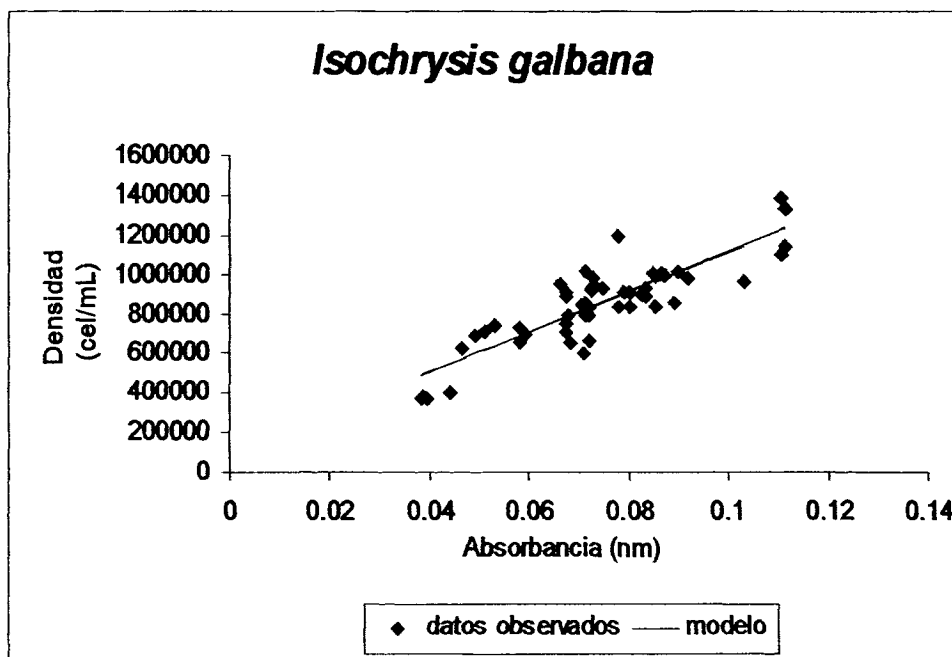


Figura 22. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de *Isochrysis galbana* en cultivos de 400L

Monochrysis lutheri

Donde $a = 172093.1$

$b = 10066436.1$

$x =$ absorbancia

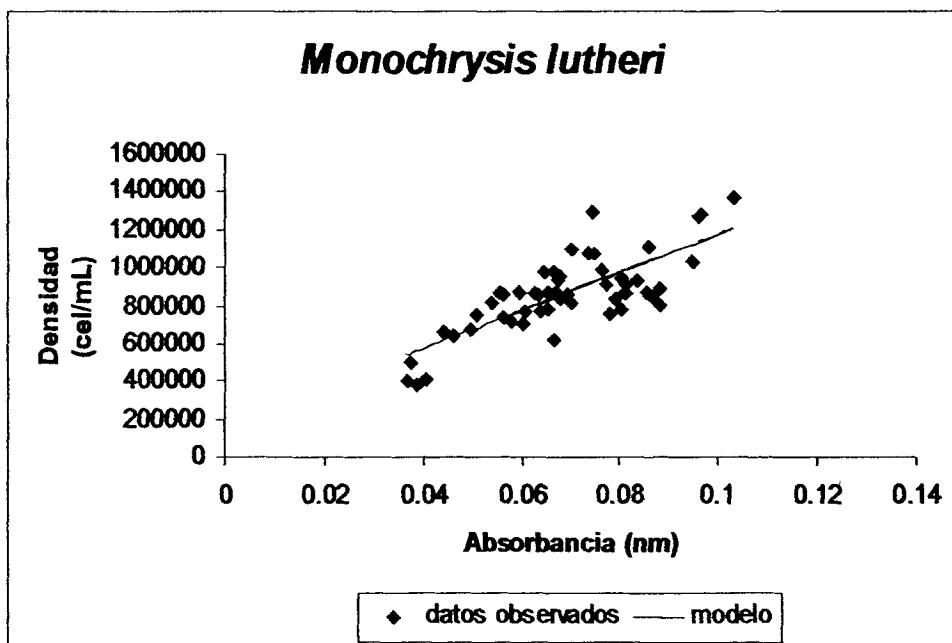


Figura 23. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de *Monochrysis lutheri* en cultivos de 400L

Dunaliella tertiolecta

Donde $a = 56111.3817$

$b = 1807414.9$

$x =$ absorbancia

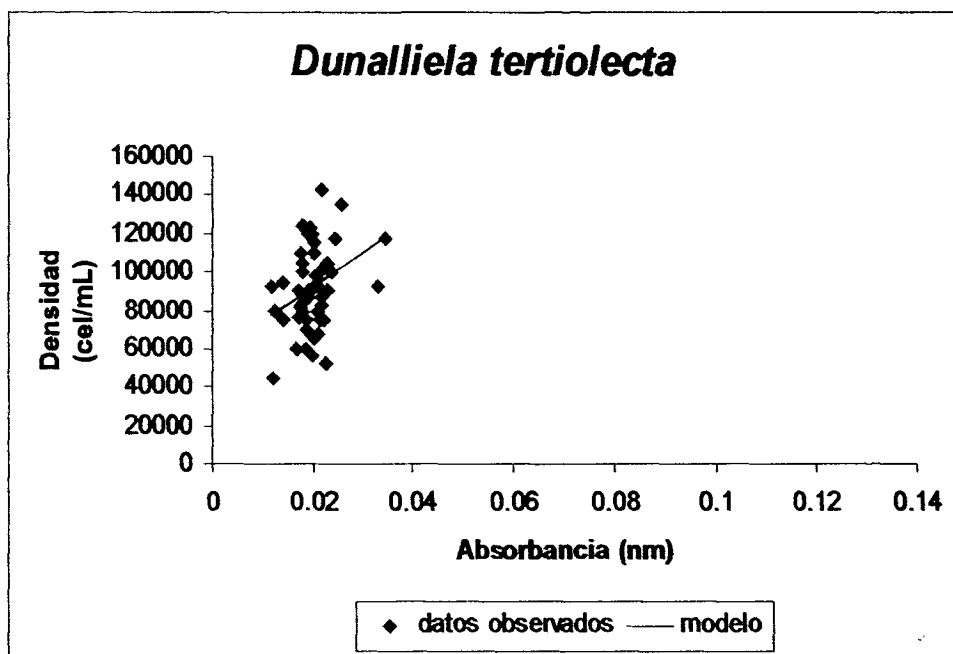


Figura 24. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de *Dunaliella tertiolecta* en cultivos de 400L

Chaetoceros gracilis

Donde $a = 74429.724$

$b = 11035287.6$

$x =$ absorbancia

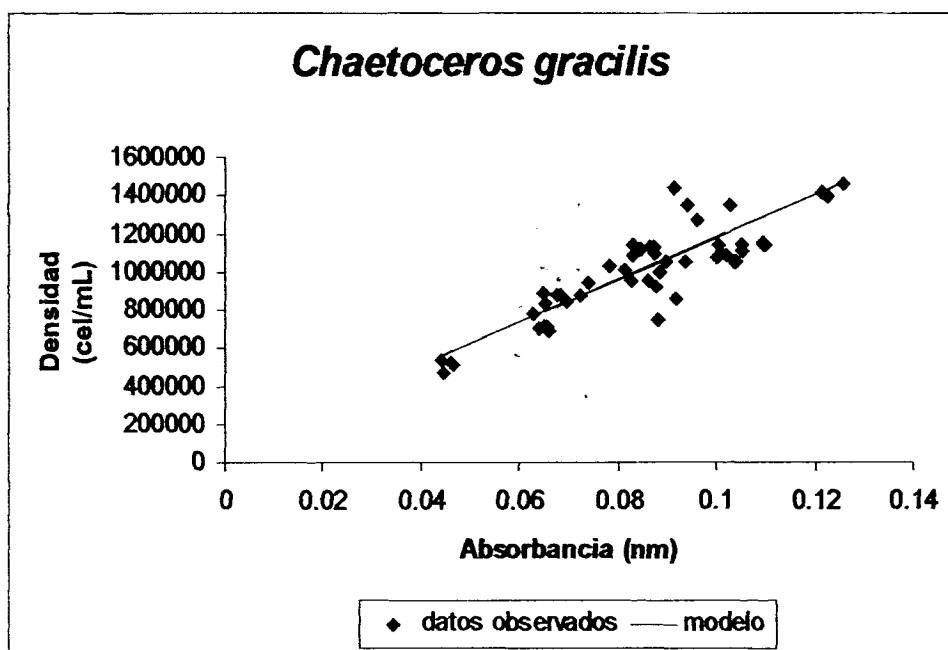


Figura 25. Tendencia de la regresión entre la absorbancia y la densidad de *Chaetoceros gracilis* en cultivos de 400L

7. ESPECIES EXISTENTES EN EL LEAP

El laboratorio consta de 8 especies de microalgas las cuales se enlistan a continuación. El origen de estas cepas esta indicado por el subíndice.

Isochrysis galbana (ISO-C)¹

Monochrysis (Pavlova) lutheri (MONO)²

Dunaliella tertiolecta (DUT2)³

Tetraselmis suecica (TESA)⁴

Tetraselmis tetraathele (TETE)⁴

Chaetoceros gracilis (CHGRA)³

Chaetoceros calcitrans (CHCL)³

Chaetoceros sp (CHX-1)³

Phaeodactylum tricomotum (PHAEOT)⁴

1. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

2. Acuacultores de la Península, S.A. (APSA)

3. Centro Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)

4. Origen desconocido, no existe registro

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., Cid A., Fidalgo, P., Torres, E. y Herrero, C. 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de Coruña. España. 210 pp.
- Cañizares, V. R. O., C. Casas C., A. R. Domínguez B. y D. Voltolina L. 1994. *Las microalgas en la acuicultura*. Cuadernos sobre Biotecnología. CINVESTAV-IPN. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México. 44 pp.
- Carpenter, P. L. 1982. *Microbiología*. Ed. Interamericana. México. 518 pp.
- Dawes, C. J. 1991. *Botánica Marina*. Ed. Limusa. México. 671pp.
- Droop, M.R. 1974. Heterotrophy of carbon. En: W.D.D.Stewart (Ed). *Algae physiology and Biochemistry (Botanical Monographs vol. 10)*. Univ. Of Calif. Press. 530-559 pp.
- Fogg, G. E. and B. Thake. 1987. *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin Press. Third Edition. E.U.A. 126 pp.
- Gladue, R. 1991. Heterotrophic microalgae production potential for application to aquaculture feeds. En: *Rotifer and Microalgae Culture Systems*. The Oceanic Inst. Hawaii. 275-286 pp.
- Guillard, R. R. L.y Ryther 1973. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith, W. L. y M. H. Chanley. (Eds.). *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press. E.U.A. 26-60 pp.
- Hoff, F. and T. Snell. 2001. *Plankton culture manual*. Florida Aqua Farm, Inc. E.U.A. 162 pp.
- Kaplan, D.A; E. Richmond; Dubinsky and S. Aronson. 1986. Algal nutrition. 147-198. En: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press. Inc. E.U.A.
- López, E, Báez, D. y Huerta, A. 1993. *Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas*. Departamento del centro de investigaciones científicas y tecnológicas (CICTUS). Universidad de Sonora, México. 74 pp.
- Martínez, F. E. 1998. Medios alternativos y evaluación de los costos para el cultivo de la microalga *Nannochloris* sp como alimento del rotífero *Brachionus plicatilis* (Muller 1786). *Tesis de Maestría*. UABCS. 90 pp.
- Myers, J. 1962. Laboratory cultures. 595-615. En: *Physiology and biochemistry of algae*. R. Lewin. (Ed.) Academic Press, E.U.A.

- Provasoli, L.; J. A. McLaughlin and M.R. Droop. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Fur. Microbiologie*. 25: 392-428.
- Richmond, A. 1986^a. Cell response to environmental factors. 69-99. En: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press. Inc., E.U.A.U.S.A..
- Spotte, S.H. 1979. *Seawater aquariums: the captive environment*. Wiley- Interscience. E.U.A.U.S.A.. 413 pp.
- Stein, J. R. 1973. *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. USA. 446 pp.

ANEXO I Formulación para la preparación del medio de cultivo f/2 de Guillard y Ryther (1973)

MACRONUTRIENTES	
Reactivo	Cantidad (g/1L)
Nitrato de sodio NaNO_3	75g
Fosfato de sodio $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 g

Disolver los reactivos en 1 litro de agua destilada (Solución de trabajo).
Usar 1 mL por cada litro de agua marina para cultivo.

SILICATOS	
Reactivo	Cantidad (g/1L)
Silicato de sodio $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	25g

Disolver el reactivo en 1 litro de agua destilada, en un recipiente por separado.
Usar 1 mL por cada litro de agua marina para cultivo.

*Silicatos se les considera parte de los macronutrientes, pero solo se utilizan para las diatomeas.

MICRONUTRIENTES	
Reactivo	Cantidad (g/1L)
Solución 'stock' de metales traza	
Sulfato cúprico $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.98 g
Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2 g
Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
Cloruro de manganeso $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18.0 g
Molibdato de sodio $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.63 g
Disolver en 100 mL de agua destilada cada uno de los reactivos por separado (para preparar las soluciones "stock de metales traza") Conservarlas en el refrigerador.	
Cloruro férrico $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15 g
EDTA disódica Na_2EDTA	4.36 g

Para preparar la solución de trabajo de micronutrientes, primero disolver en su totalidad el EDTA disódica, agregar el cloruro férrico hasta que se disuelva; finalmente agregar 1mL de cada una de las soluciones stock de metales traza; aforando a 1000 mL de agua destilada.
Usar 1 mL de esta solución por cada litro de agua marina para cultivo.

VITAMINAS	
Reactivo	Cantidad
Solución stock de vitaminas	
Biotina (B6)	0.1 g disolver en 100 mL de agua destilada
Cianocobalamina (B12)	0.1 g disolver en 100 mL de agua destilada
Pesar y hacer soluciones separadas de cada una. Conservarse en refrigeración.	
Tiamina (B1)	0.2 g

Para preparar la solución de trabajo de vitaminas, se disuelve la tiamina y se adiciona 1 mL de la solución stock de B6 y 1 mL de B12 y aforar a 1 Litro de agua destilada.

Usar 0.5 mL por litro de agua marina para cultivo.

NOTA: Para la preparación de vitaminas, este laboratorio utiliza vitaminas provenientes de una solución comercial inyectable de complejo B. El procedimiento para elaborar la solución con base a las concentraciones requeridas para el medio de cultivo f/2 es el siguiente:

Disolver dos ampolletas de BEDOYECTA^{MR} + 80 mg de B12 + 19.8 g de B1.

Aforar a 1 L de agua destilada y se hace la solución primaria. De esta solución primaria se tomaran 10 mL en 1 L de agua destilada para hacer la solución de trabajo, de la cual se tomaran 0.5 mL por litro de agua marina a utilizar para cultivo.

OTRA VIA ES:

Disolver dos ampolletas de DOXEMINAS^{MR} (Genérico Intercambiable) + 900 mg de B12 + 198 g de B1.

Aforar a 1L de agua destilada para preparar la solución primaria. De ésta solución tomar 1 mL en 1L de agua destilada para la solución de trabajo, de la cual se tomaran 0.5 mL por litro de agua marina a utilizar para cultivo.

ANEXO III CRISTALERIA (INVENTARIO)

MATRAZ	CANTIDAD
Aforado 1000 mL	2
Aforado 500 mL	8
Aforado 100 mL	1
Bola de fondo plano 1000 mL	11
Bola de fondo plano 250 mL	12
Erlenmeyer 1000 mL	23
Erlenmeyer 125 mL	56
Erlenmeyer 225 mL	36
Erlenmeyer 4 L	6
Erlenmeyer 500 mL	1
Erlenmeyer Kitasato 1000 mL	14
Fembach 2800 mL	41
PROBETAS	
2000 mL de plástico	1
1000 mL de plástico	6
500 mL de plástico	1
500 mL	1
100 mL	4
De plástico 100 mL	2
50 mL	9
25 mL	4
10 ml	2
VASOS DE PRECIPITADO	
1000 mL	2
De plástico 1000 mL	1
De plástico 600 mL	1
500 mL	1
250 mL	11
100 mL	3
De plástico 100 mL	1
OTROS	
Embudo de vidrio	1
Embudo de plástico	2

ANEXO IV PROTOCOLO DE USO DEL SISTEMA DE FILTRACION E IRRADIACION DE AGUA MARINA.

I.- Colocar los filtros de cartucho en orden descendiente 15 - 10 - 5 - 1 μm con referencia en la entrada del agua al aparato.

II.- Conectar las mangueras de entrada y salida de agua.

III.- Abrir la llave de desfogue ubicada dentro del área fría, colocando la manguera de desagüe. Ir al cuarto de bombas.

III.- Conectar y encender las lámparas de luz Ultravioleta. Revisar que éstas estén encendidas (**Importante:** *se recuerda que para que este procedimiento se lleve a cabo es necesario haber encendido la bomba para la filtración por arena siguiendo el protocolo correspondiente*).

IV.- **Anotar** hora de inicio en la bitácora. Al término de su uso, **apagar** las lámparas y **anotarse** en la bitácora.

V.- Desconectar el aparato e ir a apagar la bomba (*cuarto de bombas*). Desarmar el aparato, quitando primero los filtros de cartucho, en orden de 15 a 1 μm , después desconectar la manguera de entrada de agua de mar, luego, quitar la manguera de salida y dejar que salga el aparato, inclinando un poco el sistema para que quede completamente vacío. Enjuagar la manguera y los filtros de cartucho, una vez enjuagada la manguera, esta se debe poner a secar en la toma de aire del área húmeda.

PROTOCOLO DE USO DEL SISTEMA DE BOMBEO Y FILTRACION POR ARENA DE AGUA MARINA.

I.- Verificar que hay agua en el depósito o cisterna.

II.- Verificar que el filtro por arena tenga conectadas y aseguradas las mangueras de salida y entrada de agua.

III.- Verificar que la bomba esté conectada al filtro por arena y enchufada. (primer bomba y filtro ubicados entrando al cuarto de bombas).

IV.- Iniciar antes que nada el **RETROLAVADO**: mover la llave a favor de las manecillas del reloj hacia donde dice "backwash" (verificar que la manguera de desfogue este conectada hacia el desagüe). Encender el interruptor de la bomba y esperar 2 minutos.

V.- **Apagar** la bomba. Iniciar el **FILTRADO**: primeramente moviendo la llave hacia donde dice "filter" y encender el interruptor de la bomba (etiquetado: "microalgas").

VI.- Al término de su uso, apagar el interruptor de la bomba, acto seguido mover la llave hacia donde dice "Closed". Desconectar la manguera de salida del filtro y quitar el tapón del filtro para vaciarlo.