



**FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y  
ACUICULTURA**

**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROALGAS**

**Línea de investigación:  
Competitividad industrial, diversificación productiva y prospectiva**

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título Profesional de  
Ingeniero Pesquero Acuicultor

**Autor**

Rivera Reyes, Colin

**Asesor**

Figueroa Vargas Machuca, Manuel Eduardo

ORCID: 0000-0003-1099-446X

**Jurado**

Zambrano Cabanillas, Abel Walter

Mogollón Ávila, Santos Valentín

Blas Ramos, Walter Eduardo

**Lima - Perú**

**2025**



# AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROALGAS

## INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>18%</b>	<b>17%</b>	<b>2%</b>	<b>5%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>docplayer.es</b> Fuente de Internet	<b>6%</b>
<b>2</b>	<b>repositorio.unfv.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>3%</b>
<b>3</b>	<b>repositorio.imarpe.gob.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>www.coursehero.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>www.unfv.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>www.dspace.uce.edu.ec</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>1library.co</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>9</b>	<b>doi.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>10</b>	<b>scholarcommons.usf.edu</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>11</b>	<b>riaa.uaem.mx</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>12</b>	<b>www.researchgate.net</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>13</b>	<b>Submitted to Universidad del Atlántico</b> Trabajo del estudiante	<b>&lt;1%</b>



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y  
ACUICULTURA

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROALGAS

Línea de Investigación:

Competitividad Industrial, diversificación productiva y prospectiva

Suficiencia Profesional para optar al Título Profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

Autor

Rivera Reyes, Colin

Asesor

Figuroa Vargas Machuca, Manuel Eduardo

ORCID: 0000-0003-1099-446X

Jurado

Zambrano Cabanillas, Abel Walter

Mogollón Ávila, Santos Valentín

Blas Ramos, Walter Eduardo

Lima – Perú

2025

*“No se llega a viejo por haber vivido cierto número de años.*

*Uno llega a viejo porque ha abandonado su ideal.*

*Los años arrugan la piel,  
renunciar al ideal arruga el alma”.*

***Douglas McArthur.***

### **Dedicatoria**

A Dios, por darme la fortaleza y la sabiduría necesarias para seguir adelante.

A mis padres, Segundo (Jool) y Aurea (China), porque sin su amor incondicional y sacrificio, este camino no habría sido posible. Gracias por ser mi refugio en los momentos difíciles, por cada palabra de aliento y por enseñarme que con esfuerzo y determinación se puede lograr cualquier sueño. A mi hermana Mónica Marlene (Monna), porque es un orgullo llamarte hermana. Gracias por estar siempre a mi lado, por tus consejos sinceros y por brindarme tu apoyo sin condiciones. Tu confianza en mí ha sido un pilar fundamental en este camino.

A mis hijos, Dannah Jasmine, Enya Helenna y Bruno Yeagob, quienes son mi mayor inspiración y el motor de mi vida. Que este logro sea un ejemplo para ustedes, para que siempre crean en su capacidad de alcanzar sus sueños con esfuerzo y dedicación.

### **Agradecimientos**

A mis compañeros Jesús Espinoza, Sonia Parreño, Samuel Esteban, Julio Barriga, J. Manuel Lloclla y Fanny Juyo, gracias por su apoyo inquebrantable, por compartir conmigo este desafío y por demostrarme que el esfuerzo compartido es más llevadero.

A los docentes Mtro. Manuel Figueroa e Ing. Miriam Muñoz, por su compromiso con la enseñanza, su paciencia y su guía durante mi formación profesional en Acuicultura.

A los Dres. Ana Linares y Martín Caballero, por su amistad sincera y sus consejos invaluable. Su apoyo ha sido fundamental en este proceso y sin ustedes, este trabajo no habría sido posible.

A las nuevas amistades que me demostraron que la familia también se encuentra más allá del hogar: Raphael Farromeque, Fabián Pareja, Gianmarco Azabache, Anyelly (Fio) Rodríguez y Alfredo Cornejo.

A Daniela Gabriela Bustamante Portuguez, por enseñarme una de las lecciones más valiosas de la vida: amarse a uno mismo. Gracias por tu luz y por mostrarme que el crecimiento personal es el primer paso hacia cualquier meta.

## ÍNDICE

Resumen.....	X
Abstrac.....	XI
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Trayectoria del autor .....	13
1.2. Descripción de la Institución .....	15
1.3. Organigrama de la Institución .....	15
1.4. Áreas y funciones desempeñadas .....	16
<b>II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA .....</b>	<b>17</b>
2.1. Limpieza y desinfección de las manos.....	17
2.2. Limpieza y desinfección de la mesa de trabajo .....	17
2.3. Limpieza y desinfección de materiales .....	17
2.4. Secado de materiales.....	19
2.5. Destilación del agua.....	19
2.6. Esterilización de materiales .....	20
2.6.1. <i>Por calor seco: Estufa</i> .....	20
2.6.2. <i>Por calor húmedo: Autoclave</i> .....	21
2.7. Preparación de medios de cultivo .....	22
2.7.1. <i>Medio de cultivo para microalgas marina</i> .....	24
2.7.2. <i>Medio de cultivo para microalgas dulceacuícolas</i> .....	26
2.8. Aislamiento de microalgas.....	30
2.8.1. <i>Métodos de aislamiento</i> .....	32
2.9. Siembra y cultivo de microalgas.....	38

2.10.	Recuento celular .....	40
2.10.1.	<i>Cámaras de recuento</i> .....	41
2.10.2.	<i>Cálculos de recuento celular</i> .....	44
2.10.3.	<i>Protocolo para el recuento celular con cámara de 0,1 mm (Neubauer)</i> .....	48
2.10.4.	<i>Densidad óptica</i> .....	52
2.10.5.	<i>Curva de crecimiento</i> .....	54
2.10.6.	<i>Ecuaciones que definen el crecimiento (Guillard, 1973)</i> .....	54
2.10.7.	<i>Fases de crecimiento</i> .....	55
2.11.	Mantenimiento de un cepario .....	58
2.11.1.	<i>Condiciones de cultivo – parámetros físico-químico</i> .....	61
2.12.	Cosecha .....	66
2.12.1.	<i>Centrifugación</i> .....	67
2.12.2.	<i>Sedimentación</i> .....	67
2.12.3.	<i>Filtración</i> .....	67
2.12.4.	<i>Flotación</i> .....	68
2.12.5.	<i>Floculación</i> .....	68
2.12.6.	<i>Ultrasónica</i> .....	68
2.13.	Procesado de la biomasa .....	69
2.13.1.	<i>Deshidratación</i> .....	69
2.13.2.	<i>Homogenización y ruptura celular</i> .....	70
2.13.3.	<i>Extracción de metabolitos</i> .....	70
<b>III.</b>	<b>APORTES MÁS DESTACABLES A LA INSTITUCIÓN .....</b>	<b>73</b>

3.1.	Desarrollo de los protocolos .....	73
3.2.	Guía en los proyectos de investigación.....	73
3.3.	Optimización en las condiciones de cultivos.....	73
3.4.	Desarrollo de las técnicas en el laboratorio .....	74
3.5.	Proponer proyectos de biotecnología.....	74
3.6.	Asesoría en el análisis.....	74
3.7.	Presentación de resultados científicos .....	74
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>V.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>VII</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>

**Índice de Tablas**

Tabla 1 <i>Medio F/2 o Medio de cultivo Guillard</i> .....	25
Tabla 2 <i>Medio F/2 - Solución de Metales Trazas</i> .....	25
Tabla 3 <i>Medio F/2 - Solución de Vitaminas</i> .....	26
Tabla 4 <i>Medio Chu</i> .....	26
Tabla 5 <i>Medio Chu – Micronutrientes</i> .....	27
Tabla 6 <i>Medio de cultivo Zarrouk</i> .....	29
Tabla 7 <i>Cámaras más comunes para el recuento celular</i> .....	43

## Índice de Figuras

Figura 1 <i>Sistema de cultivo abierto</i> .....	2
Figura 2 <i>Sistema abierto intensivo</i> .....	3
Figura 3 <i>Cultivo inicial en matraces</i> .....	5
Figura 4 <i>Cultivo intermedio en recipientes de 1000 o 2000 mL</i> .....	6
Figura 5 <i>Cultivo en botellones</i> .....	7
Figura 6 <i>Cultivo en tanques</i> .....	9
Figura 7 <i>Modelos de cultivo de producción masiva</i> .....	10
Figura 8 <i>Fotobiorreactor tubular</i> .....	11
Figura 9 <i>Fotobiorreactor plano</i> .....	12
Figura 10 <i>Organigrama estructural de la Facultad</i> .....	15
Figura 11 <i>Red de fitoplancton y botella para colecta de plancton</i> .....	31
Figura 12 <i>Material empleado para el aislamiento de células fitoplanctónicas</i> .....	33
Figura 13 <i>Aislamiento con pipeta</i> .....	34
Figura 14 <i>Aislamiento por dilución seriada</i> .....	36
Figura 15 <i>Cultivo de una cepa de microalga en medio sólido</i> .....	37
Figura 16 <i>Cámara de Neubauer o Hematocitómetro</i> .....	42
Figura 17 <i>Reglilla de Neubauer de 9 mm<sup>2</sup></i> .....	43
Figura 18 <i>Cámara Sedwick-Rafter</i> .....	46
Figura 19 <i>Procedimiento de cuantificación de fitoplancton con cámara de Sedwick-Rafter</i> .....	47
Figura 20 <i>Recuento celular</i> .....	50
Figura 21 <i>Cámara Neubauer</i> .....	51
Figura 22 <i>Cámara Neubauer. Dimensiones</i> .....	51

Figura 23 <i>Curva de crecimiento típica</i> .....	57
Figura 24 <i>Cepas de microalgas en medio sólido y líquido</i> .....	59
Figura 25 <i>Cepario de microalgas</i> .....	60
Figura 26 <i>Parámetros de cultivo de microalgas</i> .....	62
Figura 27 <i>Iluminación de microalgas en un Cepario</i> .....	63
Figura 28 <i>Aireación de microalgas</i> .....	65
Figura 29 <i>Centrifugación</i> .....	72

## **Resumen**

El presente trabajo detalla y explica los procedimientos que se realizaron en el Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología para los cultivos de microalgas tanto dulceacuícola como marino, siguiendo los protocolos de limpieza y desinfección tanto del personal docente, técnico y alumnos, como el de los materiales con que se va a trabajar para evitar una posible contaminación. Se describe el tratamiento a las microalgas, desde la técnica de aislamiento, su cultivo, el control de parámetros, curva de crecimiento y su posterior cosecha.

*Palabras clave:* inóculo, cultivo axénico, microalgas, desinfección.

### **Abstract**

This work details and explains the procedures that were carried out in the Minor Crops and Phycology Laboratory for both freshwater and marine microalgae cultures, following the cleaning and disinfection protocols for both teaching, technical and student staff, as well as materials. with which to work to avoid possible contamination. The treatment of microalgae is described, from the isolation technique, its cultivation, the control of parameters, the growth curve and its subsequent harvest.

*Keywords:* inoculum, axenic culture, microalgae, disinfection.

## I. INTRODUCCIÓN

Según Delgado (2020), las algas integran un grupo diverso de organismos que se encuentran en cualquier tipo de hábitat del planeta. Se han detallado ampliamente en ecosistemas acuáticos, tanto marinos como dulce-acuícolas, también pueden ocupar desiertos, volcanes e incluso ambientes ácidos o congelados. Las algas se dividen en dos grupos según su complejidad: macroalgas (multicelulares y macroscópicas) y microalgas (microscópicas). Estas últimas se distinguen por su flexibilidad ecológica y su capacidad de sintetizar compuestos bioactivos de gran interés en la industria biotecnológica.

Por otro lado, Delgado (2020) señala que el término “microalga” abarca tanto organismos eucariotas como procariotas capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (cianobacterias). Estas no representan un grupo taxonómico formal, sino que establece un conjunto de divisiones o filos. Explica que las formas de categorizar las microalgas han cambiado significativamente con el tiempo, y no existe un consenso global entre los taxonomistas. Propone un modelo reciente que agrupa a estos organismos en dos dominios principales: Prokaryota y Eukaryota.

De los cuales tenemos las clases: Trebouxiophyceae, Mediophyceae, Chlorodendrophyceae, Coccolithophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae (M. Guiry y G. Guiry, 2023).

Según Urbano (2019), los sistemas de cultivo de microalgas se clasifican en dos tipos principales: sistemas abiertos y sistemas cerrados.

### **Sistemas de cultivos abiertos**

De acuerdo con Urbano (2019), los sistemas abiertos no cuentan con protección frente a los factores ambientales, lo que los hace susceptibles a la contaminación por agentes externos como la lluvia, el polvo, aves, insectos y otros elementos. Mantener cultivos monoalgales en este

tipo de sistemas puede resultar complicado debido a la presencia de predadores. Por ello, su uso a grandes escalas se ha restringido a especies específicas, que mejoran en condiciones extremas, como altos niveles de pH (*Arthrospira*), alta salinidad (*Dunaliella*) o un rápido crecimiento (*Chlorella*). Este tipo de sistema pueden ser: extensivo, intensivo y de capa fina.

### **Figura 1**

*Sistema de cultivo abierto*



*Nota.* Tomado de *Sistema de cultivo abierto*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

**Sistema abierto extensivo.** Según Urbano (2019), este sistema se caracteriza por su uso de grandes áreas, que varía entre 5 y 50 hectáreas, sin la necesidad de agitación mecánica. Su diseño permite que las turbulencias generadas por los vientos contribuyan al movimiento y a la homogenización de la masa líquida.

**Sistema abierto intensivo.** De acuerdo con Urbano (2019), son estanques horizontales de tipo carrusel, también conocidos como "raceway". Cada tipo de estanques abarca un área que

puede oscilar entre varios cientos y unos pocos miles de metros cuadrados. Estos estanques consisten en dos o más canales de 2 a 10 metros de ancho y con una profundidad de 15 a 30 centímetros, separados por tabiques verticales. En estos canales, la suspensión celular fluye a una velocidad que varía entre 0,2 y 0,5 metros por segundo, impulsada por mecanismos como paletas giratorias, hélices o bombas.

## Figura 2

### *Sistema abierto intensivo*



*Nota.* Tomado de *Sistema abierto intensivo*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

**Sistema de cultivo en capa fina.** Según Urbano (2019), estos cultivos utilizan tanques inclinados en los que el medio de cultivo se mueve dentro de una capa delgada de aproximadamente un centímetro de grosor. Este método es altamente eficiente en términos de productividad, aunque los elevados costos asociados al bombeo representan un desafío económico significativo.

## **Sistemas de cultivos cerrados**

De acuerdo con Urbano (2019), estos sistemas están diseñados para proteger los cultivos de factores ambientales externos, lo que permite evitar la contaminación y optimizar las condiciones internas, como la temperatura. Entre los más utilizados para los cultivos de microalgas se encuentran los fotobiorreactores (FBR), que pueden clasificarse en tubulares (horizontal o vertical), planos y/o bolsas.

**Reactor tubular horizontal y vertical.** Según Urbano (2019), consisten en tubos transparentes fabricados con vidrio o materiales plásticos, y se presentan en serie o en paralelo.

**Reactor plano.** Para Urbano (2019), estos cultivos se distribuyen en una lámina orientada de manera que la luz solar o artificial incida directamente sobre su superficie.

De acuerdo con Urbano (2019), los fotobiorreactores ofrecen varias ventajas frente a los sistemas abiertos, entre ellas:

- Una mayor eficiencia en el uso de la luz, lo que permite obtener cultivos más concentrados.
- La posibilidad de mantener el cultivo durante todo el año.
- Reducción de las pérdidas de agua por evaporación.
- Mejor control de parámetros ambientales, como por ejemplo la temperatura.
- Mayor facilidad para operar en modo continuo.

## **Mantención de cepas**

Según Vargas (1997), en esta etapa las cepas de microalgas, conocidas como stock, se mantienen en recipientes de 250 mL con medio de cultivo o en placas de agar. Este proceso requiere un cuidado extremo para prevenir cualquier tipo de contaminación. La iluminación proviene de tubos fluorescentes de 20 watts, con intensidades entre 500 y 1000 lux, y la temperatura se mantiene constante a 15 °C en un incubador.

### **Cultivos iniciales**

Para Urbano (2019), se utilizan Erlenmeyers con capacidad de 300 mL, que contienen entre 100 y 200 mL de medio de cultivo. Se inocula el cultivo inicial con una alícuota de 1 a 5 mL del cultivo stock bajo condiciones estériles, preferentemente cerca de un mechero y bajo una campana de luz UV. La intensidad luminosa recomendada es de 1500 lux, mientras que la agitación, puede realizarse manualmente o mediante un agitador eléctrico (shaker).

### **Figura 3**

*Cultivo inicial en matraces*



*Nota.* Tomado de *Cultivo inicial en matraces*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

### **Cultivo de producción intermedia**

De acuerdo con Urbano (2019), en esta etapa se trasladan los cultivos iniciales que tienen entre 4 – 7 días, a recipientes mayores con un medio fresco.

Para Vargas (1997), el procedimiento de inoculación es similar al realizado previamente, teniendo sumo cuidado en que las células sedimentadas en el fondo del recipiente inicial no sean transferidas al nuevo contenedor, la cantidad transferida representa aproximadamente entre el 80 % y el 90 % del volumen total del nuevo recipiente.

Según Urbano (2019), el nuevo recipiente, debe tener una capacidad entre 1000 y 2000 mL. Este cultivo es agitado mediante la introducción de aire filtrado, con un filtro de  $0,45\ \mu\text{m}$ . La temperatura se mantiene en las mismas condiciones establecidas en las etapas previas, mientras que la intensidad de luz se ajusta entre 2000 y 2500 lux para favorecer el crecimiento celular.

#### **Figura 4**

*Cultivo intermedio en recipientes de 1000 o 2000 mL*



*Nota.* Tomado de *Cultivo intermedio en recipientes de 1000 o 2000 mL*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

## Cultivo de producción masiva

De acuerdo con Urbano (2019), estos cultivos pueden ser de 10, 20, 500, 1000 Litros, pero pueden clasificarse en cultivos de 10 – 20 Litros y cultivos en tanques.

**Cultivo de 10-20 Litros.** De acuerdo con Urbano (2019), son cultivos que se desarrollan en botellones llamados “carboys” los cuales pueden ser de pirex o de plástico. en esta etapa se utilizan los cultivos intermedios como inóculo. El medio nutritivo consiste principalmente en agua de mar que ha sido enriquecida, previamente filtrada y esterilizada mediante luz ultravioleta.

### Figura 5

*Cultivo en botellones*



*Nota.* Tomado de *Cultivo en botellones*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

Según Vargas (1997), es fundamental permitir que el medio repose entre 30 minutos y 1 hora antes de la inoculación, ya que la exposición a la luz UV puede generar peróxidos que afectan negativamente los pigmentos fotosintéticos. El proceso de inoculación debe realizarse con extremo cuidado para prevenir contaminaciones y evitar que se transfieran las células sedimentadas de los cultivos intermedios.

Además, para Urbano (2019), la intensidad de la luz en esta etapa varía entre 2500 y 5000 lux, mientras que la temperatura se mantiene constante en 20 °C, con un margen de  $\pm 2$  °C para asegurar condiciones óptimas de crecimiento.

**Cultivos en tanques.** De acuerdo con Urbano (2019), una vez que los cultivos de 10 a 20 Litros alcanzan su fase exponencial, se emplean como inóculos para la etapa final en tanques de mayor capacidad. Estos tanques pueden tener formas cilíndricas, cónicas o rectangulares y estar fabricados con materiales como polímeros plásticos, madera recubierta con fibra de vidrio o policarbonato. Aunque los tanques de policarbonato, tanto cilíndricos como rectangulares, son efectivos, suelen ser más costosos. Además, las bolsas plásticas pueden utilizarse para cultivos masivos, aunque requieren estar suspendidas, lo que aumenta el riesgo de derrames debido al goteo continuo. La iluminación en esta fase se mantiene constante mediante el uso de tubos fluorescentes suspendidos directamente sobre los tanques, con una intensidad luminosa que oscila entre 4000 y 5000 lux. Por otro lado, el sistema de aireación es crucial para garantizar una adecuada circulación, facilitando tanto la distribución uniforme de los nutrientes como el movimiento de las microalgas dentro del medio de cultivo.

## Figura 6

### *Cultivo en tanques*



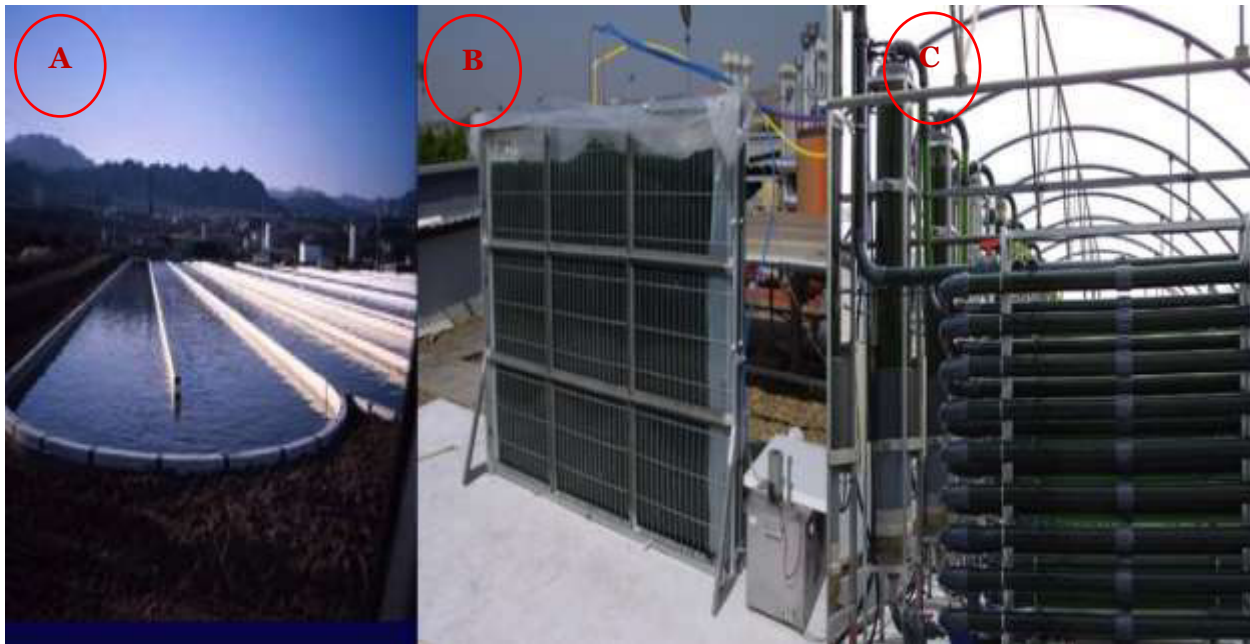
*Nota.* Tomado de *Cultivo en tanques*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

**Cultivo de producción fotobiorreactores.** Según Fernández (2014), los fotobiorreactores son sistemas diseñados para la producción masiva de microalgas, con capacidades que varían desde cientos de litros hasta varios metros cúbicos. Estos dispositivos permiten generar grandes cantidades de biomasa microalgal, alcanzando niveles de producción que van desde kilogramos diarios hasta toneladas anuales, suelen estar adaptados para cultivar una microalga específica y, en algunos casos, diseñados para aplicaciones concretas, como la producción de astaxantina. Sin

embargo, esto no excluye la posibilidad de utilizarlos con diferentes especies. A diferencia de los cultivos en laboratorio, cuyo objetivo principal es estudiar el crecimiento, estos dispositivos utilizan los datos obtenidos en experimentos previos para optimizar su diseño y operación. En su mayoría, estos dispositivos destinados a la producción masiva, aprovechan la luz solar como fuente de iluminación, lo que los hace eficientes para este propósito.

### Figura 7

#### *Modelos de cultivo de producción masiva*



*Nota.* Cultivo abierto (A). Cultivo cerrado plano (B). Cultivo cerrado columna y tubular respectivamente (C). Tomado de *Modelos de cultivo de producción masiva*, por Fernández, 2014, Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas.

**Figura 8***Fotobiorreactor tubular*

*Nota:* El uso de tuberías traslucidas ha demostrado ser altamente eficiente en proporcionar la luz y movilidad que las microalgas necesitan en el sistema. Tomado de *Fotobiorreactor tubular*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

**Figura 9**

*Fotobiorreactor plano*



*Nota.* Los reactores planos exponen una mayor cantidad de microalgas a la luz por medio de su superficie. *Nota.* Tomado de *Fotobiorreactor plano*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

### 1.1. Trayectoria del autor

Realicé mis estudios en la carrera de Ingeniería en Acuicultura en la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura en la Universidad Nacional Federico Villarreal (1992 – 1998).

He trabajado en la empresa SAIS Túpac Amaru, distrito Pachacayo, provincia Huancayo, región Junín, en el desarrollo de las inspecciones de la piscigranja (2000).

En la Estación Marina Isla Pachacamac, distrito Lurín, provincia Lima de la Universidad Nacional Federico Villarreal, realizando el control de parámetros físicos de los ambientes acuáticos. Realizando el control de parámetros meteorológicos con SENAMHI. Realizando muestreos mensuales de las microalgas de la flora marina del litoral de la Isla Pachacamac (2001 – 2007).

En la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura en el Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología a cargo de mantener y preservar las cepas de las microalgas marinas como *Nannochloris* sp, *Chaetoceros* spp, *Tetraselmis* sp, *Isochrysis* sp, microalgas dulceacuícolas como *Chlorella* sp, *Desmodesmus* sp, *Scenedesmus* sp, *Arthrospira* sp y el zooplancton como *Daphnia* sp, *Alona* sp, *Brachionus* sp, *Hapocyclops* sp, *Panagrellus* sp. Dar mantenimiento a los equipos del laboratorio como los microscopios, estufa, autoclave, incubadora, destilador (2007 – 2019).

En la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura como jefe de la Oficina de Administración a cargo de: el cuadro de necesidades, del personal administrativo sobre sus derechos, deberes, prohibiciones y sanciones disciplinarias, del plan operativo de la Facultad, del presupuesto de la Facultad, del equipamiento y mantenimiento de equipos y muebles (2019 – 2022).

Me capacite en:

- Curso de Primeros auxilios nivel básico (2022).
- Curso de Materiales peligrosos y control de derrames (2022).
- Curso de Prevención y lucha contra incendios (2022).
- Curso/Programa Transforma tu curso al contexto digital (2020).
- Curso Introducción a la Ecoeficiencia en Instituciones Públicas (2020).
- Seminario Taller de Competencias Digitales con Microsoft Teams (2020).
- Seminario Taller de Competencias Digitales con Google Classroom (2020).
- Curso Gestión por procesos para la administración pública (2019).
- Uso y manejo de equipos de laboratorio (2019).
- Curso de Contrataciones del Estado (2014).
- Curso de Gestión por procesos en la administración pública (2014).
- Curso en emergencia y shock trauma, atención del paciente adulto y pediátrico, RCP básico y avanzado (2011).
- Curso El liderazgo como herramienta para la administración de negocios (2010).
- Medidas de prevención ante un sismo en el centro de trabajo (2010).
- Curso Gestión de proyectos de cooperación al desarrollo en la universidad (2009).
- Curso El procedimiento administrativo y el control gubernamental (2008).
- Curso Comercio exterior y aduanas (2008).
- Curso Refrigeración (2006).
- Curso Formación para mariner de pesca calificado (2006).
- Curso Mantenimiento de motores marinos (2006).
- Curso Armado y operatividad de espineles (2006).

- Curso Implementación del sistema de calidad HACCP en planta de alimentos (2004).
- Curso Estudios de impacto ambiental (1999).
- Curso Cultivo intensivo de truchas (1996).

## 1.2. Descripción de la Institución

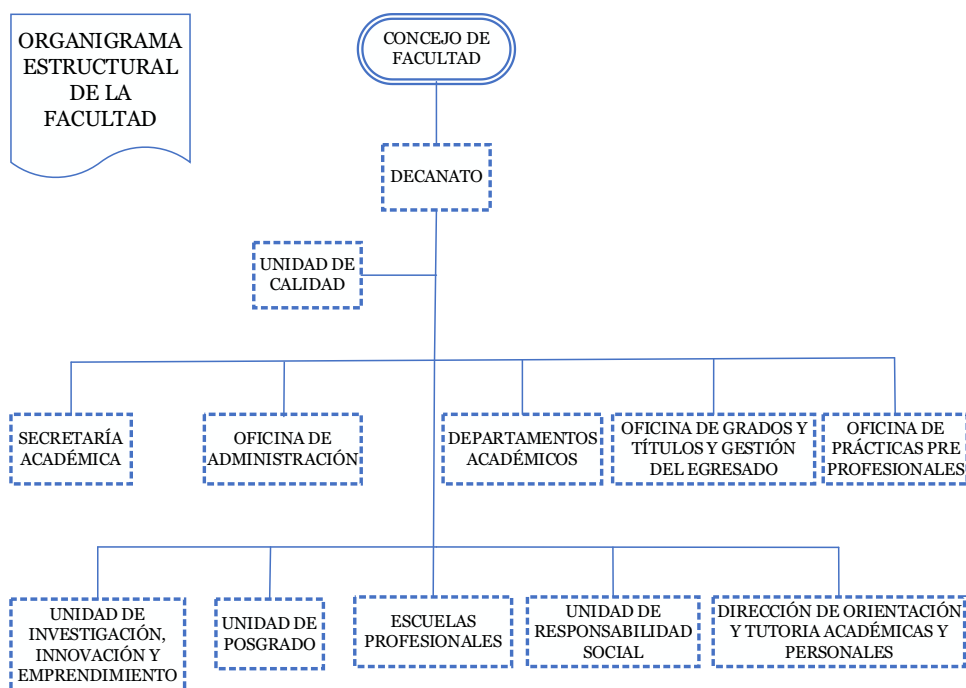
El Laboratorio de Cultivos Menores fue creado el 18 de junio de 1991. Posteriormente el nombre fue cambiado en el año 2019 a Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología.

El Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología tiene el fin de enseñar al alumno la preparación de medios de cultivo, la identificación, aislamiento, cultivo y producción de microalgas marinas, dulceacuícolas y zooplancton.

## 1.3. Organigrama de la Institución

**Figura 10**

*Organigrama estructural de la Facultad*



#### **1.4. Áreas y funciones desempeñadas**

En el área de Calidad de la empresa SAIS Tupac Amaru-Pachacayo-Huancayo como inspector de la piscigranja de la empresa.

En el área de Acuicultura en la Estación Marina Isla Pachacamac realizando los parámetros físicos de los ambientes acuáticos.

En el Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura realizando las funciones de preparación de medios de cultivo, la preservación de las cepas de microalgas y zooplancton, del mantenimiento de los equipos del laboratorio.

En la Oficina de Administración de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura realizando las funciones administrativas de gestionar: el cuadro de necesidades de la Facultad. Ejercer el control de los servicios de mantenimiento de los ambientes, equipamiento y mejora. Suministrar los materiales, equipos, muebles y enseres de las oficinas. Elaborar el Plan Operativo, presupuesto y memoria anual de la Facultad.

## **II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA**

Para el presente trabajo detallaremos los procesos y actividades de la preparación de los materiales hasta el cultivo monoalgal (unialgal o monoespecífico) de las microalgas.

### **2.1. Limpieza y desinfección de las manos**

Antes de empezar a trabajar en nuestros materiales, nos desinfectamos previamente, primero nos enjuagamos las manos con abundante agua, luego se usó el jabón frotando toda la mano y entre los dedos, se vuelve a enjuagar con abundante agua y nos secamos con papel toalla. Todo esto es para prevenir si llevamos algún contaminante o algún microorganismo que pueda ser consecuente para contaminar nuestros medios de cultivo o en si el mismo cultivo.

### **2.2. Limpieza y desinfección de la mesa de trabajo**

Procedimos a desinfectar la mesa de trabajo. Primero se agregó agua y detergente a la mesa de trabajo y con una esponja se lavó por todos los rincones, una vez terminado se enjuago con abundante agua una 10 veces. Segundo, se agregó lejía y se esparció por toda la mesa y se procedió a enjuagar la mesa con abundante agua para sacar todo el residuo químico como unas 10 veces. Se secó la mesa con papel toalla. Se agregó a la mesa alcohol al 96% y se esparció con algodón higroscópico y se dejó secar al ambiente. Por último, volvimos a realizar la desinfección de nuestras manos.

### **2.3. Limpieza y desinfección de materiales**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008), la limpieza es un procedimiento que permite retirar impurezas, restos de materia orgánica y manchas de las superficies mediante diversas técnicas, como el cepillado, la aspiración, la limpieza en seco o el lavado con agua y detergente. los residuos de suciedad y materia orgánica pueden convertirse en un foco de

microorganismos y disminuir la efectividad de los agentes descontaminantes, como los antisépticos, desinfectantes y germicidas químicos.

De acuerdo con la OMS (2008), una limpieza adecuada y previa es clave para que los procesos de desinfección y esterilización sean eficientes, dado que muchos productos germicidas solo funcionan correctamente sobre materiales libres de residuos. Además, este paso debe realizarse con cuidado para prevenir la exposición a posibles agentes infecciosos.

Para la OMS (2008), indica que, para los desinfectantes y antisépticos, existen numerosos productos químicos con diferentes propiedades, por lo que es imprescindible seleccionar aquellos que se adapten mejor a las necesidades específicas del entorno en cuestión.

Asimismo, la OMS (2008) advierte que ciertos productos germicidas pueden ser nocivos tanto para la salud humana como para el medio ambiente, lo que exige una manipulación cuidadosa siguiendo las instrucciones del fabricante. También se recomienda el uso de guantes, delantal y protección ocular durante la preparación de diluciones de productos químicos, como medida de seguridad personal.

El proceso de lavado de los materiales de vidrio consistió en, el uso de detergente y lejía. Con detergente y agua se lavó el material de vidrio con la ayuda de una escobilla para retirar los residuos anteriores de un cultivo o por el tiempo en desuso, después se enjuagó con abundante agua como unas 10 lavadas, hasta no sentir el olor del detergente. El segundo lavado se realizó con lejía, con una solución al 1% llenando el material de vidrio al ras, para que no quede ningún espacio libre para su contaminación, dejándolo reposar por unos 3 minutos, con esto se previno cualquier impureza que se haya quedado pegado en el material. Luego se vertió la solución y enjuagándolos con abundante agua por unas 10 veces hasta no sentir el olor a lejía y también así se previno que no quede ningún residuo químico. Por último, se hizo un enjuague final usando agua destilada (con

esto, se evitó el halo de color que se forma en los materiales de vidrio cuando entran en calor para su secado respectivo). Después del enjuague de los materiales, estos se colocaron en la mesa de trabajo para la siguiente etapa.

#### **2.4. Secado de materiales**

Una vez que se terminó el proceso de lavado de los materiales de vidrio, se procedió a llevarlos a la estufa de marca SELECTA modelo CONTERM 201 para su secado respectivo. Se colocó ordenadamente y separados entre sí y de las paredes de la estufa, para evitar que con el calor revienten los vidrios. Los materiales de vidrio se secaron a una temperatura de 100 °C por un lapso de tiempo de 1 hora. Una vez que la temperatura deseada este marcando en la estufa, recién se empieza a tomar el tiempo de secado. Una vez terminado el tiempo de secado y, antes de retirar los materiales de vidrio de la estufa, se esperó que estos se enfríen dentro del equipo, para evitar quemaduras o que los mismos materiales revienten por shock térmico.

#### **2.5. Destilación del agua**

Además de la limpieza, desinfección y esterilización, es muy importante el uso de agua destilada para la preparación de soluciones para los medios de cultivo, entonces, se sabe que el agua destilada es un agua químicamente pura originada por el calor aplicado, para luego enfriar su vapor y convertirla otra vez en líquido, el cual solo contendrá un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno, por lo que es idónea para la preparación de compuestos químicos solubles para los medios de cultivo.

Para la destilación del agua se empleó el destilador de agua de marca BOECO que se encuentra en el laboratorio, el cual tiene un funcionamiento básico y manual (no es automático) del manejo de los fluidos para conseguir el agua destilada. Este procedimiento comienza con el ingreso de agua, el cual sirve para llenar la capacidad de 25 Litros que tiene el equipo y, tiene un

punto de salida donde el agua excedente en este sistema continuo es expulsada a través del rebose en forma de campana. Entonces, una vez el sistema se encuentre en equilibrio, es decir con el tanque lleno y, la entrada y salida de agua en continuo flujo. Se procedió a enchufar el equipo y levantar la llave térmica para su funcionamiento.

Una vez realizado ello, el equipo empezó a calentar hasta llevar el agua a ebullición, demorando aproximadamente unos 10 a 12 minutos, y en consecuencia a este proceso se observaba como el vapor salía por un desfogue en la parte superior del equipo. Parte de este vapor producido entra en contacto con el ingreso de agua fría y se condensa cambiando de estado gaseoso al líquido formando gotas que a través de una manguera se va depositando en un tanque ubicado externamente donde se almacena el agua destilada. Este proceso tiene una eficiencia de 10 Litros por hora, para lo cual el tanque de 40 Litros se llenaba en un promedio de 4 horas.

## **2.6. Esterilización de materiales**

### **2.6.1. *Por calor seco: Estufa***

Concluido el proceso de lavado y secado del material de vidrio y supuestamente limpio a simple vista, es necesario realizar un proceso de esterilización para eliminar cualquier organismo microscópico que haya logrado sobrevivir al proceso anterior. Por tal motivo se preparó el material de vidrio ya seco: primero se colocó en la boca de los matraces y tubos de ensayo (donde va estar el cultivo de las microalgas) un tapón de algodón, al matraz se le cubrió con papel aluminio o papel Kraft desde el tapón hasta la mitad del material de vidrio, con los tubos de ensayo se colocó en grupo de 5 y se envolvió con papel de aluminio. Para los materiales que tienen la función de contenedor como las fiolas y beakers se cubrió con papel de aluminio la boca de estos materiales en forma hermética. Para las pipetas y baguetas donde los materiales son más delgados se juntó en grupo de a 5 y se procedió a envolverlas.

Una vez terminado este proceso, se colocó los materiales dentro de la estufa, realizándose el mismo procedimiento explicado anteriormente a excepción de la temperatura que se graduó a entre 170 a 180 °C para poder eliminar cualquier tipo de microorganismos que no resistirán a la exposición de esta temperatura. El material de vidrio se esterilizo por un lapso de tiempo entre 2 a 3 horas en la estufa. Terminado el tiempo se esperó hasta que se enfrié, para su posterior uso.

### **2.6.2. *Por calor húmedo: Autoclave***

Luego de haber preparado el material y destilado el agua que se requirió para la preparación de las soluciones que se necesitaron para los medios de cultivo, se debía esterilizar el agua de mar en el autoclave.

Este autoclave de marca BOECO es del tipo canasta, el cual tiene forma cilíndrica y, funciona a través de la esterilización por vapor al aumentar la temperatura y la presión. Para usar el autoclave se procedió a destapar dicho equipo y se retiró la canastilla interna (donde se coloca los matraces o vasos de precipitados). Una vez retirado la canastilla, se añadió 12 Litros de agua destilada en el autoclave, luego se colocó la canastilla en su lugar y seguido se introdujo dentro los materiales de vidrio esterilizado que ya contenían en su interior agua de mar filtrada, si el material de vidrio era de 1000 mL se le agregaba 800 mL de agua de mar filtrada, evitando con esto que se derrame y, se selló con papel aluminio cubriendo la boca del material de vidrio.

Luego se procedió a cerrar el autoclave asegurando todos los ganchos de seguridad hasta que el equipo se encuentre completamente hermético, seguido se prendió el equipo. Debido a que el autoclave que se tiene en el laboratorio es rústico, se debió estar pendiente del desarrollo del proceso para evitar accidentes o inconvenientes con el esterilizado.

El autoclave cuenta en la parte superior de la tapa con un pestillo que evidencia la formación de vapor dentro del mismo por acción del aumento de temperatura. Una vez que se

observó salir vapor del autoclave, este nos indica que ya no queda aire dentro del equipo y que está lleno de vapor de agua, entonces, se procede a cerrar el pestillo con la ayuda de una llave metálica por seguridad. Verificando que esté herméticamente cerrado el equipo y con el aumento constante de la temperatura (por acción de la acumulación del vapor), la presión iba subiendo gracias al incremento de la temperatura.

El autoclave cuenta con un medidor de temperatura y presión (manómetro), por donde se observaba la temperatura deseada que era a 121 °C y a 0,1 mPa, donde la ebullición del agua elimina cualquier residuo biológico que se haya alojado en el medio acuático dentro de los frascos colocados en el autoclave. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se mantuvo en este rango por unos 15 - 20 minutos prendiendo y apagando el botón de energía, esto era con la finalidad de que no cambie la temperatura interna y ocurra algún accidente, ya que su manejo es manual y no automático. Cuando el tiempo finalizó, simplemente se dejó el equipo apagado, se desconectó y, se esperó hasta el día siguiente que el equipo este frío, para sacar los recipientes con el agua de mar esterilizada.

## **2.7. Preparación de medios de cultivo**

Según Abalde et al. (1995), uno de los principales retos en la producción industrial de microalgas es definir y elaborar un medio de cultivo que sea químicamente adecuado y económicamente viable. Los medios de cultivo utilizados se clasifican en tres categorías: aquellos totalmente sintéticos, los que emplean agua natural enriquecida con suplementos minerales, y los que utilizan residuos o aguas residuales.

De acuerdo con Abalde et al. (1995), los **medios sintéticos** pueden ser productos comerciales o prepararse en los laboratorios a partir de sus componentes, donde es recomendable

que estas formulaciones sean fáciles de preparar y conservar, lo que garantiza un proceso más eficiente en términos operativos.

Asimismo, para Abalde et al. (1995), el uso de **agua natural enriquecida** con nutrientes químicos potencia significativamente el crecimiento y la tasa de división celular de las microalgas. Para cultivos masivos de especies marinas, se ha empleado agua de mar artificial, pero debido a sus altos costos, se prefiere el agua de mar natural por su mayor accesibilidad y rendimiento. Diversos estudios han identificado los requerimientos nutricionales de muchas especies de microalgas, principalmente en cuanto a minerales y vitaminas. Por ello, se han desarrollado múltiples formulaciones de medios de cultivo. Estas formulaciones suelen tener una composición similar en términos de nutrientes, donde la proporción de nitrógeno y fósforo (N/P) varía de 5/1 a 10/1 en peso seco, mientras que la relación de nitrógeno a silicio (N/Si) oscila entre 0.5/1 y 1/1.

Además, para Abalde et al. (1995) subrayan que la incorporación de fertilizantes al agua de mar resulta más beneficiosa para algunas especies de microalgas que para otras. Por ejemplo, en los ensayos realizados con *Dunaliella*, la especie mostró un crecimiento similar tanto en medios simples enriquecidos como en formulaciones complejas. Sin embargo, los cultivos de *Tetraselmis* no prosperan adecuadamente en agua de mar enriquecida únicamente con fertilizantes, y su desarrollo mejora con la adición de micronutrientes y extracto de suelo.

De acuerdo con Abalde et al. (1995), el uso de efluentes domésticos tratados y **aguas residuales**, como los desechos provenientes de granjas de peces, representa una alternativa económica para aportar nutrientes al cultivo de microalgas. No obstante, advierten sobre el riesgo de acumulación de metales pesados y otros contaminantes en las algas, lo que podría afectar a los organismos que se alimenten de ellas.

### **2.7.1. Medio de cultivo para microalgas marina**

**2.7.1.1. Medio de cultivo Guillard.** Teniendo listo el material estéril y agua destilada estéril, se procedió al pesado de los reactivos químicos y se inició la preparación del medio de cultivo, para lo cual se utilizó la guía de preparación de medio de cultivo del laboratorio, (medio Guillard f/2).

Dentro del laboratorio hay un almacén donde se guarda todos los reactivos químicos que son necesarios para preparar los medios de cultivo, una vez reunido todos los reactivos que indica la guía, se procedió primero a colocar dentro de la balanza analítica los beakers de 50 mL (uno por uno) para luego ser tarado, donde se obtuvo solo el peso del reactivo correspondiente al volumen del medio que se deseó preparar, rotulando cada envase para evitar confusiones durante la combinación de todos los reactivos. A cada beaker que contenía un reactivo se le añadió una pequeña cantidad de agua destilada, y con una bagueta estéril se homogenizaba para disolver el reactivo. Este procedimiento se hizo 3 o 4 veces a cada beaker, de esta manera evitamos que queden residuos de reactivo en dicho recipiente y, verter en su totalidad a una fiola.

Si nuestra fiola es de 250 mL entonces solo podíamos usar un máximo de 200 mL para su uso en la disolución del reactivo. El siguiente paso era completar el volumen de la fiola de 250 mL, para eso se utilizó una pizeta con agua destilada y se procedió a enrazar, colocándose por último la tapa de la fiola, donde se homogenizaba, se rotulaba con el nombre del compuesto que contiene y la fecha de preparación para llevarlo a la refrigeradora y conservarlo a baja temperatura hasta el momento en que lo usemos. El mismo procedimiento se realizó con todos los demás reactivos.

**Tabla 1***Medio F/2 o Medio de cultivo Guillard*

<b>Cantidad a usar (mL)</b>	<b>Composición</b>	<b>Preparación de nutrientes</b>
1,0	NaNO <sub>3</sub>	75,0 g/L
1,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5,0 g/L
1,0	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	30,0 g/L + 5 mL de HCl
1,0	F/2 Solución de Metales trazas	
1,0	F/2 Solución de Vitaminas	
2,0	Tris	250,0 g/L + 147,5 mL de HCl

*Nota.* Para 1 Litro de agua destilada. Tomado de *Medio F/2 o Medio de cultivo Guillard*, por Vásquez y Chávez, 2010, Fondo nacional de desarrollo pesquero (FONDEPES).

**Tabla 2***Medio F/2 - Solución de Metales Trazas*

<b>Cantidad a usar</b>	<b>Composición</b>	<b>Solución stock</b>
3,15 g	Fe Cl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	
4,36 g	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	
1,0 mL	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9,8 g/L
1,0 mL	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6,3 g/L
1,0 mL	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22,0 g/L
1,0 mL	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,0 g/L
1,0 mL	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180,0 g/L

*Nota.* Para un volumen de 950 mililitros de agua destilada. Luego llevar a un volumen final de 1 Litro con agua destilada. Tomado de *Medio F/2 - Solución de Metales Trazas*, por Vásquez y Chávez, 2010, FONDEPES.

**Tabla 3**

*Medio F/2 - Solución de Vitaminas*

Cantidad a usar	Composición	Solución stock
1,0 mL	Cyanocobalamina (B12)	1,0 g/L
10,0 mL	Biotina	0,1 g/L
0,2 g	Thiamina HCl	

*Nota.* Tomado de *Medio F/2 - Solución de Vitaminas*, por Vásquez y Chávez, 2010, FONDEPES.

### 2.7.2. Medio de cultivo para microalgas dulceacuícolas

**2.7.2.1. Medio de cultivo Chu.** De acuerdo con Oscanoa et al. (2018), para preparar el medio de cultivo Chu se requiere añadir de manera aséptica ciertas soluciones stock previamente esterilizadas. Estas soluciones deben incorporarse a 1000 mL de agua destilada, la cual ha sido esterilizada previamente en autoclave. El proceso debe llevarse a cabo bajo condiciones controladas para garantizar la esterilidad del medio y evitar contaminaciones.

**Tabla 4**

*Medio Chu*

mL	Solución stock	g/500 mL	g/L
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	18,35	36,7
1	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18,45	36,9
1	NaHCO <sub>3</sub>	6,3	12,6

1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,35	8,7
1	NaNO <sub>3</sub>	42,5	85
1	Na <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> .9H <sub>2</sub> O	14,2	28,4
1	*Solución de citrato férrico		
1	**Solución de micronutrientes		
1	***Tris		

*Nota.* \*SOLUCIÓN DE CITRATO FÉRRICO: A 1000 mL de agua destilada esterilizada en autoclave agregue 3,35 g de ácido cítrico y disuelva completamente. Agregue 3,35 g de citrato férrico y disuelva al poner en autoclave. Mantenga los envases envueltos en papel aluminio. Tomado de *Medio de cultivo Chu*, por Oscanoa et al., 2018, Instructivo para producción de biomasa microalgal de cepas nativas del género *Desmodesmus* colectadas en zonas altoandinas del Perú

### Tabla 5

#### *Medio Chu – Micronutrientes*

Compuesto	g/L
Na <sub>2</sub> EDTA	0,05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,618
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0196
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,044
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,0126
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0126

*Nota.* \*\*SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES: A 1000 mL de agua destilada y esterilizada en autoclave, agregue. \*\*\*TRIS Por cada 200 mL agua destilada: Agregar 50 g de tris y 32 mL de HCl. Añadir 1 mL de cada una de las soluciones por cada litro de medio de cultivo a preparar. Tomado de *Medio de cultivo Chu*, por Oscanoa et al., 2018, Instructivo para producción de biomasa microalgal de cepas nativas del género *Desmodesmus* colectadas en zonas altoandinas del Perú

**2.7.2.2. Medio de cultivo Zarrouk.** Según Torres y Correa (2008), el medio de cultivo Zarrouk fue la primera formulación sintética diseñada específicamente para el cultivo de *Spirulina* y se estableció como referencia estándar desde su definición en 1966. Estudios previos han evidenciado que algunos de los componentes de este medio pueden ser diluidos, ya que su concentración inicial es bastante alta.

De acuerdo con Torres y Correa (2008), el fósforo es uno de los elementos clave en la composición del medio Zarrouk, ya que favorece altas tasas de producción en los cultivos de microalgas. La *Spirulina* asimila este nutriente principalmente en forma de fosfatos inorgánicos, como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  o  $\text{HPO}_4^{2-}$ , y también puede aprovechar el fósforo contenido en  $\text{P}_2\text{O}_5$  de manera eficiente. Además, el potasio desempeña funciones esenciales al actuar como cofactor de enzimas involucradas en la síntesis de proteínas y la regulación osmótica, siendo imprescindible para el crecimiento celular.

Según Torres y Correa (2008), el sulfuro es un componente fundamental en la estructura de aminoácidos esenciales, vitaminas y sulfolípidos, lo que contribuye al crecimiento de las células algales. Asimismo, el bicarbonato de sodio no solo provee una fuente de carbono, sino que también mantiene el pH alcalino del medio, condición necesaria para el desarrollo de *Spirulina*. En cuanto al nitrógeno, al ser una cianobacteria no diazotrófica, la *Spirulina* requiere nitratos como fuente

principal, siendo el  $\text{NaNO}_3$  el compuesto más utilizado. La concentración de nitrato de sodio no debe ser inferior a 2,5 g/L para garantizar un desarrollo óptimo, ya que este elemento es esencial para la síntesis de aminoácidos y proteínas, así como para la producción de ficocianina, un pigmento clave en la cianobacteria. El cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), aunque en pequeñas cantidades, también es necesario, ya que su deficiencia afecta el crecimiento celular. En tanto, el magnesio cumple una función central al formar parte de la molécula de clorofila, lo que lo convierte en un elemento imprescindible para la fotosíntesis. Además, participa en la agregación de ribosomas en unidades funcionales y contribuye a la formación de enzimas antioxidantes como la catalasa. Finalmente, la reducción de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) tiene un impacto negativo significativo en el cultivo, ya que este compuesto es fundamental para la estabilidad de las membranas celulares y actúa como catalizador en diversas reacciones enzimáticas.

**Tabla 6**

*Medio de cultivo Zarrouk*

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración</b>
$\text{NaHCO}_3$	13,61 g/L
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1,03 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,50 g/L
$\text{NaNO}_3$	2,50 g/L
$\text{KSO}_4$	1,00 g/L
$\text{NaCl}$	0,20 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g/L

---

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22 g/L
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079 g/L
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,049 g/L
VOSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	49,60 mg/L
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	96,00 mg/L
NiSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	47,80 mg/L
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	17,90 mg/L
TiOSO <sub>4</sub>	33,30 mg/L
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	44,00 mg/L

---

*Nota. Tomado de Medio de cultivo Zarrouk (Zarrouk, 1966), por Torres y Correa, 2008, Diseño conceptual de un proceso de cultivo y obtención de Cyanobacteria Arthrospira platensis*

## **2.8. Aislamiento de microalgas**

Según Arredondo y Voltolina (2007), los métodos y herramientas utilizados para recolectar muestras de microalgas destinadas al aislamiento pueden variar dependiendo del tipo de alga, su abundancia en el ambiente y el objetivo del proceso. Sin importar el método elegido, es indispensable que todo el material esté completamente limpio y libre de residuos tóxicos o contaminantes para evitar alteraciones en las muestras.

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), Cuando se desea aislar microalgas poco frecuentes, es preferible emplear redes de plancton con mallas finas, siendo una medida de 20 µm

adecuada para evitar daños celulares durante el proceso. En cambio, para especies abundantes, se pueden usar botellas oceanográficas como las de tipo Niskin o Van Dorn, así como tubos de PVC o mangueras que permiten recolectar muestras integradas en aguas superficiales.

### Figura 11

*Red de fitoplancton y botella para colecta de plancton*



*Nota.* Tomado de *Red de fitoplancton y botella para colecta de plancton*, por Arredondo y Voltolina, 2007, *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*

Asimismo, Arredondo y Voltolina (2007), recomienda que, tras recolectar la muestra, es importante eliminar los organismos de mayor tamaño mediante un filtrado con tamiz de malla apropiada y proceder al aislamiento en un tiempo breve. Si no se puede realizar de inmediato, se debe considerar que la composición de la comunidad algal podría cambiar significativamente. Para evitar deterioros, se aconseja transportar la muestra en una hielera, evitando el contacto directo con el hielo y la exposición a la luz. Debido a la fragilidad de algunas especies, se debe evitar agitar la muestra de forma manual o mediante burbujeo. Cuando se utilizan redes de plancton, es conveniente diluir la muestra con agua filtrada para mantener la concentración adecuada.

Además, para Arredondo y Voltolina (2007), en casos donde se busca seleccionar células con características específicas, como resistencia a temperaturas extremas o crecimiento rápido, recomiendan incubar la muestra bajo condiciones controladas antes de proceder al aislamiento, lo que permite que las especies dominantes se fortalezcan y sean más fáciles de aislar.

### **2.8.1. Métodos de aislamiento**

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), el objetivo del aislamiento de microalgas es obtener cultivos que contengan únicamente una especie a partir de un solo individuo, ya sea una célula, un filamento o un quiste. Estos cultivos pueden ser clonales, si provienen de un solo organismo, o monoespecíficos, si se originan de varios individuos de la misma especie. Los cultivos se denominan axénicos si no contienen bacterias.

Asimismo, para Arredondo y Voltolina (2007), los métodos de aislamiento varían según las características de las microalgas, como su tamaño, morfología y movilidad. Las técnicas más comunes incluyen el uso de micropipetas, placas de agar y diluciones sucesivas. Explican que, con frecuencia, combinar más de una técnica incrementa la probabilidad de éxito. Durante todo el procedimiento, es necesario verificar los resultados bajo el microscopio para asegurar que el aislamiento se realice correctamente.

**2.8.1.1. Aislamiento con pipeta.** Según Arredondo y Voltolina (2007), es un método que se usa para aislar microalgas mayores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, como quistes, células vegetativas, dinoflagelados y formas coloniales o filamentosas. Esta técnica consiste en utilizar una pipeta Pasteur con una punta fina o un capilar, con la que se succionan las células de interés mediante capilaridad. Para esto, se coloca una gota de la muestra sobre un portaobjetos y se observa al microscopio. Las células seleccionadas se transfieren a otro portaobjetos limpio con una gota de

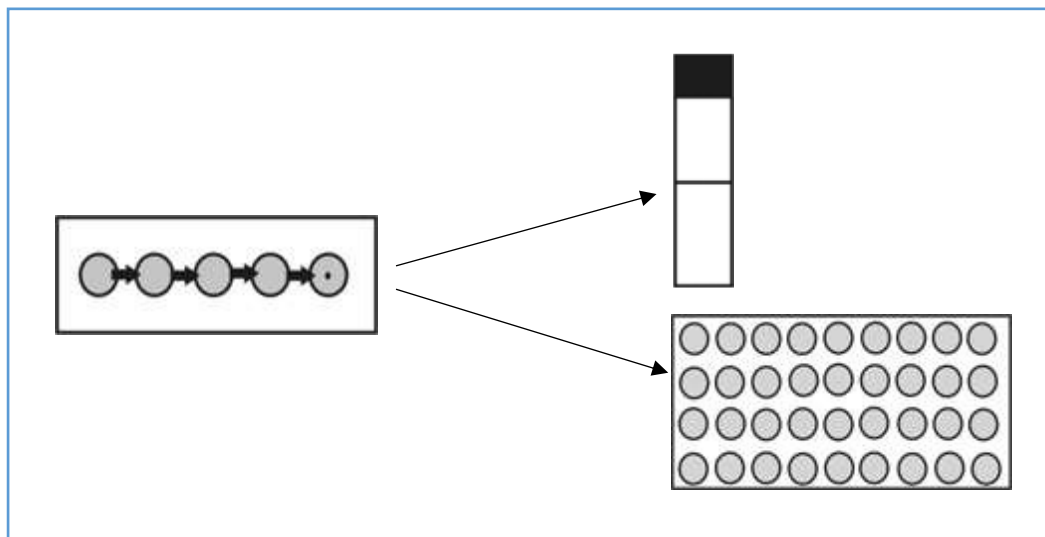
agua de mar estéril, y se repite el procedimiento hasta que la gota contenga solo células del tipo deseado, lo que suele requerir al menos cinco transferencias consecutivas.

### Figura 12

*Material empleado para el aislamiento de células fitoplanctónicas*



*Nota.* a) tamiz, b) recipiente de vidrio, c) tubos de vidrio con tapas, d) pipetas capilares, e) pipetas Pasteur, f) pipetas de transferencia, g) recipiente para cultivo de tejidos, h) placa multipozos, i) portaobjeto, j) manguera que se inserta a pipeta capilar o Pasteur para la captura de células k) caja de Petri. Tomado de *Material empleado para el aislamiento de células fitoplanctónicas*, por Arredondo y Voltolina, 2007, *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*.

**Figura 13***Aislamiento con pipeta*

*Nota.* Las células bajo el microscopio se transfieren a un portaobjetos con una gota de medio estéril o en láminas excavadas. Realizadas las transferencias, la célula se coloca en una placa multipozos o en un tubo de ensayo. Tomado de *Aislamiento con pipeta*, por Arredondo y Voltolina, 2007, Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.

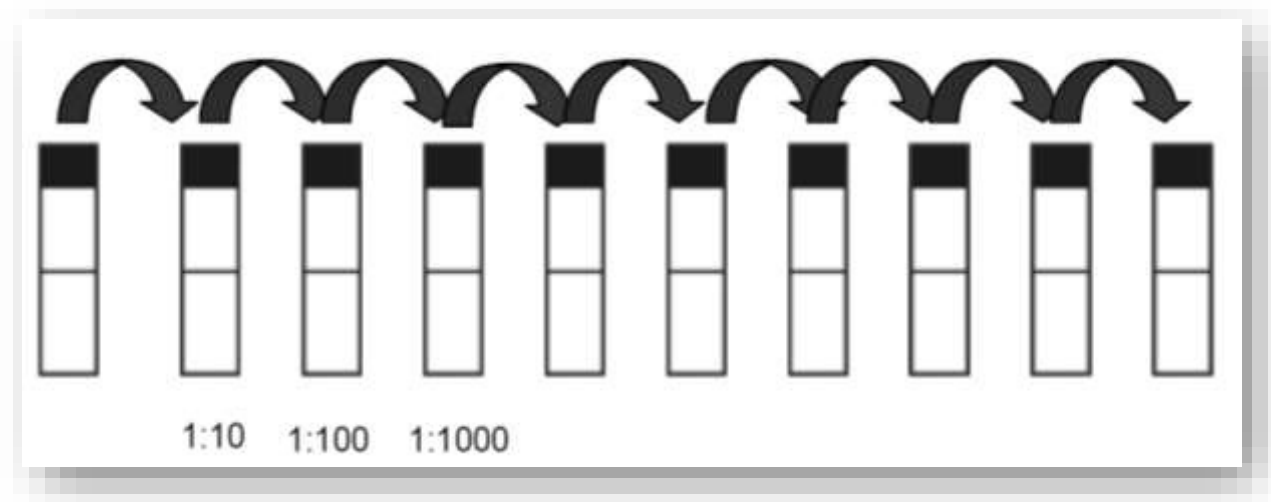
Además, Arredondo y Voltolina (2007) mencionan que, una vez aislada la célula, se puede colocar en una placa con pocillos múltiples o en un tubo de ensayo con medio de cultivo estéril. Este método es adecuado para microalgas resistentes a la manipulación, pero requiere evitar cambios bruscos en las condiciones originales de la muestra. Además, se recomienda practicar con microalgas similares antes de realizar el aislamiento definitivo para familiarizarse con la iluminación, el nivel de aumento del microscopio y la cantidad de muestra, con el fin de completar el proceso en un máximo de 10 minutos.

**2.8.1.2. Diluciones seriadas.** Según Arredondo y Voltolina (2007), estas diluciones son ideal para aislar microalgas con un tamaño menor a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y es particularmente

útil cuando la especie de interés se encuentra en gran cantidad dentro de la muestra. Antes de comenzar el proceso de aislamiento, es fundamental estimar la concentración celular para calcular cuántas diluciones serán necesarias para reducir la población a unas pocas células por mililitro. Se inicia tomando 1 mL de la muestra original y añadiéndolo a un tubo de ensayo con 9 mL de medio de cultivo estéril, lo que genera una dilución inicial. Esta mezcla se homogeniza y se transfiere 1 mL al siguiente tubo que también contiene 9 mL de medio fresco, repitiendo el proceso varias veces. La cantidad de diluciones depende de la densidad poblacional de la microalga, y los intervalos de dilución suelen variar entre  $10^{-3}$  y  $10^{-6}$ .

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), si la población de microalgas es baja, se recomienda emplear placas con pocillos múltiples de 250  $\mu$ L de capacidad y realizar diluciones en proporciones de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10 000. Durante cada traspaso, se puede supervisar el resultado con un microscopio invertido o un estereoscopio.

Así mismo, Arredondo y Voltolina (2007), sugiere llevar al trabajo de campo tubos estériles vacíos para realizar las diluciones en el lugar de recolección. La dilución debe continuarse hasta que haya un solo organismo en aproximadamente 8 a 10 mL de medio. Posteriormente, tras un período de incubación de 1 a 15 días, se toma una muestra de cada tubo para observarla bajo el microscopio. Si se detecta la presencia de otros organismos, como hongos u otras especies de microalgas, se repite el procedimiento hasta obtener un cultivo puro.

**Figura 14***Aislamiento por dilución seriada*

*Nota.* Tomado de *Aislamiento por dilución seriada*, por Arredondo y Voltolina, 2007, Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.

**2.8.1.3. Aislamiento en placas de agar.** Según Arredondo y Voltolina (2007), la técnica de aislamiento en placas de agar permite separar diversas especies de microalgas mediante un proceso de estrías en cajas de Petri con medio de cultivo sólido. Además, es una herramienta útil para purificar cultivos que presentan contaminación por otros microorganismos. Sin embargo, no todas las especies pueden mantenerse en medios sólidos, ya que las flageladas y algunas diatomeas son particularmente sensibles a este entorno. En contraste, especies bentónicas, clorofitas, cianofitas y aquellas con formas cocoidales suelen adaptarse bien a este método. Para preparar este medio de cultivo, se agrega agar en concentraciones entre 0,8 % y 2 %, y la mezcla se esteriliza en autoclave a 120 °C y 1,1 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se vierte en cajas de Petri estériles antes de que se solidifique. Sobre el medio aún fresco se colocan una o dos gotas de la muestra, que se distribuyen con un asa bacteriológica o una varilla de vidrio previamente esterilizada.

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), las cajas de Petri se cubren, se invierten y se colocan en un ambiente con condiciones de luz y temperatura controladas para su incubación, que dura entre 4 y 8 días. Posteriormente, las colonias se examinan bajo un microscopio invertido o un estereoscopio. Las colonias que no presentan contaminación se seleccionan y se transfieren a nuevas cajas de Petri, y este procedimiento se repite hasta lograr un cultivo puro de una sola especie. Tener en cuenta que las muestras pueden estar contaminadas con otras microalgas, como diatomeas y cianofitas. Para controlar el crecimiento de diatomeas indeseadas, es recomendable añadir dióxido de germanio ( $\text{Ge}_2\text{O}$ ) en una concentración de 1 a 10 mg/L. Por su parte, las cianofitas pueden ser eliminadas mediante la aplicación de antibióticos, como la estreptomycin, en concentraciones de 25 mg/L. Es fundamental ajustar estos tratamientos según las necesidades de cada especie y la resistencia de las células al tratamiento.

### **Figura 15**

*Cultivo de una cepa de microalga en medio sólido*



*Nota.* Tomado de *Cultivo de una cepa de microalga en medio sólido*, por Arredondo y Voltolina, 2007, Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.

## **2.9. Siembra y cultivo de microalgas**

Para realizar este procedimiento, lo que se hizo primero era preparar la mesa de trabajo (que previamente fue lavado con detergente, lejía y alcohol), y con presencia de un mechero para que con ayuda del calor se pudiera mantener un área aséptica de poco radio donde ningún microorganismo que se encuentre en el aire a modo de espora pueda contaminar el cultivo. Se colocó en la mesa de trabajo un vaso precipitado de 1000 mL, los matraces con el agua de mar esterilizada, las pipetas y la bagueta. Se procedió a abrir solo una parte de la boca del vaso precipitado y se flameo (para evitar alguna contaminación) y se colocó junto al mechero. Luego se abrió uno de los matraces que contenía el agua de mar esterilizada y se flameo la boca del matraz y se agregó al vaso precipitado hasta completar a 800 mL. Se tapó el vaso precipitado, pero no se retiró del mechero. Luego se procedió a poner en la mesa las pipetas de 1 mL, la bagueta y las fioas que contenían los nutrientes que estaban en la refrigeradora. Se abrió la envoltura de las pipetas (cada pipeta era para un nutriente), se colocó una propipeta y se extrajo un mililitro de cada nutriente y se agregaba al vaso precipitado donde estaba el agua de mar esterilizada (de vitaminas solo se agregó 0,5 mL). Una vez agregado todos los nutrientes, con la bagueta se procedía a homogenizar, luego se terminaba por enrazar el vaso precipitado hasta 1 L con agua de mar esterilizada, obteniendo finalmente el medio de cultivo preparado. Todo material usado se colocaba en el lavadero, para su posterior desinfección cuando se termine el sembrado de la microalga.

Luego se colocó en la mesa los matraces con tapón de algodón, donde se rotulo primero que tipo de microalga va a contener cada matraz. Primero se retiró el tapón de algodón con uno de los dedos de la mano, se flameo la boca del matraz y la boca del vaso precipitado donde estaba el

medio preparado, se procedió a agregar el medio de cultivo al matraz a un volumen de 100 mL, se flameo la boca del vaso precipitado y se volvía a tapar, después se flameo la boca del matraz, se esperó unos dos minutos que se enfríe (si se colocaba de inmediato el tapón de algodón al matraz se corría el riesgo de quemarse y/o contaminarse), una vez frío la boca del matraz se colocó el tapón de algodón. De esta manera se preservaba la seguridad del medio de cultivo.

Para la siembra se requería de una cepa de microalgas del laboratorio que contenía una alta densidad celular (se encuentra en fase exponencial).

Para este procedimiento siempre se trabajó cerca a la flama del mechero. En la mesa de trabajo se colocó los matraces que contenía: uno el medio y el otro la cepa de microalga con alta densidad y, se colocaron cerca al mechero. Luego con el dedo meñique de una de las manos se retiró el tapón de algodón del matraz, y con esa misma mano que tenía el tapón de algodón se cogió el matraz y se flameo la boca para calcinar cualquier microorganismo que habite en esa zona. Con la otra mano se hizo el mismo procedimiento con el otro matraz (con el fin de no equivocarse a que tapón de algodón pertenece a cada matraz). Una vez flameado los dos matraces se va agregar del matraz con cepa de microalga al matraz con el medio, una alícuota de unos 20 a 30 mL. A continuación, se flameo la boca de los dos matraces, se esperó unos minutos que se enfríe y se taparon con su respectivo tapón de algodón. Es muy importante mencionar aquí que los tapones de algodón en ningún momento tocaron la mesa de trabajo por más que este se encuentre esterilizado.

Seguidamente, se homogenizo con una agitación manual y se colocó este nuevo cultivo en una zona que cuenta con iluminación de luz artificial que es muy importante para el desarrollo algal de las especies en cuestión.

De la misma manera se trabajó para las otras cepas de microalgas.

Transcurrido unos 5 días con agitación constante, es notable el incremento de la densidad algal siendo visible por su color y el conteo respectivo.

Cuando el color de la microalga fue muy intenso era momento de hacer un repique a un contenedor de mayor capacidad, repitiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente variando únicamente el volumen a uno mayor. Las nuevas cepas pueden durar de 2 a 3 meses en un mismo frasco, pero luego deberá repicarse a nuevos medios, antes de que la microalga entre en un estrés de espacio por consecuencia de una sobrepoblación de células en un espacio limitado, lo que provocaría un degrado de la microalga y posterior mortalidad.

### **2.10. Recuento celular**

Según Arredondo y Voltolina (2007), el crecimiento de un cultivo de microalgas se mide a través del aumento de biomasa, el cual puede expresarse en diferentes parámetros, como el número de células por mililitro, el peso seco total u orgánico, la concentración de proteínas o pigmentos, o el volumen celular. También es posible determinar el contenido total de carbono celular o medir la fluorescencia mediante unidades arbitrarias. Estos valores se obtienen en función de un periodo de tiempo o una fase específica del crecimiento del cultivo. Existen diversos métodos para evaluar este incremento de biomasa. Entre los más comunes en los laboratorios se encuentra el recuento celular mediante microscopía y el uso de contadores de partículas. Sin embargo, los contadores automáticos suelen ser costosos, por lo que su aplicación depende de los recursos disponibles. Otra técnica ampliamente utilizada es la medición de la densidad óptica mediante espectrofotometría, que permite estimar los cambios en la concentración celular. Asimismo, el peso seco puede medirse para evaluar la biomasa total u orgánica, al igual que sus componentes bioquímicos, como proteínas, pigmentos o ácidos grasos, dependiendo del objetivo del cultivo.

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), describen que el recuento celular es uno de los métodos más accesibles, ya que es económico y sencillo de realizar, además de permitir un monitoreo visual directo del cultivo. No obstante, advierten que los resultados obtenidos mediante esta técnica no siempre coinciden con los proporcionados por otros métodos, como la medición de pigmentos o componentes bioquímicos. Esto se debe a que dichos parámetros dependen del estado fisiológico de las células, la etapa de crecimiento y las condiciones ambientales a las que está expuesto el cultivo. Para evitar errores y obtener resultados más confiables, se recomienda combinar varios métodos de evaluación, complementando con observaciones cualitativas al microscopio. Esto permite detectar posibles contaminaciones y mejorar la precisión en el monitoreo del desarrollo de las microalgas.

### ***2.10.1. Cámaras de recuento***

Según Arredondo y Voltolina (2007), una de las principales dificultades al realizar el recuento de microalgas al microscopio es garantizar una buena reproducibilidad de los resultados. Para ello, es fundamental seleccionar correctamente el volumen de la muestra, la dilución, el tipo de cámara de recuento, el aumento del microscopio y la técnica de llenado de la cámara. En algunos casos, también es necesario verificar que el volumen que la cámara contiene sea el correcto. Las cámaras de recuento están diseñadas para contener un volumen específico de muestra, el cual se encuentra distribuido entre la laminilla rígida y una lámina colocada sobre plataformas laterales, que mantienen una altura definida. La cámara más utilizada para cultivos de microalgas es el hematocitómetro de 0,1 mm de profundidad con una rejilla de Neubauer.

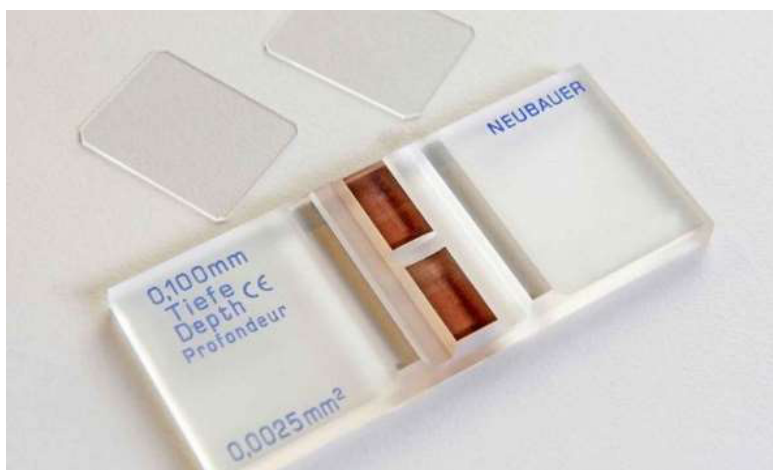
Así mismo, para Arredondo y Voltolina (2007), las microalgas de mayor tamaño, como los dinoflagelados, se emplean cámaras de mayor profundidad, como las de Sedgwick-Rafter o el hematocitómetro de 0,2 mm de profundidad con rejilla Fuchs-Rosenthal, que permiten un análisis

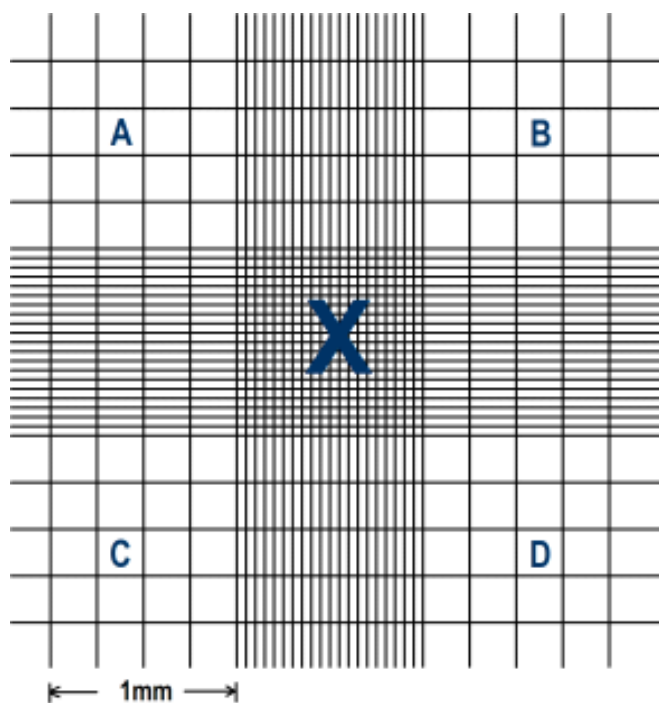
más preciso debido al mayor volumen de muestra contenido. Indican que, en la mayoría de los laboratorios, la cámara de Neubauer se utiliza para recuentos debido a su precisión y diseño. Esta cámara tiene una profundidad de 0,1 mm y consta de un área total de recuento de 0,9 mm<sup>2</sup>, dividida en nueve cuadrados de 1 mm por lado. Cada uno de estos cuadrados contiene un volumen de 0,1 μL. Los cuatro cuadrados en las esquinas están subdivididos en 16 cuadrados pequeños, mientras que el cuadro central incluye 25 subcuadrados con un área de 0,04 mm<sup>2</sup> cada uno, los cuales, a su vez, se dividen en 16 cuadrados más pequeños.

Además, para Arredondo y Voltolina (2007), indica que los cultivos con células de mayor tamaño, como aquellas de 6 μm, y con bajas concentraciones, recomienda realizar el recuento en los cuatro cuadros extremos identificados como A, B, C y D. Sin embargo, en algunos laboratorios se opta por incluir un cuadro adicional seleccionado al azar para aumentar la precisión. En contraste, cuando las células son más pequeñas y la concentración del cultivo es alta, es preferible contar cinco cuadros menores ubicados dentro del cuadro central marcado con X, ya que esto permite un recuento más representativo del cultivo.

### **Figura 16**

*Cámara de Neubauer o Hematocitómetro*



**Figura 17***Reglilla de Neubauer de 9 mm<sup>2</sup>*

*Nota.* Tomado de *Reglilla de Neubauer de 9mm<sup>2</sup>*, por Arredondo y Voltolina, 2007, Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.

**Tabla 7***Cámaras más comunes para el recuento celular*

Nombre	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Profundidad (mm)	Área (mm <sup>2</sup> )	Objetivos	Tamaño celular ( $\mu\text{m}$ )	cél/mL
<b>Petroff Hauser</b>	0,2	0,02	10	40-100	0,5-5	$10^6$ - $10^8$
<b>Speirs Levy</b>	0,4	0,2	2	10-20	5-75	$10^4$ - $10^6$

<b>Hematocitómetro (Neubauer)</b>	0,9	0,1	9	20-40	2-30	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup>
<b>Hematocitómetro (Fuchs-Rosenthal)</b>	3,2	0,2	16	10-20	5-75	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>
<b>Palmer Maloney</b>	100	0,4	250	10-45	5-150	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>
<b>Sedgwick-Rafter</b>	1000	1	1000	2,5-10	50-500	30-10 <sup>4</sup>

*Nota.* Tomado de *Nombre comercial, volumen útil de recuento, profundidad, objetivos usados más frecuentemente, tamaño de las células en la muestra e intervalo de concentraciones aconsejadas para las cámaras más comunes utilizadas para el recuento celular de microorganismos (Guillard y Sierracki, 2005)*, por Arredondo y Voltolina, 2007, *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgas*

### **2.10.2. Cálculos de recuento celular**

Según Arredondo y Voltolina (2007), para calcular la concentración celular al contar las células presentes en los cuatro cuadros de 1 mm<sup>2</sup> identificados como A, B, C y D, se utiliza la siguiente fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot \text{dil}$$

En donde:

C = corresponde a la concentración de células por mililitro (cél/mL)

N = representa el promedio de células en un área de 1 mm<sup>2</sup> (equivalente a 0,1 µL)

dil = es el factor de dilución, que se aplica solo si la muestra ha sido diluida. Por ejemplo, si se mezcla 1 mL de muestra con 9 mL de agua destilada, el volumen total es de 10 mL, y el factor de dilución es 10, equivalente a una dilución 1:10

$10^4$  = es el factor de conversión para llevar el volumen de 0,1  $\mu\text{L}$  a 1 mL

Así mismo, para Arredondo y Voltolina (2007), cuando el recuento se realiza únicamente en los cinco cuadros pequeños del cuadro central marcado con X, la fórmula utilizada es:

$$C = [(N / 4) / 10^{-6}] \cdot \text{dil.}$$

En donde:

C = es la concentración de células en cél/mL

N = es el promedio de células contadas en los cinco cuadros pequeños

$4 \times 10^{-6}$  = corresponde al volumen de la muestra en centímetros cúbicos (0,004  $\mu\text{L}$ ), calculado a partir del área de 0,004  $\text{mm}^3$  (producto de 0,2 mm  $\times$  0,2 mm  $\times$  0,1 mm)

dil = sigue siendo el factor de dilución correspondiente

En el hematocitómetro de 0,2 mm de profundidad, los cálculos son similares, pero se debe tener en cuenta que el volumen contado en un área de 1  $\text{mm}^2$  es de 0,2  $\mu\text{L}$ . En este caso, el factor de conversión de  $\mu\text{L}$  a mL es  $5 \times 10^3$ .

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), la cámara Sedgwick-Rafter tiene un diseño que incluye un marco rectangular de 50 mm x 20 mm y una profundidad de 1 mm. Estas cámaras modernas cuentan con una rejilla de 20 columnas y 50 filas para facilitar el conteo. En cultivos muy concentrados de especies unicelulares, se recomienda realizar una dilución de hasta 1:1000 y contar toda la cámara. La fórmula utilizada en estos casos es:

$$C = N \cdot \text{dil}$$

Donde:

C = es la concentración de células por mililitro

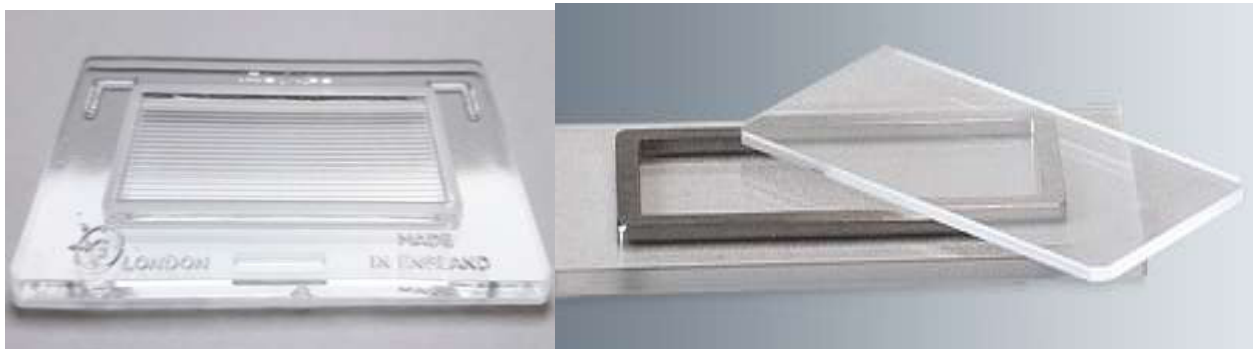
$N$  = es el número total de células contadas en la cámara

$dil$  = es el factor de dilución aplicado

Además, Arredondo y Voltolina (2007), indica que independientemente del tipo de cámara empleada, la precisión del recuento depende de la distribución aleatoria de las células sedimentadas. Cuando las microalgas forman cadenas, es más adecuado contar las cadenas completas, ya que estas se distribuyen de manera aleatoria. Luego, se obtiene un promedio del número de células por cadena para calcular el total de células presentes en la muestra.

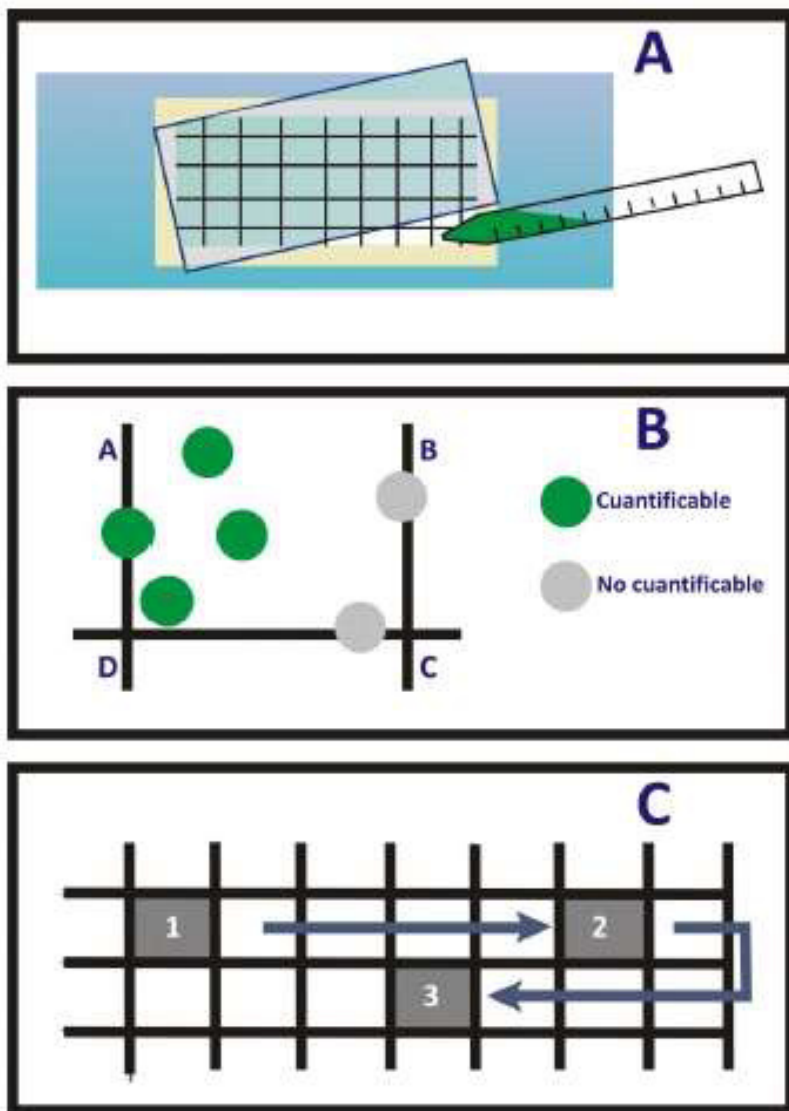
### Figura 18

*Cámara Sedwick-Rafter*



**Figura 19**

*Procedimiento de cuantificación de fitoplancton con cámara de Sedwick-Rafter*

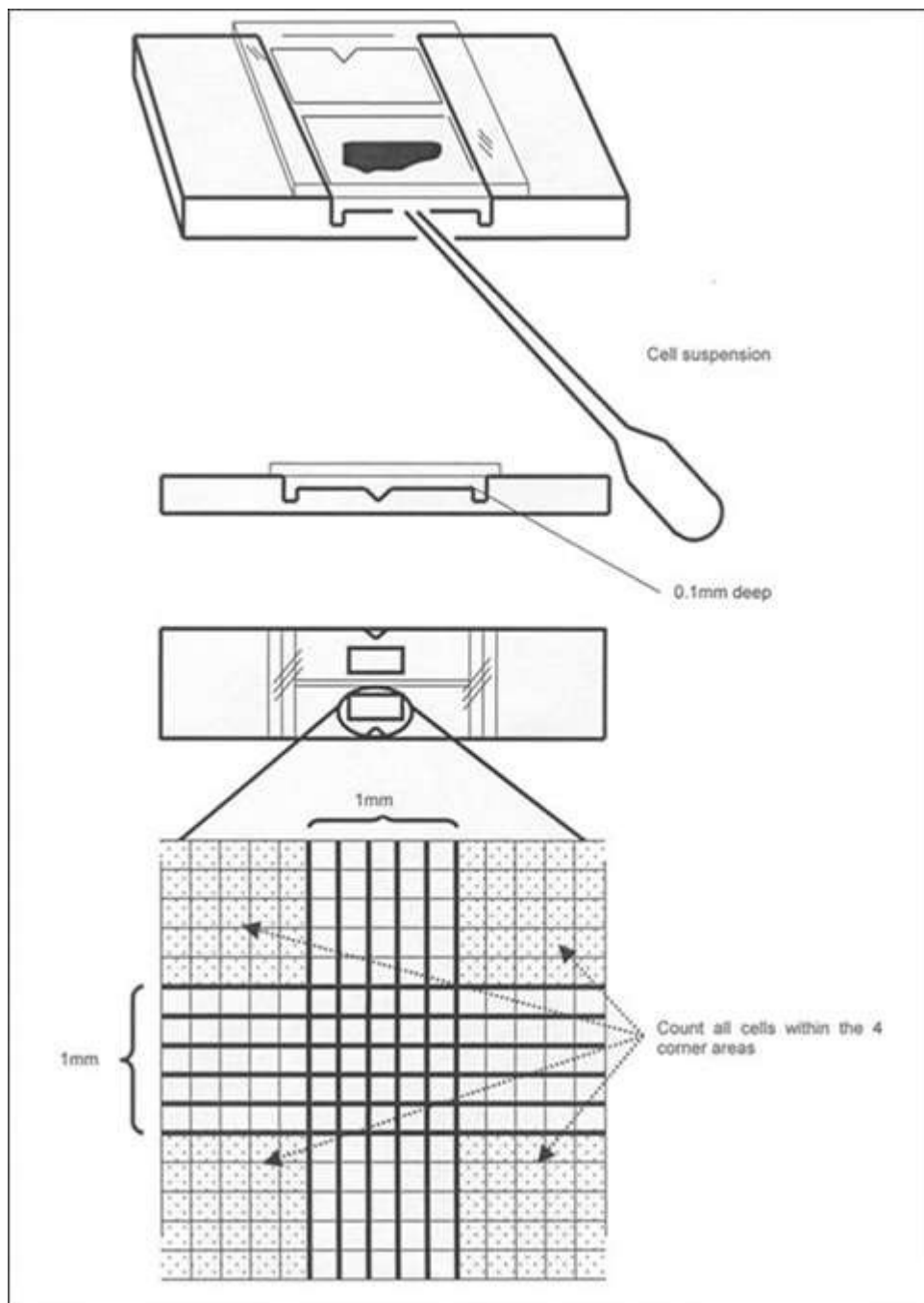


*Nota.* Tomado de *Procedimiento de cuantificación de fitoplancton con cámara de Sedwick-Rafter*, por Moreno et al., 2012, Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas

### **2.10.3. Protocolo para el recuento celular con cámara de 0,1 mm (Neubauer)**

- Según Arredondo y Voltolina (2007), antes de realizar el recuento es importante agitar el cultivo para garantizar que las células se distribuyan de manera uniforme en la muestra.
- De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), se debe tomar una alícuota de 1 mL y colocarla en un tubo limpio y seco. Para fijar las células, se añade una gota de lugol preparada mediante la mezcla de dos soluciones: la solución A, compuesta por 10 g de yoduro de potasio (KI) disueltos en 100 mL de agua destilada; y la solución B, que contiene 5 g de yodo cristalino (I<sub>2</sub>) disueltos en 10 mL de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH). Ambas soluciones se combinan, se agitan y se almacenan en un frasco ámbar para evitar la degradación.
- Así mismo Arredondo y Voltolina (2007), indica que cuando el cultivo tiene una concentración superior a 10<sup>6</sup> cél/mL, es necesario realizar una dilución con agua de mar o destilada, según corresponda. Aunque una dilución 1:10 suele ser suficiente, es fundamental verificar la concentración final para asegurar una precisión adecuada. Esta precisión se basa en el número promedio de células contadas en 1 mm<sup>2</sup>, siguiendo la fórmula  $\mu = x \pm 2x$ , donde  $\mu$  es la media poblacional y x el promedio de células contadas. Por ejemplo, si el promedio es de 25 células, la precisión sería de  $25 \pm 10$ , lo que indica un rango de entre 15 y 35 células.
- De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), una vez preparada la dilución, se agita el tubo y se extrae una muestra con una pipeta Pasteur.
- Según Arredondo y Voltolina (2007), la cámara se llena cuidadosamente con el cubreobjetos ya colocado. La punta de la pipeta se posiciona en la muesca en forma de

- V de la cámara y se deposita el volumen necesario hasta que el líquido alcance los canales laterales, sin sobrepasarlos. Si esto ocurre, es necesario limpiar y secar la cámara. En cámaras sin muesca, se coloca la gota cerca del margen del cubreobjetos, evitando que se extienda hacia la parte superior. También se puede añadir la muestra en uno de los canales laterales y verificar que el exceso fluya hacia el canal opuesto.
- De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), para observar las células, se utiliza generalmente un objetivo de 10X, aunque en el caso de células muy pequeñas, se recomienda emplear un aumento de 40X para facilitar la identificación y distinguirlas de residuos u otros objetos de tamaño similar.
  - Según Arredondo y Voltolina (2007), la anotación del recuento se realiza contando las células que se encuentran dentro de las cuadrículas A, B, C y D. Si alguna célula toca las líneas de demarcación entre cuadros, solo se consideran aquellas que tocan dos de los cuatro lados, seleccionados al azar.
  - De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), para conseguir un recuento más preciso, se emplean al menos tres submuestras de la misma muestra, y con estos datos se calcula la concentración promedio de células por mililitro aplicando la fórmula previamente mencionada.
  - Así mismo Arredondo y Voltolina (2007), señala que los valores de concentración celular obtenidos en diferentes momentos (normalmente con intervalos de 24 horas), se grafica la curva de crecimiento. En el eje "Y" se colocan los valores de concentración celular y en el eje "X" el tiempo en días. Además, es relevante calcular la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), el tiempo de generación (tg) y el número de duplicaciones (n), siguiendo el método descrito por Schoen (1998).

**Figura 20***Recuento celular*

*Nota.* Tomado de *Esquema del hematocitómetro*, por Herráez, 2023, Recuento celular: determinación de la concentración de células en una suspensión

Figura 21

Cámara Neubauer

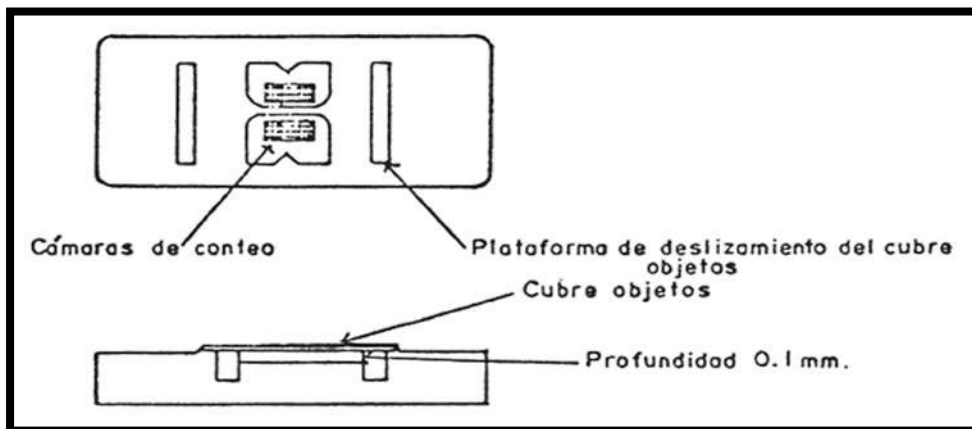
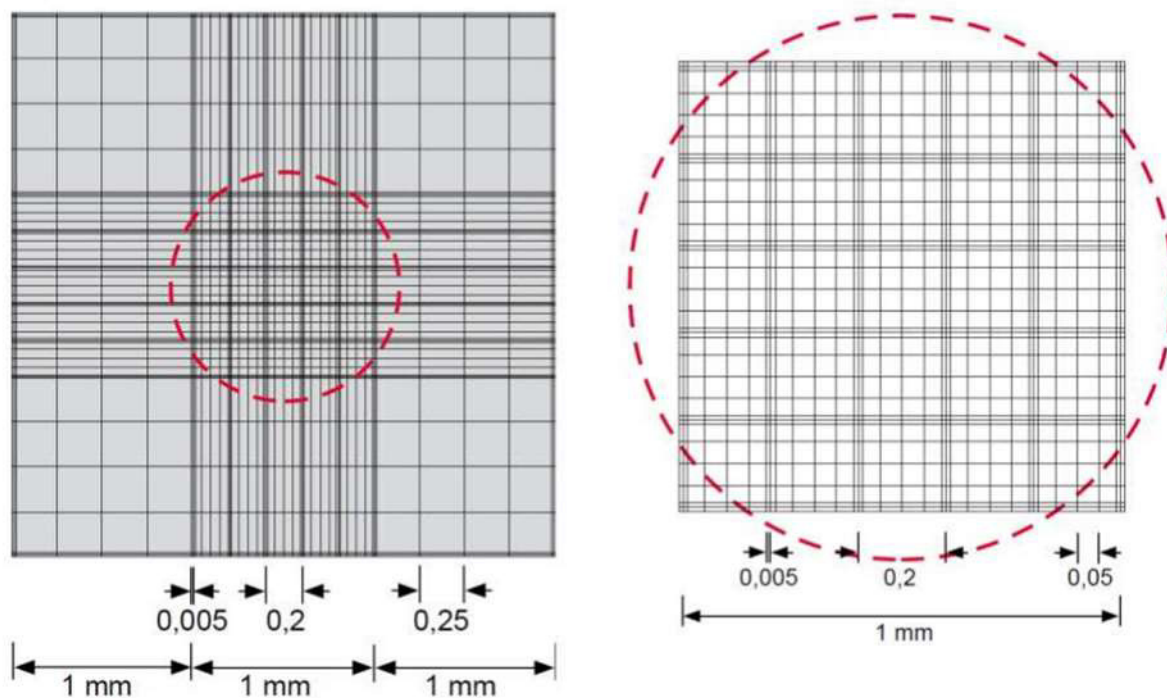


Figura 22

Cámara Neubauer. Dimensiones



*Nota.* Tomado de Neubauer – mejorada con líneas oscuras, por Libkind et al., 2014, Curso teórico – práctico sobre microscopía y recuento de levaduras para productores de cerveza

En el laboratorio de Cultivos Menores y Ficología usamos una fórmula simplificada para el conteo de células de microalgas en la cámara de Neubauer. Se cuenta todas las subcámaras, es decir, las nueve subcámaras denominados: Cámara 1, Cámara 2, así sucesivamente hasta la Cámara 9 (C1, C2, ..., C9). Luego esta sumatoria se divide entre la misma cantidad de subcámaras que se contaron. Una vez obtenido el resultado se multiplicó por 10000. Dándonos el resultado, células por mililitro.

$$\frac{\#cél}{9} \cdot 10000 = \# \frac{cél}{mL}$$

#### **2.10.4. Densidad óptica**

Según Arredondo y Voltolina (2007), la concentración celular puede ser estimada de manera indirecta mediante la medición de la densidad óptica del cultivo. Aunque este método es menos preciso que el recuento celular directo, permite realizar una evaluación rápida de la concentración de microalgas, sobre todo si se cuenta con una curva de calibración específica que relacione la densidad óptica con la concentración celular de la especie estudiada. Sin embargo, una de las limitaciones de esta técnica es que puede arrojar resultados erróneos en presencia de contaminantes como bacterias, residuos o partículas extrañas, lo que ha llevado a algunos laboratorios a disminuir su uso.

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), a pesar de sus limitaciones, esta técnica sigue utilizándose en algunos laboratorios para identificar de manera rápida las fases de crecimiento del cultivo. Esto permite tomar decisiones inmediatas respecto a los momentos ideales de cosecha o la necesidad de realizar diluciones. Algunos investigadores recomiendan realizar la medición utilizando una longitud de onda cercana al pico de absorción de la clorofila,

aproximadamente 675 nm, ya que esto facilita la detección aun cuando la concentración celular es baja. Sin embargo, otros consideran que es mejor utilizar longitudes de onda cercanas al punto de mínima absorción. Esta diferencia de enfoques se debe a que la cantidad de clorofila en las células varía en función de la cantidad de luz recibida, lo cual puede estar influenciado por las condiciones experimentales y la edad del cultivo. En este sentido, se ha sugerido realizar las lecturas a 550 nm para obtener resultados más consistentes.

#### **2.10.4.1. Protocolo para determinar la densidad óptica.**

- Según Arredondo y Voltolina (2007), se debe agitar el cultivo antes de realizar la medición, ya sea si fue recién inoculado o si se encuentra en alguna fase específica de crecimiento, con el fin de asegurar que las células se distribuyan de manera homogénea en la muestra.
- De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), se toma el volumen adecuado de muestra y se coloca en una celda de medición con un volumen y un camino óptico apropiados según el tipo de equipo disponible en el laboratorio. Si el cultivo presenta una alta concentración, es necesario realizar una dilución previa. La muestra debe agitarse nuevamente antes de medir la transmitancia o la absorbancia en el espectrofotómetro o colorímetro, utilizando la longitud de onda previamente seleccionada. Antes de la medición, el equipo debe ser calibrado utilizando agua destilada o de mar, según la naturaleza del cultivo (agua dulce o marina), aunque las diferencias en las lecturas entre ambos tipos de agua son generalmente mínimas.
- Así mismo, Arredondo y Voltolina (2007), indica que, con los valores de densidad óptica obtenidos, se elabora la curva de crecimiento, graficando los

valores de densidad óptica (DO) en el eje "Y" y el tiempo en el eje "X". Es importante tener en cuenta que, si se utiliza la transmitancia (es decir, el porcentaje de luz incidente que alcanza el fotodetector), se debe realizar la conversión correspondiente mediante la fórmula:  $DO = 100 - T$ , donde T representa la transmitancia.

#### **2.10.5. Curva de crecimiento**

Según Arredondo y Voltolina (2007), las microalgas, al igual que las bacterias y las levaduras, se reproducen mayoritariamente por división celular binaria. Esto les permite tener un crecimiento acelerado cuando se cultivan en un medio con nutrientes suficientes y en condiciones ambientales óptimas. A medida que el cultivo envejece, las condiciones ambientales cambian y esto afecta la velocidad de crecimiento poblacional. Este proceso permite identificar distintas fases de crecimiento que ayudan a describir cómo varía la concentración celular o la biomasa a lo largo del tiempo. Para analizar el comportamiento del cultivo se utilizan parámetros poblacionales clave, como la velocidad específica de crecimiento, también conocida como tasa de crecimiento ( $\mu$ ), y el tiempo de duplicación o generación ( $t_g$ ), que indican la rapidez con la que se duplica la población celular.

#### **2.10.6. Ecuaciones que definen el crecimiento (Guillard, 1973)**

Según Arredondo y Voltolina (2007), la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) se define mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = dx / dt \cdot 1/x$$

Donde:

x = representa la concentración de biomasa (número de células por mililitro)

t = corresponde al tiempo, expresado en días

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), en una curva de crecimiento típica es posible identificar varias fases, que reflejan las diferentes etapas por las que pasa el cultivo de microalgas desde su inoculación hasta su declive. Estas fases se describen en detalle para comprender mejor los cambios en la concentración de células durante el desarrollo del cultivo.

### ***2.10.7. Fases de crecimiento***

**2.10.7.1. Fase lag o fase de adaptación.** Según Arredondo y Voltolina (2007), el comportamiento inicial del cultivo depende del estado metabólico de las células utilizadas como inóculo. Si estas no se encuentran en buenas condiciones, es probable que el cultivo presente una fase de retraso, lo que puede comprometer su éxito. Además, factores ambientales como la temperatura, la intensidad de la luz o el pH influyen en esta etapa, pudiendo causar un retardo en el inicio del crecimiento celular.

**2.10.7.2. Fase de aceleramiento.** De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), los autores, durante esta fase los componentes estructurales de las células comienzan a aumentar de forma secuencial. Primero se incrementa el contenido de ácido ribonucleico (RNA), seguido de la síntesis de proteínas y el aumento del peso celular individual. La concentración celular es la última en reflejar un incremento, ya que esta depende de la división efectiva de las células.

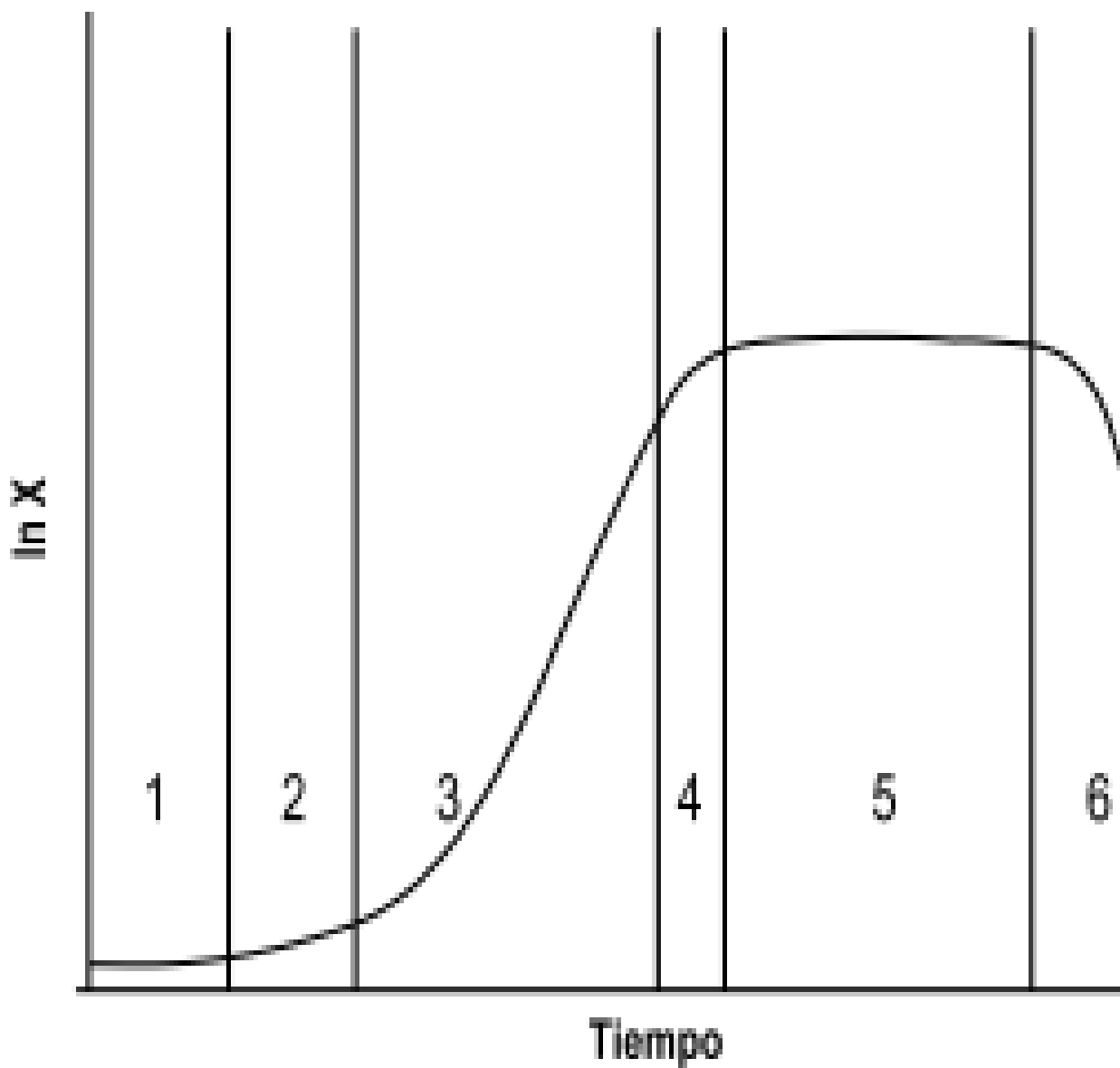
**2.10.7.3. Fase exponencial.** Así mismo, Arredondo y Voltolina (2007), señala que, en la fase exponencial, el cultivo alcanza su tasa de crecimiento máxima y, al no haber limitaciones en los recursos, esta se mantiene constante durante un tiempo. Esto provoca un aumento rápido de la concentración celular, aunque los valores alcanzados suelen ser moderados, ya que dependen de las condiciones del medio y la disponibilidad de luz.

**2.10.7.4. Fase de desaceleración.** Según Arredondo y Voltolina (2007), en esta etapa, comienza a disminuir la disponibilidad de algunos nutrientes esenciales, lo que genera

condiciones subóptimas para el crecimiento. Como resultado, la tasa de división celular se reduce, pero debido a la gran cantidad de células presentes, la concentración celular llega a su punto máximo. En esta fase, la composición bioquímica de la biomasa cambia de manera inversa a los patrones observados durante la fase de aceleración.

**2.10.7.5. Fase estacionaria.** De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), las condiciones del cultivo se vuelven limitantes, lo que provoca que la tasa de natalidad sea igual a la de mortalidad. Esto mantiene la concentración celular y los componentes de la biomasa en valores constantes. Este fenómeno suele ser provocado por la baja concentración de nutrientes, un pH elevado que reduce la disponibilidad de dióxido de carbono o una acumulación excesiva de oxígeno. Además, la alta densidad celular puede provocar un efecto de autosombreado, reduciendo la penetración de la luz. Otro factor limitante puede ser la acumulación de productos de desecho metabólicos, que afectan negativamente al crecimiento celular.

**2.10.7.6. Fase de muerte.** Según Arredondo y Voltolina (2007), en esta última fase, la tasa de mortalidad supera a la tasa de división celular, lo que provoca una disminución en la concentración celular. La biomasa por célula también se reduce debido al aumento de la respiración y la reducción de la fotosíntesis. La falta de nutrientes esenciales y el agotamiento del medio de cultivo conducen finalmente a la muerte o lisis celular, poniendo fin al ciclo de crecimiento.

**Figura 23***Curva de crecimiento típica*

*Nota.* Se muestran las diferentes fases, marcadas como: 1 fase lag; 2 fase de aceleramiento; 3 fase exponencial; 4 fase de desaceleración del crecimiento; 5 fase estacionaria; 6 fase de muerte.

Tomado de *Curva de crecimiento típica*, por Arredondo y Voltolina, 2007, Métodos y herramientas analíticas en la evolución de la biomasa microalgal

### **2.11. Mantenimiento de un cepario**

Según Lora et al. (2016), los objetivos del cultivo de células de microalgas pueden variar, incluyendo la producción de biomasa y la adquisición de células en fases de desarrollo específicas en aspectos morfológicos, fisiológicos y de composición bioquímica. Por ejemplo, en el ámbito de la acuicultura, las condiciones de cultivo deben ser ideales para generar la mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo posible, con una alta composición en proteínas y ácidos grasos indispensables. En las colecciones de microalgas, el propósito no es generar una gran cantidad de biomasa, sino preservar las cepas vivas en las condiciones fisiológicas y morfológicas más favorables. Para conseguirlo, se necesitan condiciones infranqueables para disminuir la tasa de crecimiento, de manera que las replantaciones se lleven a cabo con el máximo espacio posible.

De acuerdo con Lora et al. (2016), las microalgas deben mantenerse en la fase exponencial de crecimiento o justo antes de entrar en la fase estacionaria. En algunos casos, es posible conservarlas en la fase estacionaria siempre que se asegure que las células puedan reiniciar un nuevo ciclo de cultivo. Este mantenimiento se realiza reduciendo la temperatura y aplicando una iluminación tenue, con ciclos de luz y oscuridad. Se recomienda mantener una temperatura de 20 °C, una intensidad lumínica de 10 a 30  $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$  y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Según Arredondo y Voltolina (2007), el almacenamiento de las cepas puede hacerse en medio líquido o sólido. Los cultivos líquidos suelen mantenerse en recipientes de pequeño volumen, como matraces Erlenmeyer de 20 a 100 mL o tubos de ensayo con un volumen de 25 a 50 mL. La periodicidad de las resiembras depende de cada especie, pero este procedimiento demanda atención y tiempo.

**Figura 24**

*Cepas de microalgas en medio sólido y líquido*



*Nota.* Tomado de *Cepas de microalgas en medio sólido y líquido*, por Arredondo y Voltolina, 2007, *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*

Así mismo, Lora et al. (2016), señala que los periodos de resiembra pueden variar entre cuatro semanas y seis meses, lo que permite optimizar los recursos y establecer un cronograma anual para cada cepa.

## Figura 25

### *Cepario de microalgas*



*Nota.* a) resiembra de microalgas en campana de flujo laminar, b) colección de microalgas, c) cepas en matraces, d) cepas en tubos de ensayo. Tomado de *¿Conservar fitoplancton vivo? Cepario de microalgas del CIBNOR*, por Lora et al., 2016, Recursos naturales y sociedad, 2 (2)

Según Arredondo y Voltolina (2007), las inoculaciones deben realizarse en un ambiente estéril, preferiblemente en una campana de flujo laminar o, en su defecto, sobre una mesa equipada con dos mecheros de gas. La superficie de trabajo debe estar completamente limpia, desinfectada previamente con soluciones como etanol al 70 %, fenol al 5 %, cloro al 0,4 %, o desinfectantes comerciales como benzal o lysol al 3,5 %. En el caso de utilizar una campana de flujo laminar, se

recomienda exponerla a luz ultravioleta (UV) de 20 a 40 W durante 10 a 20 minutos antes de su uso. Además, es ideal que las transferencias se realicen a baja temperatura en un ambiente sin circulación de aire. Para mayor seguridad, se sugiere mantener cada cepa por triplicado y realizar controles bacteriológicos inoculando una pequeña cantidad de la muestra en placas de Petri con agar al 2 % y glucosa para detectar posibles contaminaciones. Asimismo, es importante etiquetar adecuadamente los recipientes con el nombre y origen de la especie, la fecha de inoculación y el tipo de medio de cultivo empleado. Antes de realizar la resiembra, se debe observar el estado del cultivo bajo el microscopio. Luego de este procedimiento, se recomienda conservar el cultivo anterior hasta la siguiente resiembra para garantizar la continuidad del proceso y evitar pérdidas.

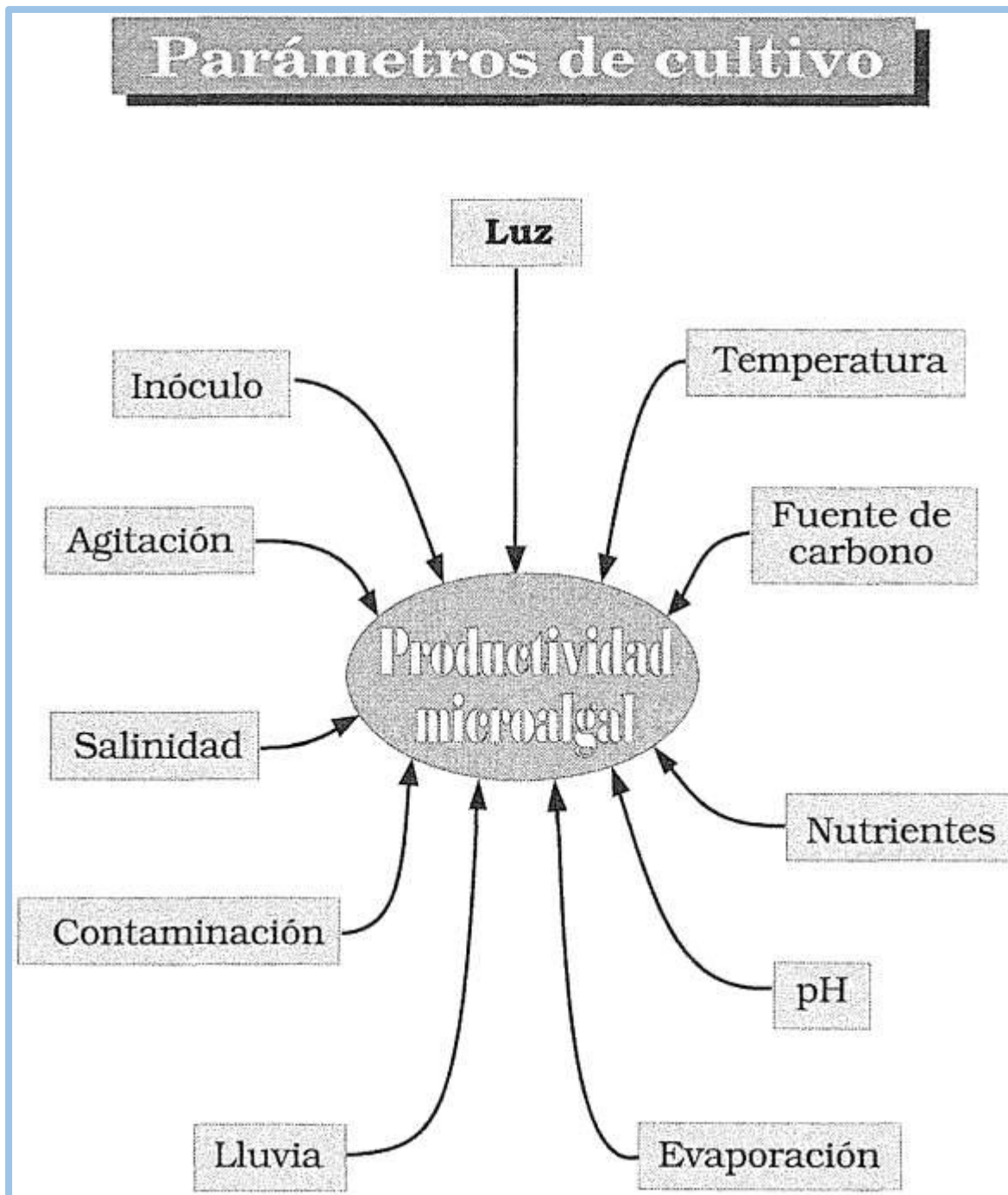
### ***2.11.1. Condiciones de cultivo – parámetros físico-químico***

Según Urbano (2019), al igual que otros organismos vivos, las microalgas dependen en gran medida de las condiciones físicas del entorno para crecer adecuadamente. Factores como la temperatura, la luz, la salinidad, el dióxido de carbono y el oxígeno influyen en la tasa de crecimiento de cada especie, la cual tiene un rango específico de tolerancia para cada uno de estos parámetros.

**2.11.1.1. Luz.** De acuerdo con Urbano (2019), la intensidad de la luz es uno de los factores más relevantes en los cultivos de microalgas. En entornos de laboratorio, se recomienda mantener una intensidad lumínica entre 2000 y 5000 lux, dependiendo de la fase de crecimiento y la densidad celular. Para optimizar la eficiencia de la fotosíntesis, es importante mantener la suspensión de las células mediante agitación constante, ya sea manual o con aireación, permitiendo que las células se espongan de manera uniforme a la luz durante breves periodos. La calidad espectral de la luz también es un factor clave, ya que las microalgas solo utilizan longitudes de onda dentro del rango de 400 a 700 nm para realizar la fotosíntesis.

Figura 26

*Parámetros de cultivo de microalgas*



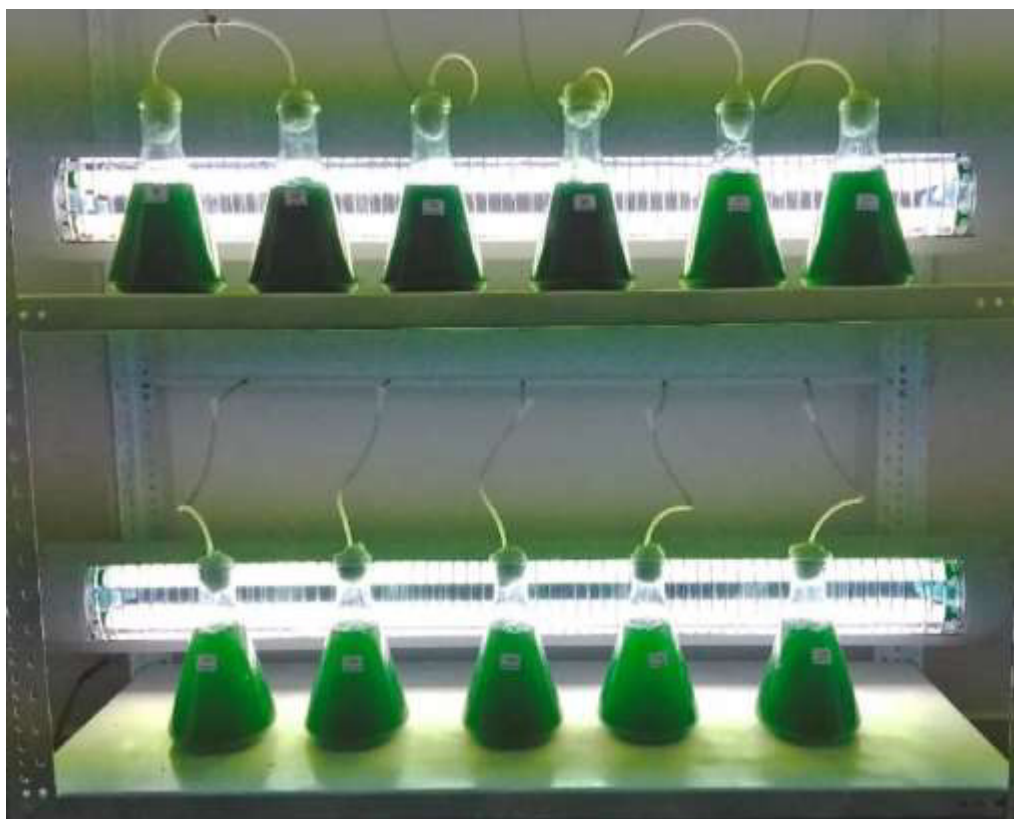
*Nota.* Tomado de *Parámetros de cultivo de microalgas*, por Abalde et al., 1995, *Microalgas:*

Cultivo y aplicaciones

Según Arredondo y Voltolina (2007), en cuanto al fotoperiodo, explican que los cultivos suelen exponerse a ciclos de 10 horas de luz y 14 de oscuridad, o bien 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Sin embargo, muchas especies también prosperan bajo iluminación continua. Según los autores, la aplicación de un fotoperiodo específico ayuda a sincronizar el comportamiento celular del cultivo, lo que resulta ventajoso para estudios fisiológicos. Además, se ha observado que en varias especies la división celular ocurre durante la fase de oscuridad, lo que sugiere la importancia de estos ciclos para mantener un ritmo de crecimiento equilibrado.

### **Figura 27**

*Iluminación de microalgas en un cepario*



*Nota.* Se requiere de condiciones de luz adecuada para la multiplicación de las microalgas. Tomado de *Iluminación de microalgas en un cepario*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

**2.11.1.2. Temperatura.** Según Arredondo y Voltolina (2007), la temperatura recomendada para mantener las cepas de microalgas oscila entre los 18 °C y 22 °C. No obstante, es posible emplear temperaturas más bajas si el objetivo es prolongar el tiempo entre diluciones de mantenimiento. Por otro lado, cuando se busca optimizar la reproducción y acelerar la tasa de crecimiento, la temperatura debe ajustarse al rango más conveniente según la especie, teniendo en cuenta sus límites de tolerancia. Tener presente que el sistema de iluminación genera calor, por lo que los espacios destinados al mantenimiento de cepas deben contar con un sistema de control térmico fiable, además de un mecanismo de seguridad adicional para prevenir fluctuaciones de temperatura.

**2.11.1.3. Aireación y agitación.** Así mismo, para Arredondo y Voltolina (2007), en cultivos que varían entre 250 mL y 2000 mL, no es necesaria una aireación constante, ya que una agitación manual diaria suele ser suficiente. Sin embargo, en cultivos de mayor escala, es recomendable realizar una aireación ligera durante los primeros días tras la inoculación y, a medida que la concentración celular aumenta, incrementar la intensidad de aireación de acuerdo con la sensibilidad de la especie. Esto permite distribuir los nutrientes de manera uniforme, mejorar la exposición a la luz y estabilizar el pH mediante el aporte de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Además, la aireación evita la estratificación térmica y mantiene las células en suspensión, lo que contribuye a una mayor uniformidad del cultivo al momento de la cosecha.

De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), el aire puede ser distribuido a través de un sistema de compresores conectado mediante líneas de PVC con válvulas para regular la cantidad de flujo. Es importante usar filtros para reducir la carga bacteriana y evitar la entrada de partículas contaminantes al cultivo. Entre los filtros disponibles se encuentran los de fibra, tierra de diatomeas, acrilamida, algodón y carbón activado. Asimismo, una opción económica y eficaz es

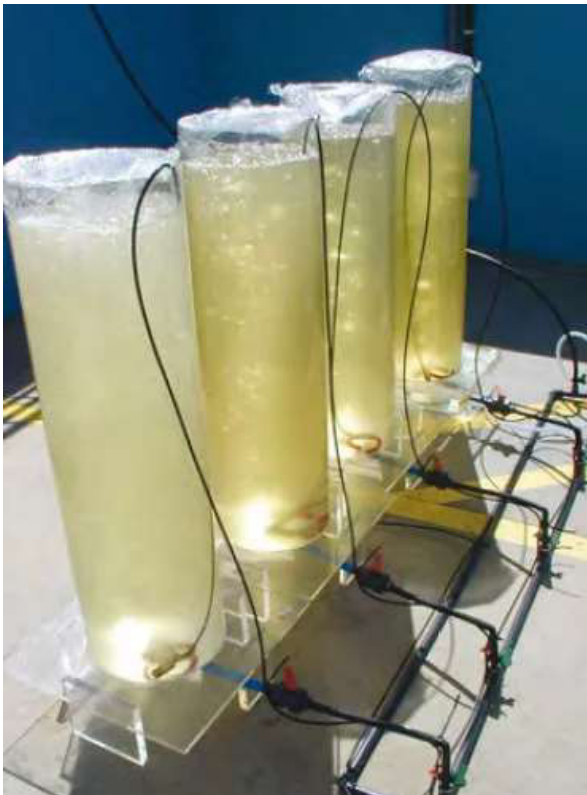
fabricar un filtro casero utilizando un tubo de PVC con algodón en los extremos y carbón activado en el centro.

Según Urbano (2019), dependiendo del tipo de cultivo, la aireación se realiza de diversas maneras:

- En tubos de ensayo o matraces Erlenmeyer se agita manualmente.
- En bolsas y tanques se realiza mediante aireación directa.
- En estanques de mayor escala, se emplean ruedas de paletas o bombas de chorro para mantener la agitación constante.

### Figura 28

#### *Aireación de microalgas*



*Nota.* Tomado de *Aireación de microalgas*, por Urbano, 2019, Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.

**2.11.1.4. pH.** Según Urbano (2019), las microalgas presentan diferentes requerimientos de pH dependiendo de la especie. La mayoría de ellas crece de manera óptima en un rango de pH de 6 a 8,76. Sin embargo, algunas especies son sensibles a cambios bruscos de pH, lo que puede disminuir su productividad y afectar el crecimiento celular. Por otro lado, un aumento excesivo del pH puede incrementar la salinidad del medio de cultivo, lo que representa un riesgo para la viabilidad de las células algales. Es posible controlar el pH mediante un sistema automatizado de inyección de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) o, de manera más simple, agregando una solución ácida o básica según sea necesario para restablecer el equilibrio.

**2.11.1.5. Salinidad.** De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2007), la concentración de sales minerales disueltas en el agua, influye directamente en el crecimiento de las microalgas, tanto en agua dulce como en agua de mar. Este efecto depende del nivel de actividad osmótica de las células, pero también de la interacción con otros factores como la temperatura, la luz, la fuente de nitrógeno y la concentración de nutrientes disponibles. La membrana plasmática de las microalgas es permeable al agua, pero no a los solutos, lo que implica que, ante un entorno con alta salinidad, las células deben compensar el gradiente osmótico incrementando la síntesis o absorción de solutos compatibles. Según los autores, estos compuestos incluyen glicerina, manitol y sorbitol, así como prolina, manosa, sacarosa e isofloridósido. La capacidad de regular la presión osmótica mediante la producción de estos solutos es crucial para la supervivencia celular en condiciones de estrés salino.

## **2.12. Cosecha**

Según Hernández-Pérez y Labbé (2014), uno de los mayores retos en el cultivo de microalgas es la recuperación de biomasa, ya sea con fines comerciales, para el tratamiento de aguas residuales o para la captura de dióxido de carbono. La cosecha es considerada el proceso

más complejo y costoso dentro del sistema de cultivo, ya que depende tanto de las características biológicas del cultivo como de las técnicas empleadas. El método de cosecha puede influir significativamente en el costo total de producción, incrementándolo entre un 20 % y un 30 %. Por este motivo, es crucial desarrollar tecnologías más eficientes y económicas para hacer viable la producción a escala comercial, especialmente en proyectos orientados a la producción de biocombustibles. Los métodos más empleados para la recuperación de biomasa incluyen técnicas como la centrifugación, la sedimentación, la filtración, la flotación y la floculación. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas dependiendo de la especie cultivada y de los objetivos del cultivo.

#### ***2.12.1. Centrifugación***

De acuerdo con Hernández-Pérez y Labbé (2014), la centrifugación es una técnica eficiente y rápida para separar la biomasa de microalgas. Sin embargo, su aplicación a gran escala es limitada debido a su elevado consumo energético y la necesidad de equipos especializados. Este método es más viable cuando los productos obtenidos tienen un alto valor comercial.

#### ***2.12.2. Sedimentación***

Según Hernández-Pérez y Labbé (2014), la sedimentación gravitacional es uno de los métodos más comunes para recolectar biomasa de microalgas. Aunque es un procedimiento sencillo, destaca por ser eficiente y económico en términos de ejecución. Además, es aplicable a diversas especies microalgales y tiene un bajo consumo de energía.

#### ***2.12.3. Filtración***

De acuerdo con Hernández-Pérez y Labbé (2014), la filtración se utiliza frecuentemente para la separación sólido-líquido en cultivos de microalgas. Este método es efectivo para especies de mayor tamaño, como *Spirulina*, pero menos eficiente para microalgas más pequeñas, como

*Chlorella* o *Scenedesmus*. A pesar de ser un método eficaz, requiere un alto consumo energético debido al reemplazo frecuente de las membranas y al bombeo constante de biomasa. No obstante, existen esfuerzos técnicos para optimizar este proceso y reducir sus costos operativos.

#### **2.12.4. Flotación**

Según Hernández-Pérez y Labbé (2014), La flotación es una técnica prometedora para la recolección de microalgas unicelulares, sobre todo en experimentos de laboratorio. El procedimiento consiste en la adición de gases, como ozono o aire, que interactúan con las cargas de las paredes celulares, haciendo que las microalgas floten y puedan ser separadas. Sin embargo, el uso de ozono incrementa significativamente los costos, lo que limita su aplicación a gran escala.

#### **2.12.5. Floculación**

Así mismo Hernández-Pérez y Labbé (2014), menciona que la floculación convencional se basa en la neutralización de las cargas negativas de las microalgas mediante la adición de sales metálicas, como el aluminio, lo que permite su agrupación y posterior separación. Esta técnica puede combinarse con otros métodos, como sedimentación, filtración o flotación, para mejorar su eficiencia. No obstante, el residuo de sales hace que el producto final pierda pureza, lo que limita su uso en aplicaciones alimentarias. También indica que algunas microalgas pueden autoflocularse de manera natural, un proceso espontáneo que resulta en la sedimentación sin necesidad de agentes químicos. Esta autofloculación puede ser inducida por limitaciones de carbono o por otros factores abióticos.

#### **2.12.6. Ultrasónica**

Según Urbano (2019), la aplicación de ultrasonidos es una técnica que fomenta la formación de agregados de microalgas, facilitando su separación. Esta metodología aprovecha las

ondas ultrasónicas para inducir la agrupación de células, haciendo más eficiente el proceso de cosecha en ciertos tipos de cultivos.

En el Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología los conteos celulares de microalgas que se realizó para una toma de decisiones para su posterior cosecha fueron las concentraciones de las siguientes microalgas:

*Tetraselmis* sp c.c. =  $1440 \times 10^3$  cel/mL

*Chaetoceros* spp c.c. =  $25 \times 10^6$  cel/mL

*Skeletonema* sp c.c. =  $8 \times 10^6$  cel/mL

### **2.13. Procesado de la biomasa**

Según Urbano (2019), una vez que se consigue el concentrado celular o pasta de microalgas, se procede al procesado de la biomasa. En acuicultura, esta biomasa puede utilizarse en su estado fresco, congelado o refrigerado. Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones comerciales es necesario realizar distintos tratamientos para garantizar su estabilidad y funcionalidad.

#### ***2.13.1. Deshidratación***

De acuerdo con Urbano (2019), el método más utilizado para la deshidratación es el secado por atomización, debido a su eficiencia y rapidez. No obstante, también se han obtenido buenos resultados con la liofilización y el uso de secadores de tambor. Para conservar tanto la pasta como el producto seco, es crucial contar con equipos adecuados de envasado al vacío y sistemas de refrigeración y congelación, lo que permite mantener las propiedades de la biomasa durante más tiempo.

### ***2.13.2. Homogenización y ruptura celular***

Según Urbano (2019), en este proceso, se han probado diferentes técnicas, entre ellas el uso de ultrasonidos. Los homogenizadores de alta presión han mostrado ser más efectivos. Este tratamiento mejora la digestibilidad de la biomasa y facilita la extracción de compuestos bioactivos, como los pigmentos, optimizando así el aprovechamiento de los metabolitos.

### ***2.13.3. Extracción de metabolitos***

Según Urbano (2019), en cuanto a la extracción de metabolitos, se emplean métodos directos que utilizan aceites o disolventes como el hexano. Estos disolventes orgánicos tienen una alta afinidad por los lípidos, lo que favorece la ruptura de las paredes celulares y permite liberar los aceites almacenados en la biomasa. Este proceso es clave para la obtención de compuestos como lípidos y otros metabolitos de interés comercial.

En la cosecha por **centrifugación** que se realizó en el Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología, los cultivos que se encontraban en los frascos o matraces, primeramente, lo que se hizo es agitar u homogenizar y se vertió en los tubos de 50 mL que son exclusivos para este proceso, luego fueron colocados en la centrifuga de marca PREMIERE modelo XC-2500 Series a 3500 RPM por un lapso de 5 minutos. Una vez terminado el proceso de centrifugado, con extremo cuidado de no remover los tubos se retiran del equipo; con una pipeta conectada a una propipeta se introduce al tubo donde está la muestra y se extrae el sobrenadante (la parte líquida) quedando en la parte del fondo del tubo el concentrado de microalgas y a su vez estos tubos se colocaron en una gradilla.

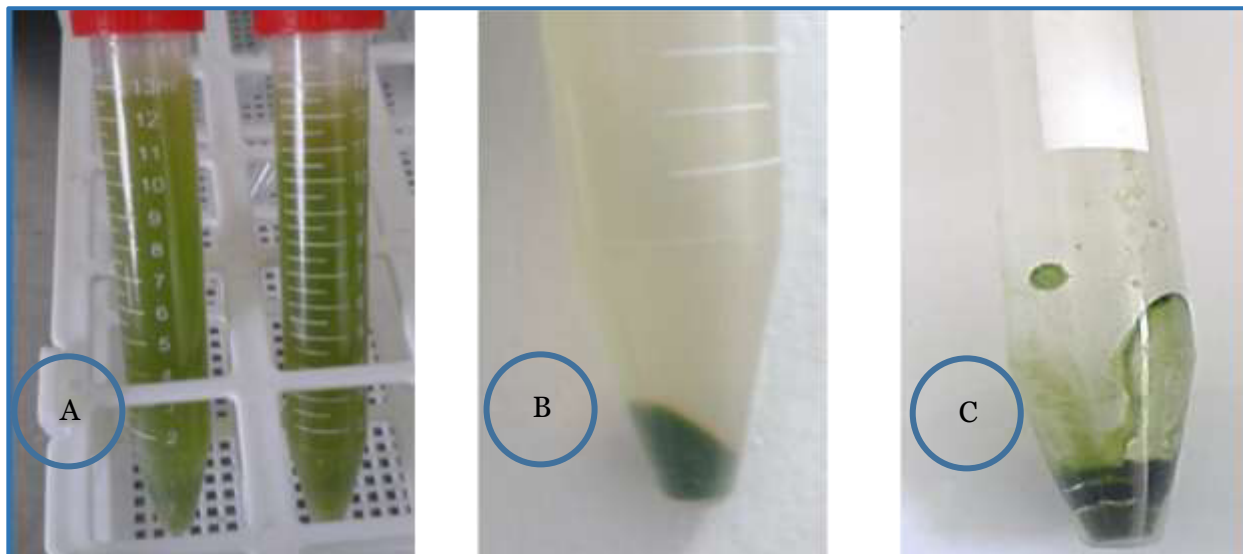
Se prepararon unas láminas de papel aluminio en forma de cuadrado de unos 10cm x 10 cm (allí fueron colocados las microalgas). Las microalgas que se encontraban concentrados en los tubos, se vertieron en el papel aluminio y, se esparció con una espátula por todo el papel. El papel

aluminio con la muestra de microalga centrifugada fue llevado a la incubadora de la marca FAITHFUL modelo DH4000BII a menos de 40°C por un lapso de 2 a 3 horas. Una vez seco y frío la muestra; se retiró la microalga del papel aluminio y fue colocado en un mortero para ser triturado. Se recolecto en un frasco ámbar y, se almaceno en donde no exista mucha presencia de luz para evitar su degradación.

En la cosecha por **filtración**, se dejó en reposo al cultivo de microalgas para que los reactivos que no se hayan diluido se vayan al fondo de la base del frasco. Se utilizó una botella limpia (para la recolección del líquido), donde se colocó un embudo con una malla de fitoplancton y se procedió al vaciado del cultivo para ser filtrado, evitando que se remueva el sustrato de la base del cultivo (por los reactivos que no se diluyeron en su totalidad). La muestra filtrada en la malla se escurrió con la mano para así tratar de sacar toda el agua que contenía. Luego se lavó con abundante agua y se termina por dar una última enjuagada con agua destilada y se volvió a escurrir.

Con una espátula se retiró las microalgas de la malla fitoplanctónica y se colocó en láminas de papel aluminio esparciéndose por todo la base del papel. El papel aluminio con la muestra de microalgas fue colocado en la incubadora de la marca FAITHFUL modelo DH4000BII a menos de 40°C por un lapso de 2 a 3 horas. Una vez seco y frío la muestra, se comenzó a recolectar las láminas de microalgas del papel aluminio, luego se colocaron en un mortero para que se triture en partículas más pequeñas. Por último, se procedió a su encapsulación, donde fueron colocados en un frasco para su posterior almacenamiento.

Si las muestras antes mencionadas, son requeridas para un estudio de investigación, hay que evitar el proceso de secado de las microalgas.

**Figura 29***Centrifugación*

*Nota.* (A) Muestra de microalgas. (B) Muestra centrifugada a 3500 RPM. (C) Separación del líquido sobrenadante. Tomado de *Muestras de cultivo*, por Mera, 2015, Optimización del proceso de centrifugación para separar biomasa provenientes de microalgas.

### **III. APORTES MÁS DESTACABLES A LA INSTITUCIÓN**

Trabajar en un laboratorio de microalgas ofrece muchas oportunidades para realizar aportes valiosos para el desarrollo de los estudiantes. A continuación, menciono los aportes más destacables:

#### **3.1. Desarrollo de los protocolos**

De los protocolos existentes, se establecieron los más idóneos adaptándolos a la infraestructura y equipos del laboratorio de tal manera que las prácticas cumplan al 100% con el objetivo trazado de tal manera que los alumnos pueden trabajar sin perder los principios de fondo; indicándoles lógicamente la metodología estándar. Esto ayudara a los alumnos a que se desenvuelvan eficientemente cuando se encuentren en un centro de trabajo.

#### **3.2. Guía en los proyectos de investigación**

Se guía a los egresados en el diseño y ejecución de sus proyectos de investigación, como la diferenciación de cepas para la producción de compuestos valiosos (biocombustibles, antioxidantes, etc.). Esto ayuda a los mismos a tomar decisiones sobre sus proyectos. Ver la factibilidad de la ejecución de acuerdo a la logística existente, se les brinda el entrenamiento del uso de equipos que solo se utilizan para investigación.

#### **3.3. Optimización en las condiciones de cultivos**

Se optimizo la mejora de las condiciones de cultivo de microalgas para ser utilizado tanto en la parte académica como en los proyectos de investigación, esto implico hacer ajustes en el manejo del cultivo (pH, nutrientes, luz, temperatura) y desarrollar prácticas que los estudiantes puedan realizar como parte de su aprendizaje, permitiéndoles observar los diferentes factores en el crecimiento de las microalgas.

### **3.4. Desarrollo de las técnicas en el laboratorio**

Se ayudo en la guía de prácticas o manuales a los estudiantes de pregrado para que describan las técnicas en el laboratorio para trabajar con microalgas, esto incluye de cómo preparar medios de cultivo hasta cómo usar equipos como microscopios, etc.

### **3.5. Proponer proyectos de biotecnología**

Proponer y guiar proyectos que relacionen la biotecnología con la sostenibilidad. Por ejemplo, los estudiantes podrían investigar cómo utilizar microalgas para la biorremediación de aguas residuales o cómo las microalgas pueden contribuir a la producción de biocombustibles como alternativa a los combustibles fósiles. Estos proyectos no solo fomentan la investigación, sino que también refuerzan la importancia de la biotecnología en la resolución de problemas ambientales.

### **3.6. Asesoría en el análisis**

Enseñar a los estudiantes a utilizar herramientas analíticas para la identificación y cuantificación de compuestos valiosos en microalgas (proteínas, lípidos, antioxidantes). Esto les permitiría a los estudiantes familiarizarse con técnicas de laboratorio avanzadas.

### **3.7. Presentación de resultados científicos**

Guiar a los estudiantes en la redacción de informes científicos, presentaciones y posters para que puedan comunicar los resultados de sus experimentos y proyectos de investigación de manera clara y profesional. Esto les daría experiencia en la divulgación científica, una habilidad clave en cualquier carrera científica.

#### IV. CONCLUSIONES

- La función específica (de mi trabajo dentro del laboratorio) es en colaborar y ayudar a los estudiantes, egresados e investigadores a desarrollar su proyecto en el laboratorio, siguiendo las pautas y protocolos que se encuentran establecidos para obtener un buen resultado.
- Al trabajar en un laboratorio, donde se manejan cepas a nivel unicelular debemos tener precaución de la contaminación, por eso es importante el manejo de los protocolos con respecto a la limpieza e higiene del personal y de los materiales y equipos que se usan, donde todo tiene que estar desinfectado y/o esterilizado.
- Tenemos que tener en cuenta que cada especie tiene diferentes características y por eso es necesario saber que requerimientos se van a realizar, así, por ejemplo, los reactivos que se van a emplear tienen que tener un alto grado de pureza para evitar un costo negativo en la preparación de los medios de cultivo.
- En la etapa de aislamiento, repique, siembra y/o cultivo, el personal que realiza dicho trabajo, tiene que tener las precauciones (como se dijo en un principio) de tener todo desinfectado y/o esterilizado y de tener un principio y un final (orden) para evitar equivocaciones y/o errores.
- Al tener especies diferentes en un cepario, el cuidado que se realiza es revisando periódicamente la fuente de luz (intensidad de luz y temperatura), porque cada especie tiene sus propias características y necesidades.
- Cuando realizamos cultivos de diferentes especies, tenemos que tener en cuenta varios puntos a tomar, esto se realiza con un registro donde anotamos pH, temperatura, oxígeno y principalmente un conteo celular de la cepa. El conteo celular nos indicara en qué fase se

encuentra la especie y en qué momento debemos realizar el repique para la siguiente siembra.

- En general, en el Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología seguimos los protocolos, para evitar la contaminación del cultivo de microalgas, en el cuidado de la limpieza y desinfección, desde que entramos al laboratorio, al usar los materiales y, enseñando el uso adecuado de los equipos como en el pesado de los reactivos químicos (nutrientes) para la preparación de los medios de cultivo y así evitar un doble gasto que puede ocasionar pérdidas económicas al empresario acuicultor.

## V. RECOMENDACIONES

- Tener presente que, cuando se realiza el repique de microalgas, debemos colocar las fechas que se da inicio en cada cultivo, para evitar la confusión y pérdida de la cepa de la microalga.
- En cada proceso siempre hay que tener en cuenta el previo lavado y desinfección de las manos y la mesa de trabajo, para evitar la contaminación del cultivo.
- Ampliar el espacio del laboratorio para evitar riesgos de romper algún material y/o equipo por el personal técnico, docente y/o alumnos.
- Separar el ambiente del desarrollo de clase con los medios de cultivos (cepas).
- Ampliar el ambiente de almacén, creando un ambiente exclusivo para reactivos (insumos químicos), otro para equipos y materiales y, un área para investigación.
- Una ubicación óptima de un Laboratorio de Cultivos Menores y Ficología sería una zona cercana a un ambiente acuático.

## VI. REFERENCIAS

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo Paredes, P., Torres, E., y Herrero, C. (1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Arredondo, B., y Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En B. Arredondo y D. Voltolina (Eds), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 17-25). <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1403>
- Band, C. (2007). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. En B. Arredondo y D. Voltolina (Eds), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 1-16). <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1403>
- Delgado, C. (2020). *Uso de microalgas en la industria farmacéutica*. [Tesis de pregrado, Universidad de La Laguna]. Repositorio Institucional ULL: <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/21691>
- Fernández, J. (2014). *Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas*. Universidad de Almería. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/index.html>
- Guiry, M. y Guiry, G. (2023). *AlgaeBase*. Universidad de Galway. <https://www.algaebase.org>
- Hernández-Pérez, A. y Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49 (2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Herráez, Á. (2023). *Recuento celular: determinación de la concentración de células en una suspensión*. [Imagen]. <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/hemocitometro.htm>
- Libkind, D., Tognetti, C., y Moliné, M. (2014). *Curso teórico-práctico sobre microscopía y recuento de levaduras para productores de cerveza*. [Diapositiva]. <http://www.somoscervecedores.com/wp-content/uploads/2014/11/Teorica-Curso-Microscopio-La-Plata-2014-V5.pdf>

- Lora, M., Virgen, M., López, F., Arredondo, B. y Murugan, G. (2016). ¿Conservar fitoplancton vivo? Cepario de microalgas del CIBNOR. *Recursos naturales y sociedad*, 2(2), 40-55.  
doi:<https://doi.org/10.18846/renaysoc.2016.02.02.02.0003>
- Mera, S. (2015). *Optimización del proceso de centrifugación para separar biomasa proveniente de microalgas* [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Institucional UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3790/1/T-UCE-0017-104.pdf>
- Moreno, J., Medina, C. y Albarracín, V. (2012). *Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas*. [Ilustración]. Universidad Nacional de Tucumán.  
<https://es.scribd.com/document/482455085/CONTEO-DE-PLANCTON-pdf>
- Organización Mundial de la Salud (2008). *Manual de bioseguridad en el laboratorio*.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl085-6c.pdf>
- Oscanoa, A., Tenorio, C., Ynga, G., Flores, L. y Aguilar, C. (2018). *Instructivo para producción de biomasa microalgal de cepas nativas del género Desmodesmus colectadas en zonas altoandinas del Perú*. Instituto del mar del Perú.  
<https://repositorio.imarpe.gob.pe/handle/20.500.12958/3442>
- Torres, B. D., y Correa, D. (2008). *Diseño conceptual de un proceso de cultivo y obtención de Cyanobacteria *Arthrospira platensis** [Tesis de pregrado, Universidad EAFIT]. Repositorio Institucional Universidad EAFIT.  
[https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/393/BernardoDavid\\_TorresUrango\\_2008.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/393/BernardoDavid_TorresUrango_2008.pdf?sequence=3&isAllowed=y)

Urbano, T. (2019). *Cultivo de microalgas: en que consiste, métodos y ventajas.*

<https://agrotendencia.tv/agropedia/agropedia/acuicultura/el-cultivo-de-microalgas/>

Vargas, J. (1997). *Cultivo de moluscos* [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Federico

Villarreal

Vásquez, N. y Chávez, H. (2010). *Protocolo cultivo de microalgas.* Fondo nacional de desarrollo

pesquero. <https://rnia.produce.gob.pe/wp-content/uploads/2019/09/Protocolo-de-Cultivo-de-Microalgas.pdf>

## VII. ANEXOS

### Anexo A

**Aislamiento.** -Es obtener cultivos monoespecíficos a partir de un solo individuo (célula, filamento o quiste), que en este caso se definen como cultivos clonales, o iniciados con varios individuos de la misma especie.

**Axénico.** - Biol. Dicho de un cultivo o de un microorganismo que se desarrolla en un ambiente donde no hay ningún otro organismo vivo.

**Centrifugación.** - Es una técnica de separación que se utiliza para aislar o concentrar partículas suspendidas en un líquido aprovechando la diferente velocidad de desplazamiento según su forma, tamaño o peso al ser sometidas a una fuerza centrífuga.

**Cepa.** - Grupo de microorganismos, que pertenecen a la misma especie y comparten ciertas características que no se encuentran en otros miembros de la especie.

**Cepario.** - Los ceparios o colecciones de microorganismos, son fuentes de recursos genéticos cuyo propósito es la preservación de la diversidad biológica, garantizando su disponibilidad para actividades de docencia, investigación y comerciales.

**Contaminación.** - Cuando en un entorno ingresan elementos o sustancias que normalmente no deberían estar en él y que afectan el equilibrio del ecosistema.

**Cosecha.** - Extracción de microalgas del recipiente de cultivo una vez que han alcanzado una densidad deseada.

**Cultivo.** - El cultivo es el crecimiento microbiano en un medio nutritivo sólido o líquido; el aumento del número de microorganismos facilita su identificación.

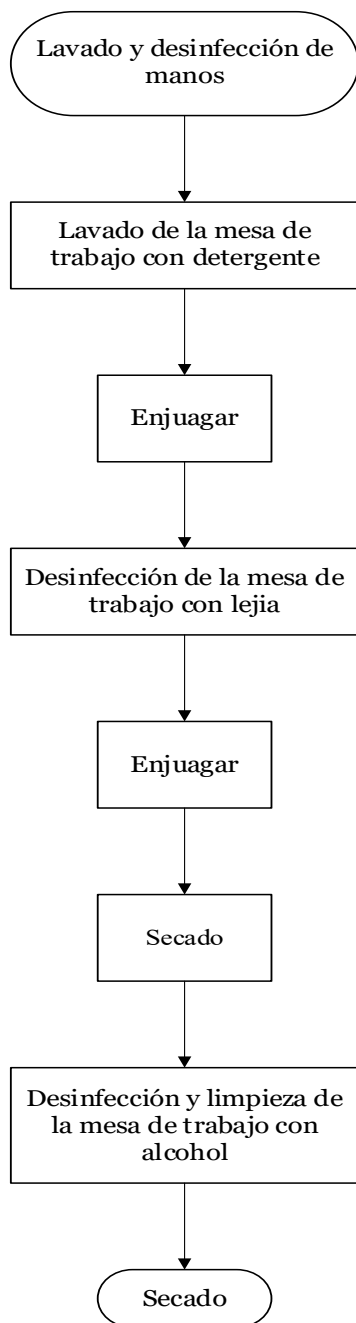
**Inóculo.** - Conjunto de microorganismos que se agregan a un medio de cultivo para su crecimiento.

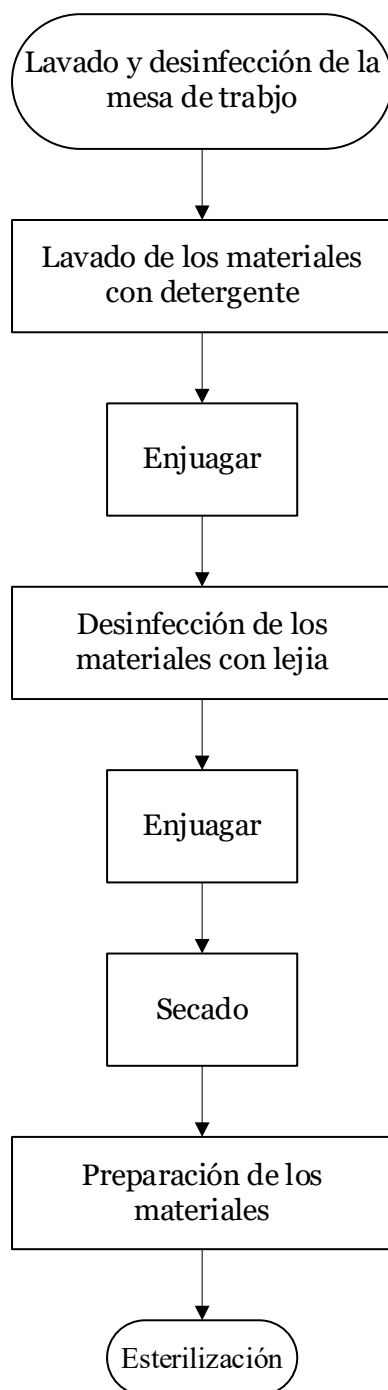
**Microalgas.** - Organismos microscópicos unicelulares, capaces de convertir la energía solar en energía química por medio de la fotosíntesis. Contienen numerosos compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados para uso comercial.

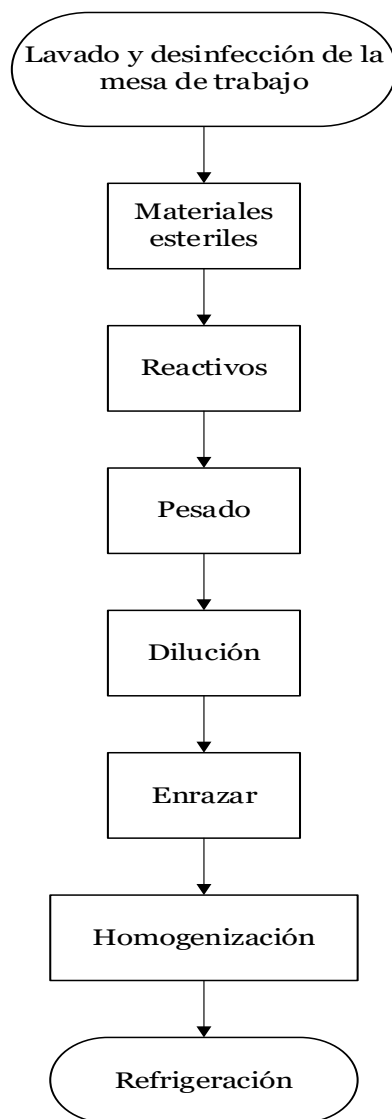
**Millipore.** - Un filtro Millipore elimina las partículas no deseadas de un líquido o concentra las partículas deseadas del líquido. Estas partículas pueden ser materia inorgánica como polvo o materia orgánica como bacterias. Además del procesamiento de fabricación, los filtros se utilizan en pruebas de laboratorio de microbiología y química. El aire también se puede muestrear utilizando filtros Millipore. Los filtros varían en diámetro desde 13 milímetros (mm), o 0,5 pulgadas, hasta 293 mm (11,5 pulgadas) y están hechos de materiales como nitrocelulosa o polietersulfona. Cada tipo tiene un tamaño de poro específico, lo que evita que las partículas de cierto tamaño atraviesen el filtro. El tamaño de los poros varía desde 0,2 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) hasta 12  $\mu\text{m}$ . Un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  atrapa las bacterias y los tamaños de poro más pequeños se utilizan para las muestras químicas. Los tamaños de poro más grandes son adecuados para los pasos de fabricación que no necesitan eliminar los microbios del líquido. Los analistas de laboratorio de microbiología generalmente usan un filtro Millipore en forma de membrana delgada en las pruebas de muestras. Estas membranas delgadas generalmente son estériles y solo se usan una vez. Se colocan en equipos especializados, como embudos de filtración, se retiran cuando se extrae toda el agua y se prueban. Otro uso de un filtro Millipore es en forma de cápsula o cartucho. Esta es una carcasa que tiene una membrana en su interior. Es posible que el filtro no sea estéril, pero puede ser lo suficientemente resistente para sobrevivir a un proceso de esterilización en un autoclave si es necesario. Pueden usarse para reducir la contaminación de un líquido o para esterilizar el líquido y son una parte importante de la filtración de materias primas y productos en el proceso de fabricación.

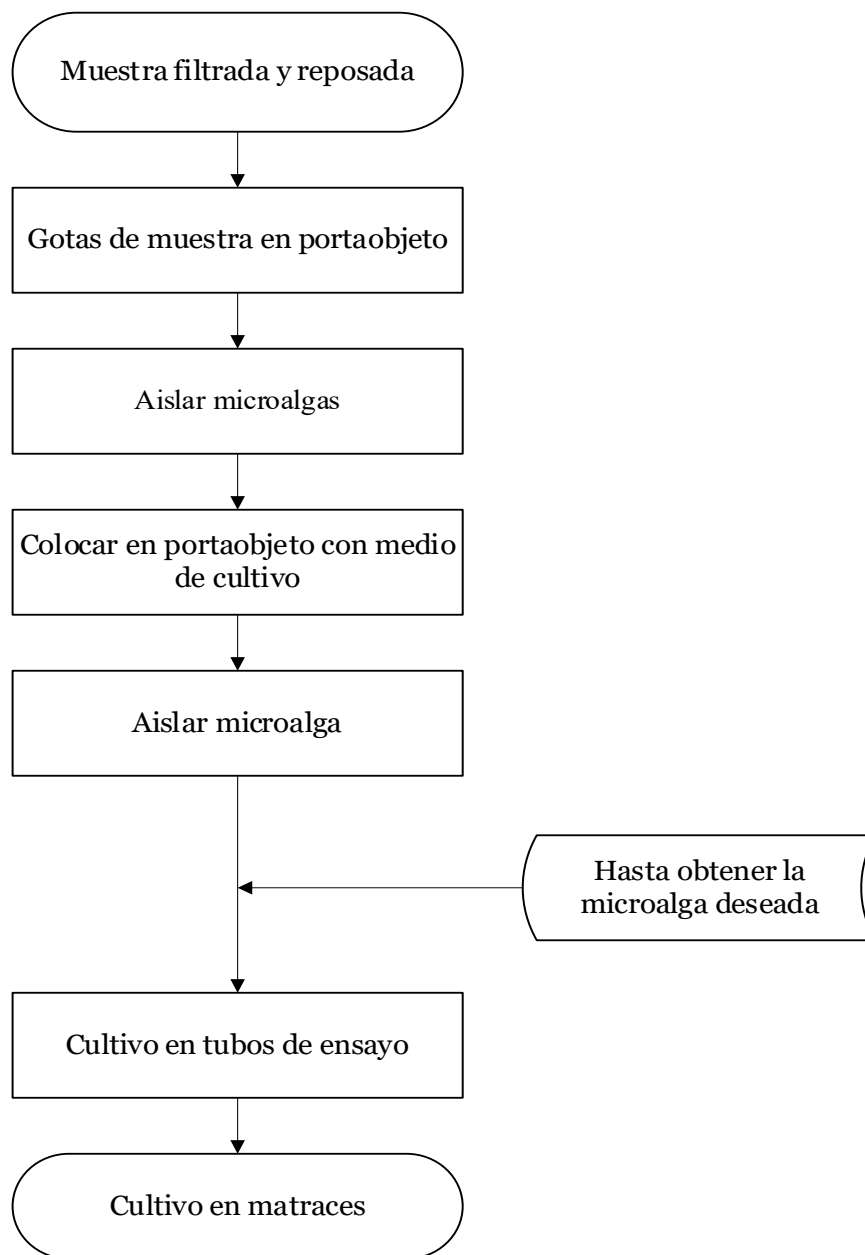
**Raceway.** - Los sistemas "raceways", también conocidos como sistemas de flujo continuo, se emplean en cultivos intensivos, ya que cuentan con un flujo rápido de agua, que permite mantener una biomasa elevada de organismos y un recambio de agua continuo.

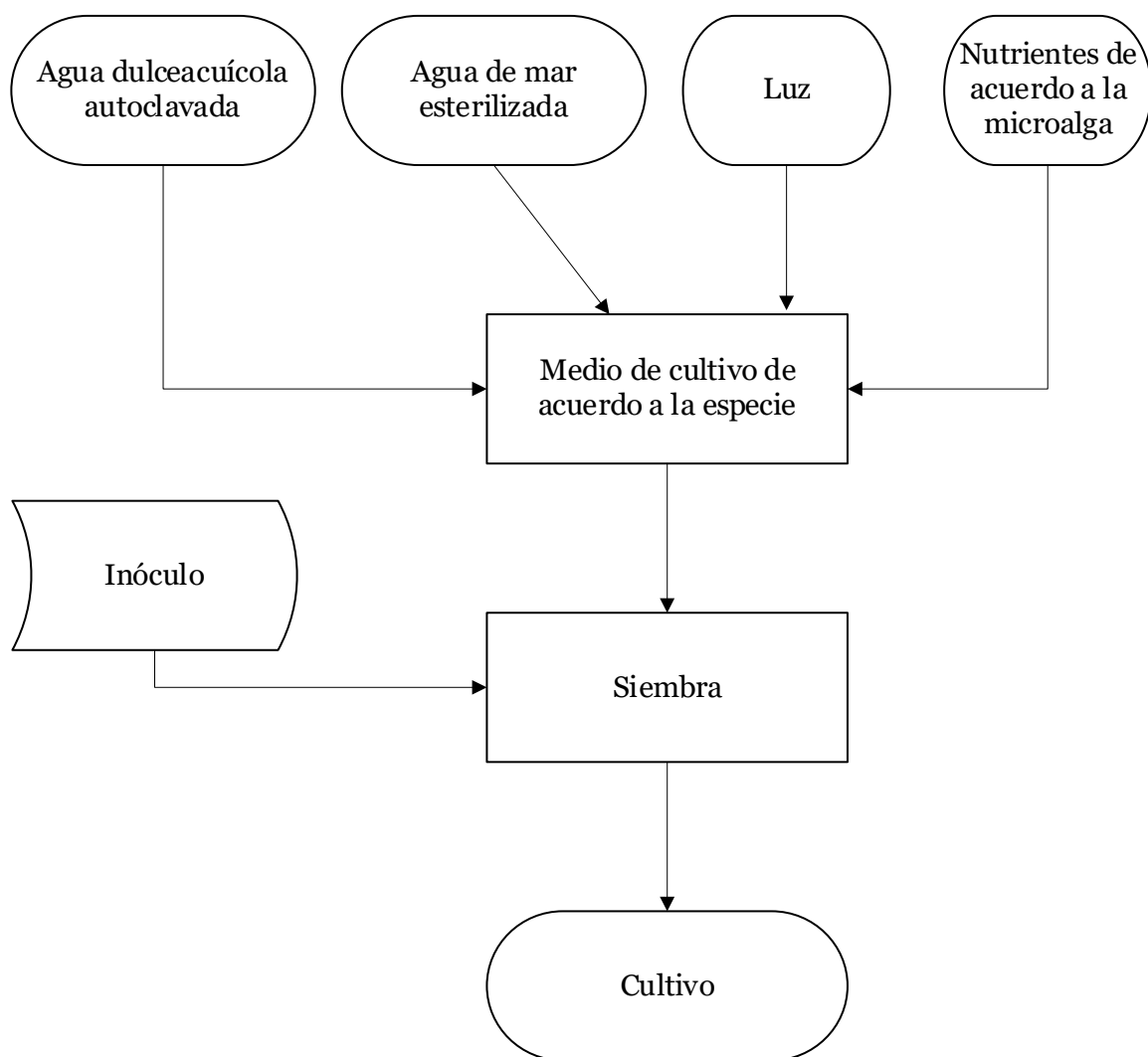
**Siembra.** - Introducción de un concentrado conocido de volumen microalgal (inóculo) a recipientes con medio líquido. Esto marca el inicio de la etapa de cultivo.

**ANEXO B*****Limpieza y desinfección de la mesa de trabajo***

*Esterilización de materiales*

*Preparación de reactivos*

*Aislamiento de microalga. Medio liquido*

*Cultivo de microalgas*

**ANEXO C***Equipos del laboratorio de Cultivos Menores y Ficología*

Destilador



Autoclave



Estufa

Refrigeradora



Balanza Analítica

Microscopio



Incubadora

Centrifuga

**ANEXO D***Otros*

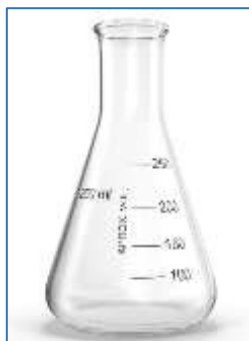
Cámara de Neubauer



Refractómetro

**ANEXO E***Materiales de vidrio*

Beaker de 50 mL



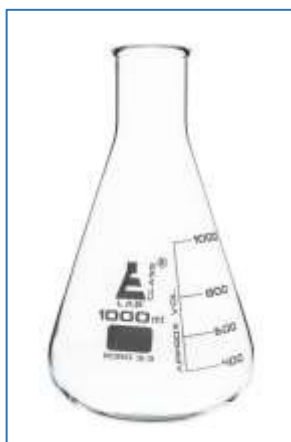
Matraz de 250 mL



Fiola de 100 mL



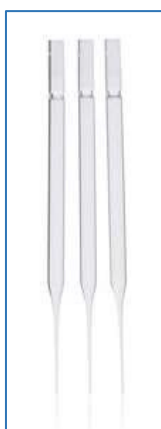
Beaker de 1000 mL



Matraz de 1000 mL



Fiola de 250 mL



Pipeta Pasteur



Pipetas de 1, 2, 5 mL

Bagueta



Mechero de alcohol

Embudo



Tubos de ensayo

Porta objeto

Cubre objeto

**ANEXO F***Materiales de plástico*

Pizeta



Propipeta

**ANEXO G***Reactivos químicos*

## ANEXO H

### *Materiales de limpieza y desinfección*



## ANEXO I

*Otros*



**ANEXO J*****Limpieza y desinfección de la mesa de trabajo***

Limpieza de las manos



Lavado de la mesa con detergente



Enjuague de la mesa con agua



Agregando lejía a la mesa



Enjuague de la mesa



Secado de la mesa



Agregando alcohol a la mesa



Esparciendo el alcohol con algodón

*Limpieza, desinfección, secado y esterilizado de materiales de laboratorio*



Lavando el material con detergente



Enjuagando con abundante agua



Preparando la solución de lejía con agua



Colocando los materiales a la solución



Dejando reposar por 3 min



Eliminando la solución



Enjuagando con abundante agua



Enjuague final con agua destilada



Colocando los materiales a la estufa



Secando los materiales a 150°C



Envolviendo los materiales para su siguiente proceso





Preparando tapón de algodón para los tubos



Envolviendo los tubos de ensayo con papel aluminio

## Preparación del tapón de algodón para los matraces







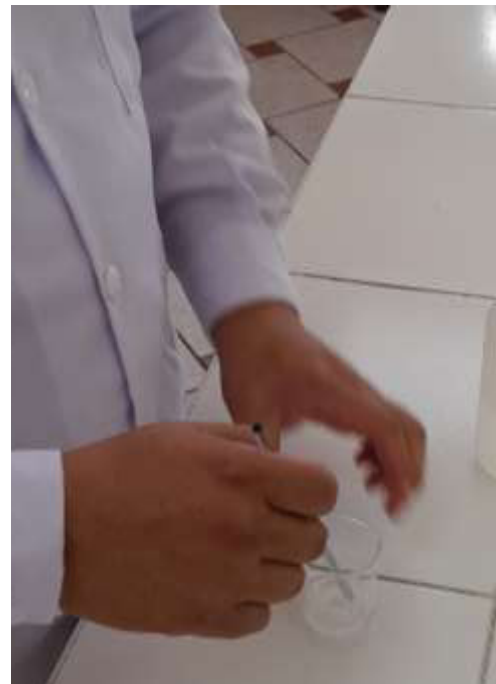


Cubriendo el matraz con papel aluminio



Colocando los materiales en la estufa para su esterilización a 200°C

*Preparación de medios de cultivo*





Agregando a la fiola



Enjugando el beaker



Enrazando



Homogenizando



Reactivos listos para su refrigeración

*Medio de cultivo*



Flameo del material de vidrio



Agregando el medio liquido esterilizado



Agregando los reactivos al medio liquido





Flameando el matraz



Agregando el medio preparado al matraz



*Siembra*

Flameando los matraces de cepa y el medio



Sembrando



Flameando las bocas de los matraces



Cepario