

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Estandarización de Técnicas de Análisis para el
Seguimiento del Crecimiento de la Microalga
*Chaetoceros muelleri***

Tesis Profesional Práctica

Que para obtener el título de:
Químico Biólogo Clínico

Presenta:
Astrid Alexis Salazar Rodríguez

Hermosillo, Sonora

6 de Septiembre 2016

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional Práctica de Astrid Alexis Salazar Rodríguez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez
Presidente

M.C. María Guadalupe Cañez Carrasco
Secretario

Dra. Esther Carrillo Pérez
Vocal

Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor

A mis padres por toda su comprensión y apoyo para poder culminar este proyecto tan importante en mi vida, siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad; Se lo que significó para ellos, pero creo que valió la pena el esfuerzo.

A mis hermanos, quienes entendían en mayor o menor medida lo que estaba haciendo, pero espero que sea para bien de ellos y que vean como a pesar de resultar difícil el camino, llegamos a lo que queremos y no importa que nos demos de tropiezo, volvemos a levantarnos, quizá un poco desorientados, pero lo hacemos cuantas veces sea necesario hasta llegar a esta parte, que en realidad es apenas el inicio a muchas cosas que nos esperan.

Al Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez por todas sus enseñanzas y apoyo incondicional y enseñanza tanto profesional como personalmente, por las revisiones, ideas, correcciones y demás cosas hechas a este trabajo, además de ser la persona que me inicio en esta área.

Gracias

A mi comité de tesis: Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez, Dra. Esther Carrillo Pérez, M.C María Guadalupe Cañez Carrasco y al Dr. Eduardo Ruiz Bustos, por todas sus observaciones y sugerencias durante el trayecto de este trabajo de tesis.

A mis compañeros de laboratorio por darme una mano cuando necesitaba ayuda, y a todos los que de una forma u otra estuvieron conmigo.

A mis compañeros de generación con quienes logre además de un trabajo en equipo, una gran amistad por la paciencia que tuvieron en escucharme o compartir momentos conmigo.

A la Universidad de Sonora por haberme permitido desarrollar mis estudios de Químico Biólogo Clínico y a los maestros, aquellos que marcaron cada etapa de mi camino universitario.

DEDICATORIA

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
General	4
Particulares	4
REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
Cultivo de Microalgas	5
Consideraciones Generales	5
Requerimientos Físico-Químico	6
Sistemas de Cultivos	10
Cultivo estático	10
Cultivo semicontinuo	12
Cultivo continuo	12
Cultivo masivo	13
Medio de Cultivo para microalgas	13
Hematocitómetro o cámara de Neubauer	15
Densidad óptica	17
Volumen celular	17
Validación de Métodos Analíticos	17
Exactitud	18
Precisión	18
Linealidad del Método	19
Sensibilidad	20
Límite de detección	20
Límite de cuantificación	21
Especificidad	21
Repetibilidad	21
Repetibilidad en exactitud	21
Reproducibilidad	22
Recuperabilidad	22

Robustez	22
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Descripción General del Trabajo	24
Materiales y Reactivos	25
Microorganismo	25
Medio de Cultivo	25
Preparación del Inóculo	27
Preparación del Medio para el Cultivo	29
Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactor	30
Técnicas Analíticas del Cultivo	32
Concentrado de Microalgas	32
Medición Espectrofotométrica	32
Cuenta Directa al Microscopio	35
Obtención de Peso Seco	35
Estandarización del Experimento	35
Parámetros de las Cinéticas de Crecimiento	37
Validación del Experimento	37
Análisis Estadístico	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Estandarización de Métodos Analíticos	38
Determinación de Rango Lineal	41
Correlación de Densidad Óptica con Conteo Celular y Peso Seco	42
Cinética de Crecimiento	47
Validación de Métodos Analíticos	52
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Principales requerimientos	9
2.	Medio de Guillard F/2	26
3.	Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>C. muelleri</i>	52
4.	Exactitud y precisión del método estandarizado	53

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de cultivo de volumen limitado	10
2. Esquema de la cámara de conteo Neubauer	16
3. Cuadrantes de la cámara de conteo	16
4. Diagrama de flujo para la propagación del inóculo de <i>Chaetoceros muelleri</i>	28
5. Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo	29
6. Preparación del cultivo de <i>Chaetoceros muelleri</i>	30
7. Cultivo de microalgas en fotobiorreactor instrumentado	31
8. Diagrama de flujo para la medición de densidad óptica de <i>Chaetoceros muelleri</i>	33
9. Diagrama de flujo para el conteo celular de <i>Chaetoceros muelleri</i>	34
10. Diagrama de flujo para determinar peso seco de <i>Chaetoceros muelleri</i>	36
11. Correlación entre densidad óptica experimental y densidad óptica teórica	38
12. Correlación entre concentración celular y densidad óptica experimental	39
13. Correlación entre peso seco y densidad óptica experimental	40
14. Rango lineal de trabajo	41
15. Correlación entre conteo celular y densidad óptica	42
16. Correlación entre peso seco y densidad óptica	43
17. Correlación entre concentración celular y densidad óptica del método estandarizado	44
18. Correlación entre concentración celular y densidad óptica del método no estandarizado	45
19. Correlación entre peso seco y densidad óptica	46
20. Correlación entre peso seco y concentración celular	47
21. Seguimiento del cultivo de la microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> en un foto-biorreactor a diferentes tiempos	48
22. Cinética de crecimiento de la microalga <i>C. muelleri</i> ajustada del método experimental y del método no estandarizado	49
23. Cinética de crecimiento de la microalga <i>C. muelleri</i> ajustada del método experimental y del método estandarizado	49
24. Cinética de crecimiento de la microalga <i>C. muelleri</i> ajustada	50

RESUMEN

El cultivo de microalgas es primordial para la acuicultura, debido a que son las que principalmente contribuyen a la producción de biomasa en los estanques de cultivo de camarón. En este trabajo se establecieron técnicas analíticas confiables para el seguimiento de la cinética de crecimiento en la producción de la microalga *Chaetoceros muelleri*. Los cultivos de microalgas se monitorearon siguiendo dos estrategias: No Seguimiento, en la cual se realizaron conteos al microscopio al momento de la cosecha y se obtuvieron alícuotas para la determinación de biomasa seca; y de Seguimiento, la cual consistió en medir la densidad celular diariamente, con el fin de estimar el crecimiento y la tasa de reproducción. Se correlacionó la concentración celular (cel/mL) con la densidad óptica, encontrando una relación lineal ($R=0.979$; $R^2 =0.8981$). De la misma forma al correlacionar peso seco con densidad celular (cel/mL) se encontró una relación lineal ($R^2=0.9363$). Con los modelos lineales obtenidos se estimó la concentración celular para el seguimiento de una corrida experimental de producción de biomasa en un fotobiorreactor. Se obtuvieron los parámetros cinéticos para el crecimiento de la microalga ajustando los datos experimentales por medio de regresión no-lineal a un modelo logístico para el crecimiento celular. El método estandarizado fue validado por comparación con los parámetros cinéticos obtenidos por medio de los datos experimentales. Al utilizar estas técnicas analíticas, así como las ecuaciones obtenidas se puede facilitar el seguimiento del proceso de producción industrial de la microalga *C. muelleri*.

INTRODUCCIÓN

Los océanos fueron considerados fuente ilimitada de recursos, capaces de alimentar a la población mundial. Sin embargo, la demanda se ha elevado a tal grado que supera significativamente el aporte de especies biológicas o de nutriente a los mares. La organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) señala que la industria alimentaria es la que ha tenido mayor auge, y la de mayor crecimiento en los últimos años (11%) contribuyendo a cubrir y solventar la demanda que ya no puede satisfacer la pesca mundial (Mathiesen, 2012). Por tal motivo, el cultivo de organismos acuáticos se ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas.

El desarrollo de la acuicultura ha requerido producir grandes volúmenes de microalgas para satisfacer las necesidades alimenticias para la producción comercial de larvas de camarón. Sin embargo, la alimentación en los cultivos de camarón, es el costo más elevado llegando a representar hasta dos terceras partes de los costos de producción de las granjas acuícolas (Aznay y col., 2006; Coll, 1983). Esto ha llevado a desarrollar diversas tecnologías que han diversificado los costos de producción.

Las microalgas son organismos abundantes, de las cuales el ser humano ha obtenido provecho desde la antigüedad y cuya aplicación en toda clase de actividades industriales, tecnológicas, alimentarias, ecológicas, médicas y hasta cosméticas es una realidad en nuestros días (Bolaños, 2008). La producción de microalgas para la alimentación de las larvas de camarón en los laboratorios comerciales del noroeste de México, está basada en un número reducido de especies. Las especies más importantes son las diatomeas céntricas *Chaetoceros* spp., con una concentración media cercana a 1×10^6 cel/mL y con una producción de biomasa orgánica altamente variable y excelente valor nutricional (Muller-Feuga y col., 2003). Debido al elevado valor nutricional de las diatomeas, éstas constituyen un eslabón importante en la alimentación de diferentes organismos marinos, por lo que son utilizadas ampliamente en el desarrollo de cultivos marinos (Campaña-Torres y col., 2010; López-Elías y col., 2004). También se ha incrementado su uso en las industrias biotecnológicas, motivado por la gran diversidad de metabolitos de alto valor industrial (pigmentos, ácidos grasos y bioactivos) procedentes de estos microorganismos (Wijffels y col., 2013).

Existen diferentes medios de cultivo para microalgas cuyos componentes contribuyen de manera significativa al elevado costo de su producción, por lo que se impone la búsqueda de medios más eficientes para hacer más rentable esta actividad (Chisti, 2007; Singh y col., 2014). Una solución a este problema se fundamenta en el conocimiento, optimización y automatización

de los sistemas de cultivo de fitoplancton, para lograr llevarlos a niveles masivos de producción y así obtener altas concentraciones de diatomea disminuyendo el tiempo de cultivo y por lo tanto el costo de producción. Los estudios de microalgas se utilizan principalmente debido a que se pueden estudiar bajo condiciones definidas y reproducibles (Aznay y col., 2006; Ungsethaphand y col., 2007; Vásquez-Suárez y col., 2013).

El conocimiento y control de los parámetros analíticos en los cultivos es muy importante, ya que permiten monitorear la supervivencia y el desarrollo de los organismos en el cultivo, además de conocer ciertos factores físico-químicos que regulan la concentración y calidad de estos mismos. Sin embargo, es necesario promover el uso de la bioestadística en la Acuicultura para que la generación de nueva información haga más rápido y eficiente el desarrollo de nuevos procesos. La industria debe, además, incorporar rápidamente programas informáticos especializados y apropiados para el manejo de este tipo de información. Por tal motivo, se requieren de técnicas confiables para el seguimiento del crecimiento de las microalgas que faciliten el trabajo de producción. Por lo anteriormente expuesto, este trabajo pretende aportar una contribución para lograr una producción sostenida a largo plazo, correlacionando los parámetros analíticos de crecimiento, que permitan determinar la concentración celular, por lo que se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

General

Estandarizar técnicas analíticas para el seguimiento del crecimiento de una microalga de interés biotecnológico.

Particulares

1. Establecer el rango lineal de trabajo para el conteo celular y densidad óptica celular.
2. Obtener suficiente biomasa para el análisis de peso seco.
3. Correlacionar las mediciones de densidad óptica celular con el conteo celular y peso seco.
4. Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri*.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Cultivo de Microalgas

Las microalgas o *Chlorophyta* están formadas por Cianobacterias, las cuales, al ser de los primeros organismos que existieron en la tierra se podría pensar que son organismos básicos, pero estas microalgas son organismos unicelulares anucleados y autótrofos; capaces de realizar fotosíntesis en condiciones de efecto invernadero extremas (altas concentraciones de metano y CO₂ en la atmósfera). Estas microalgas son las que en mayor medida contribuyen a la producción de biomasa en los océanos, estuarios, lagos y reservorios. La posición de estos organismos dentro de las redes tróficas forma los pilares o bases de éstas debido al aporte de energía de las biomoléculas sintetizadas por éstos. Es así como, hasta el momento estos microorganismos no se han podido sustituir como fuente nutricional para cualquier organismo en cultivo (Hoff y col., 2008).

Estas microalgas tienen ritmos circadianos (actividades que realiza un ser vivo de día y de noche reguladas por un “reloj biológico”), por lo que durante el día realizan fotosíntesis y durante la noche fijan nitrógeno, el cual es su fuente de alimento. Esta fijación del nitrógeno consiste en reducir el nitrógeno a amonio, por medio de la enzima nitrogenasa, la cual realiza, en condiciones ambientales normales. En cambio este compuesto puede ser obtenido por medio de una reacción química no biológica a altas temperaturas y a elevadas atmósferas de presión reduciendo el N₂, el cual usan para sintetizar proteínas y así nutrirse ellas mismas (autótrofas). Si se analizan estas características, podemos ver la gran importancia de las microalgas; primero que todo, el hecho de que sean fotosintéticas, ya que a partir de agua, luz solar y CO₂ producen oxígeno (Del Mar, 2005; Hors, 2011). Gracias a esta capacidad, las microalgas no sólo se nutren, sino que ayudan a la detoxificación de la atmósfera ya que se ha descubierto que esta enzima existía desde los inicios de la vida y que hizo cambiar la atmósfera.

Consideraciones Generales

Durante muchos años se han estudiado a las microalgas y técnicas para su cultivo, tratando de mantener las condiciones lo más cercano posible a las establecidas por la naturaleza. Los primeros cultivos realizados fueron llevados a cabo bajo condiciones estáticas. Sin embargo, son muchos los factores que contribuyen para obtener un desarrollo óptimo de los cultivos de microalgas, algunos de éstos afectan las características del crecimiento.

Para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo, son necesarios: inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos, adecuadas condiciones químicas, físicas (luz, aireación, temperatura, salinidad) y energía.

Los recipientes de cultivo más comúnmente usados son de materiales no tóxicos como las cajas de Petri, matraces Erlenmeyer, matraces Ferenback o garrafas, etc., adecuados para cultivos de laboratorio. Para cultivos a gran escala los recipientes de plástico, madera y concreto son los más recomendables, incluyendo los estanques rústicos en áreas rurales que son los sistemas más económicos (Torrentera y col., 1989).

Requerimientos Físico-Químicos

En cultivos masivos la aireación es un factor muy importante para la homogenización de los nutrientes y para evitar la sedimentación de las microalgas. Las diatomeas suelen acumularse en lugares donde el agua no se mezcla, lo que se ve influenciado por la forma del recipiente de cultivo que cuando no es adecuado retarda el crecimiento.

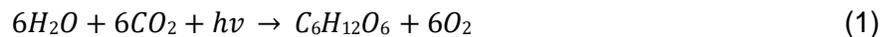
Al igual que como cualquier otro organismo vivo, las condiciones físicas tienen gran influencia en el crecimiento de la microalga. Cada especie presenta un particular intervalo de temperatura, intensidad de luz, bióxido de carbono y oxígeno para la producción de un máximo crecimiento. También se debe mencionar que más que la influencia de un solo parámetro, es el conjunto de parámetros lo que crea determinadas respuestas en el crecimiento de las microalgas (Chaumont, 1993).

Como parámetros físicos se incluye la penetración de la luz en el cultivo. Las microalgas son fotoautótrofas encargadas de convertir energía luminosa en metabólica por medio de la fotosíntesis, y sus periodos de exposición a ésta pueden ser continuos (mediante luz artificial), discontinuos (periodos de iluminación alternados con periodos de oscuridad, también con luz artificial) o en el ciclo natural de día y de noche (Richmond, 1986). En los cultivos masivos se incrementa la turbidez por el gran número de células presentes, provocando que la intensidad de la luz incidente no alcance hasta el fondo del tanque siendo ésta insuficiente para realizar la fotosíntesis. En los cultivos masivos a la intemperie la penetración de la luz es más efectiva, pero se debe reducir la intensidad de la luz fuerte, cubriendo estos estanques con una malla. En cultivos a gran escala es recomendable la inyección de CO₂ (0.5%) para contribuir al proceso fotosintético (Torrentera y col., 1989).

La fotosíntesis es un proceso llevado a cabo por organismos fotoautótrofos, que tienen la capacidad de sintetizar materia orgánica partiendo de la energía del sol y la materia

inorgánica. La importancia de este proceso no puede ser discutida, ya que la vida en la tierra se mantiene fundamentalmente gracias a la fotosíntesis que realizan las algas en el medio acuático y las plantas en el medio terrestre, ya que éstas introducen los nutrientes minerales en la base de las cadenas tróficas de los ecosistemas, generando materia orgánica que es consumida por organismos superiores (Pérez-Urria, 2011).

Las microalgas, como las cianobacterias y al igual también que las plantas verdes, emplean la energía de la luz del sol para generar un oxidante lo suficientemente potente como para extraer del agua oxígeno, protones y electrones. Los electrones extraídos del agua reducen, en la fase luminosa de la fotosíntesis, el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+) a NADPH. La molécula de NADP+ es una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas, mientras que NADPH es su forma reducida, que interviene en la fase oscura de la fotosíntesis (ciclo de Calvin) donde se reduce el CO₂. El NADPH actúa como transportador de energía, la cual se emplea finalmente para sintetizar macromoléculas orgánicas a partir de moléculas precursoras pequeñas. La estequiometría del proceso fotosintético total, en el que se libera oxígeno molecular, es como sigue:



Donde hv representa la energía lumínica en función de su frecuencia ν y la constante de Planck h . El proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de grupos hidroxilos (OH⁻). En la actualidad se denomina a este proceso fotosíntesis oxigénica (Cantizano, 1990).

Para muchas especies de diatomeas, la temperatura óptima oscila entre los 15 y 20°C, pocas especies de esta familia crecen a más de 28°C, por ejemplo las clorofíceas pueden soportar altas temperatura. Temperaturas bajas en referencia con el intervalo anterior no matan a la microalga, sin embargo puede provocar una disminución de crecimiento; temperaturas arriba de 35°C provocarían que la mayoría de las microalgas colapsaran (Hoff y col., 2008).

El intervalo de salinidad para una microalga dependerá de la especie. Generalmente, en el cultivo a interiores (el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera) este parámetro no es controlado y se maneja la salinidad presente en el agua de mar. En un cultivo a exterior (el cultivo está en contacto con la atmósfera) la salinidad se convierte en el parámetro de control en el crecimiento de la microalga (Abalde y col., 1995).

Dentro de los requerimientos químicos necesarios para un buen crecimiento de las microalgas en cultivo, se encuentran entre otras cosas el balance entre los macronutrientes

específicos y los micronutrientes. Un desbalance en la proporción suministrada de estos nutrientes invariablemente se manifiesta ya sea como un descenso en el crecimiento o hasta el cese del mismo (Hoff y col., 2008).

Por macronutrientes se consideran la fuente de nitratos/fosfatos (NO_3/PO_4) y en el caso de las diatomeas la adición de silicatos. Con respecto a los micronutrientes son aquellos que se requieren en poca cantidad (trazas) en comparación con los anteriores mencionados pero no por ello menos importantes. Se sabe que en soluciones alcalinas algunos metales precipitan agentes quelantes tales como el EDTA (ácido etilendiaminotetracético) que se utilizan para mantener los metales en solución haciéndolos disponibles para las microalgas (Kaplan y col., 1986).

Además de los macro y micronutrientes existen otras sustancias que son requeridas por las microalgas para obtener un mejor crecimiento. La mayoría de las microalgas son auxotróficas, esto es, que no son capaces de sintetizar todas las vitaminas necesarias y tienen que asimilarlas del medio de cultivo. La tiamina (B1), la cianocobalamina (B12) y la biotina (B6) son consideradas esenciales para la mayoría de las microalgas. De hecho se ha estimado que cerca del 70% de todas las microalgas planctónicas requieren de cianocobalamina (Hoff y col., 2008; Spotte, 1979).

La especie *Chaetoceros* se ha utilizado en acuicultura marina dado su valor nutritivo y digestibilidad, además de su capacidad para crecer en cultivos masivos. La duración del ciclo celular así como los requerimientos de temperatura presentan variaciones dependiendo de la variedad de microalga que se seleccione (Mandujano, 2012; Torrentera y col., 1989).

En la Tabla 1 se presentan los principales requerimientos de los cultivos de microalgas y sus valores aproximados. En cada caso, se tendrá que estudiar los requerimientos particulares de la especie y de la variedad que se vaya a cultivar, en las condiciones concretas de cultivo que se va a utilizar, por lo que estos datos son sólo de referencia.

El fotoperiodo es un factor que regula la división celular, en diatomeas la reproducción asexual (división) ocurre durante el período de luz y ésta es acelerada bajo iluminación continua. En contraste las especies formadoras de auxosporas (esporas sexuales), dan lugar a células del mismo tamaño en el período de oscuridad. Por lo tanto, el período de iluminación puede ajustarse de acuerdo a los objetivos del cultivo: el fotoperiodo continuo (horas de iluminación prolongada) produce crecimientos rápidos, un fotoperiodo con horas de luz y oscuridad semejante al fotoperiodo solar mantiene un crecimiento normal y saludable.

Tabla 1. Principales requerimientos de los cultivos de microalgas.

Requerimientos Nutritivos		Requerimientos Físicos	
C	CO ₂ ; CO ₃	Luz	2,000 – 4,000 lux
O,H	O ₂ ; H ₂ O	Temperatura	15 – 22°C
N	N ₂ NH ₄ + NO ₃	Salinidad	0.37%
P	PO ₄	pH	7 – 9
S	SO ₄	Redox	
Na, K, Ca, Mg	Sales		
Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales		
Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al	Sales		
Vitaminas	B12, tiamina, biotina		

Fuente: Adaptada de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (1989).

Además del control de los parámetros antes mencionados, para el establecimiento de un sistema de producción de alimento vivo es importante el dominio de las técnicas de aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas, así como el conocimiento de la fisiología, ciclo de vida, y bioquímica de las especies, para determinar su factibilidad de cultivo y sobre todo su contenido nutricional para poder llevarse a niveles masivos de producción para fines de acuicultura.

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales que permitan resultados constantes, debido a los resultados tan variables que se obtiene con el uso del agua de mar natural que entre otros factores, se ven influidos por el lugar donde se colecta ésta, y el tiempo de almacenamiento de la misma.

Los medios artificiales se usan principalmente para fines experimentales, ya que como se ha mencionado, brindan resultados constantes, aunque existen algunas especies que no crecen en medios artificiales por factores desconocidos. Las principales fórmulas utilizadas van desde el agua de Miguel, que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de End-Schreiber de 1934 hasta fórmulas específicas como la fórmula del Laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas (Hoshaw y col., 1973; Provasoli y col., 1957; Torrentera y col., 1989).

Sistemas de Cultivos

Existen cuatro diferentes métodos para el cultivo de microalgas que son: el cultivo estático, el continuo, el semicontinuo y masivo.

Cultivo estático. El sistema estático consiste en inocular el microorganismo en un volumen dado de medio y permitir que la densidad aumente hasta que un nutriente se vuelva limitante, en este punto el cultivo se cosecha y se empieza uno nuevo, utilizando parte del cultivo viejo o preferentemente uno nuevo (Fox, 1983). El crecimiento de las microalgas en este tipo de cultivos se puede representar gráficamente en la curva descrita en la Figura 1, donde se muestran las siguientes fases:

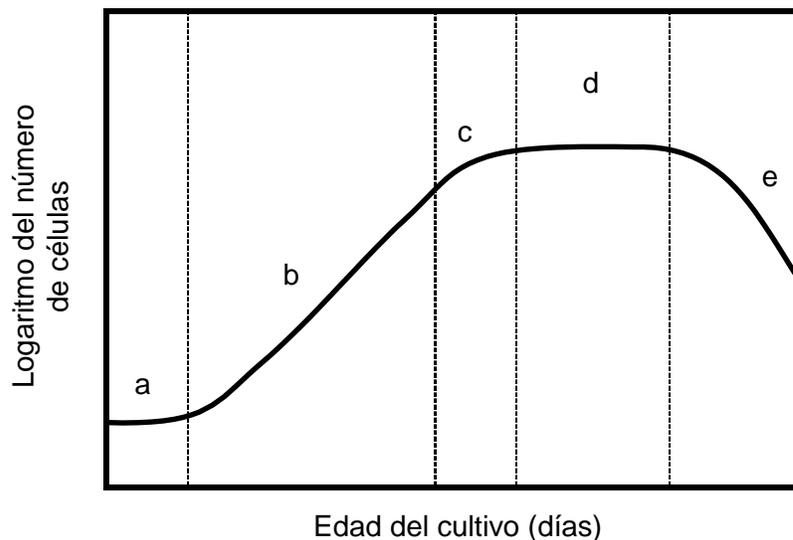


Figura 1. Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de cultivo de volumen limitado; (a) fase de inducción, (b) fase exponencial, (c) fase de declinación, (d) fase estacionaria y (e) fase de muerte. Fuente: Paniagua y col. (1989).

a) Fase de inducción o lag: En esta fase no existe un incremento aparente en el número de células, esto puede deberse a que la mayoría de las células pueden ser viables, pero no están en condiciones de dividirse inmediatamente; si el cultivo de microalgas es viejo, las enzimas pueden estar inactivas y la baja concentración de metabolitos pueden ocasionar un nivel insuficiente de división celular, o también porque es necesario un periodo de reconstitución antes de comenzar el crecimiento. La fase lag también puede presentarse

cuando las células de microalgas son subcultivadas en un medio conteniendo altas concentraciones de alguna sustancia en particular (Fogg y col., 1987; Paniagua y col., 1989).

b) Fase exponencial: La multiplicación celular es rápida y el crecimiento numérico es en progresión geométrica; la fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día, después de inocular el medio de cultivo. Esta fase dura el tiempo necesario hasta que resulte evidente el efecto de algún nutriente limitante.

En esta fase el crecimiento se puede presentar por la siguiente formula:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (2)$$

Dónde:

X = Concentración de biomasa final a cualquier tiempo, cel/mL

X_0 = Concentración de biomasa inicial, cel/mL

μ = Tasa o velocidad específica de crecimiento; h^{-1}

t = Tiempo de cultivo, h

e = Constante del logaritmo natural

Para la obtención de la μ , en la fase exponencial:

$$\mu = \frac{\ln(X_1 - X_0)}{t_1 - t_0} \quad (3)$$

Dónde:

\ln = Logaritmo natural

t_1 = Tiempo de cultivo final

t_0 = Tiempo de cultivo inicial

X = Concentración de biomasa final a cualquier tiempo, cel/mL

X_0 = Concentración de biomasa inicial, cel/mL

A partir de esta fórmula se puede calcular el tiempo de generación (T_G) o de duplicación (T_d):

$$T_G = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

c) Fase de declinación relativo del crecimiento: Esta fase puede durar uno a dos días, empieza a manifestarse un decremento en la velocidad de reproducción de la célula, debido a condiciones desfavorables como la falta de nutrientes, calidad de aireación, luz, temperatura, autoinhibición por la producción de metabolitos tóxicos, etc.

d) Fase estacionaria: El número de células permanece constante. Es el nivel máximo de la producción y depende de la presencia de los factores limitantes mencionados en la fase de declinación del crecimiento.

e) Fase de muerte: Al incrementarse el número de células muertas, el número desfavorable de metabolitos tóxicos, producto de la destrucción celular, genera un colapso al final del cultivo (Fogg y col., 1987; Paniagua y col., 1989).

El método de cultivo estático generalmente es el más utilizado a nivel de investigación ya que da información global del crecimiento de las microalgas (Torretera y col., 1989).

Cultivo Semicontinuo. Consiste en cosechar un menor volumen al del sistema continuo a intervalos regulares, en general determinados por la tasa de crecimiento intrínseco de las microalgas, en las condiciones de cultivo específico; es sucesivamente reemplazado por un volumen igual al cosechado, con medio fresco. Este método es probablemente el más común en los sistemas de producción de microalgas, debido en parte a su simplicidad y también a la costumbre de proporcionar alimento en porciones diarias, debido al hecho de que los organismos filtroalimentadores tienen una actividad de filtración continua.

Cultivo Continuo. De acuerdo a Kubitschek (1970)(Kubitschek, 1970), un cultivo continuo es un sistema de flujo en el cual las células individuales están suspendidas en un volumen constante en un estado de equilibrio dinámico, establecido por una remoción de cultivo y adición de medio nutritivo por unidad de tiempo con tendencia al infinito. Los cultivos continuos se caracterizan por mantener el estado del cultivo en fase de crecimiento logarítmico, manteniendo un flujo de entrada constante de medio de cultivo fresco al biorreactor, de tal manera que los nutrientes no se agoten, de igual manera a la salida se mantiene un flujo de salida igual al de la entrada; este tipo de cultivos son llevados a cabo en equipos llamados quimiostatos (James y col., 1989; Lubzens y col., 2001).

Cuando se requiere de grandes cantidades de células a intervalos frecuentes para alimentar especies en cultivo (peces, crustáceos, moluscos), los cultivos semicontinuos o continuos proveen un gran número de células con mayor consistencia en forma uniforme y constante. En estos cultivos es importante determinar la concentración óptima de los nutrientes por unidad de tiempo en relación a la tasa de dilución o cosecha del cultivo. Cuando se establece el estadio de equilibrio del sistema, la producción es máxima (Torrentera y col., 1989).

Cultivo Masivo. Se considera cultivo masivo a aquellos que se utilizan como alimento vivo de peces, crustáceos y moluscos y cuya producción es a gran escala en tanques u otros recipientes de volumen no controlado.

Existen muchas alternativas para la producción de microalgas en cultivo masivo, desde la utilización de tanques de plástico, madera, concreto hasta los estanques rústicos, así como la utilización de fertilizantes minerales de tipo agrícola hasta una gran variedad de excretas de ganado como fuentes de nutrientes. En relación a la utilización de luz artificial o natural, ésta dependerá del tipo de infraestructura con que se cuente. El control de la temperatura será necesario en relación del tipo de microalga en cultivo y de la región climática en donde se establezca el mismo (Torrentera y col., 1989).

Medio de cultivo para microalgas

La creación de los medios de cultivo tuvo lugar en los años 1890-1893 por un investigador conocido como Miguel (Provasoli y col., 1957) quien observó que las algas marinas (diatomeas), crecían mejor en el laboratorio por la adición de sales al agua de mar. Sin embargo son Allen y Nelson (1910) quienes investigaron y simplificaron los medios de cultivo empleados hasta esa fecha, y evaluaron experimentalmente la cantidad de iones existentes en el agua de mar y los requerimientos de éstos por las microalgas; con lo cual elaboraron un medio de cultivo más simple que cubría las necesidades básicas de las microalgas, logrando buenos resultados en el crecimiento (Harrison y col., 1980).

Actualmente, existe una gran cantidad de formulaciones de medios de cultivo para las microalgas marinas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales que permitan resultados constantes. Estas fórmulas se clasifican como: medios químicamente definidos, y los enriquecidos, estos últimos se basan en agua de

mar enriquecida con productos químicos inorgánicos, con extracto de suelo o productos orgánicos (Wayne, 1973).

El uso de uno u otro tipo de medio de cultivo depende principalmente de los requerimientos nutricionales específicos de las microalgas, de los costos de producción y de la facilidad de preparación de los medios (Sánchez-Saavedra, 1989).

Existen otros tipos de medios de cultivo alternativos que no requieren de sales inorgánicas grado reactivo o industrial, los cuales proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento normal de las microalgas, que pueden provenir de sales comerciales como: fertilizantes de uso agrícola (Geldenhuis y col., 1988; Gonzalez-Rodriguez y col., 1984) y recursos orgánicos subutilizados que al mineralizarse por acción bacteriana generan los nutrientes requeridos para el desarrollo de las microalgas (Paniagua y col., 1989).

El fitoplancton se desarrolla y multiplica en relación a las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo. Existen otros medios que incluyen en su composición sustancias orgánicas (vitaminas, aminoácidos) necesarias para aquellas especies de microalgas auxótrofas, es decir que no sintetizan por medio de la fotosíntesis este tipo de compuestos y resultan factores que pueden limitar su crecimiento; tal es el caso de *Platimonas*, *Chrysophytas* y algunas *Bacillariophyceas*.

Entre los recursos, tanto para enriquecer, como para formular medios de cultivo con agua de mar, se encuentran los biodigeridos de estiércoles y macroalgas (Granados y col., 1983; Paniagua y col., 1989); aguas de desecho tratados (Dunstan y col., 1971; Dunstan y col., 1972) y extractos de suelo (Wayne, 1973).

Un estudio realizado en el 2016, donde se evalúa la producción de biomasa y pigmentos de la microalga *Hyaloraphidium contortum*, muestra que empleando el medio Guillard f/2 se obtuvo mayor densidad de población y productividad por volumen de cultivo de la microalga (Brito y col., 2016).

Métodos para Determinar Biomasa

La medición de la biomasa es importante en el cultivo de microalgas para tener un recuento directo de la población celular, y se puede hacer a través de diferentes métodos como son el conteo celular a través de una cámara de conteo que es uno de los más comunes. La medición de la densidad óptica o absorbancia con ayuda de un espectrofotómetro, tiene la ventaja de poder leer varias muestras en un corto tiempo y de ser un método de alta precisión. Otro

método es el de la cuantificación de la biomasa a través del peso seco, un método también muy utilizado.

Cuando el plancton es utilizado para alimentar larvas u organismos filtroalimentadores como los moluscos, el suministro constante y la concentración de estos alimentos son factores que determinan la supervivencia y desarrollo de los organismos en el cultivo. A continuación se hace una descripción breve de los métodos que se utilizan para determinar el número de células presentes en una muestra de plancton (Guillard, 1973; Paniagua y col., 1989).

Hematocitómetro o cámara de Neubauer. Para el conteo del número de células se pueden usar diferentes instrumentos como: hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad (el cual es empleado para el conteo de las microalgas), hematocitómetro de 0.2 mm de profundidad, cámara de Sedwick-Rafter, cámara de Palmer-Maloney y la cámara de Petroff-Hausser (estas dos últimas no son muy utilizadas en el cultivo de las microalgas, la de Palmer-Maloney es más bien utilizada para estudios de ecología del fitoplancton y la de Petroff-Hausser es para el conteo de células de bacterias).

La cámara de conteo de células más común es la cámara de Neubauer la cual fue utilizada en este trabajo. La Figura 2 muestra el esquema de la cámara. La cámara de Neubauer presenta dos hendiduras, en la cara superior del portaobjetos se encuentran cuatro canales longitudinales y un canal transversal central a cuyos lados superior e inferior existen grabados dos cuadros de 9 mm² de superficie subdivididos a su vez en una cuadrícula más fina. La Figura 3 muestra el esquema de la cuadrícula de conteo de esta cámara.

Al colocar el cubreobjetos encima de la superficie donde se encuentra grabada la cuadrícula existe entre ellos (cuadrícula y cubreobjetos) una distancia fija (profundidad) de 0.1 mm misma que viene indicada en el portaobjetos. Por lo tanto, el volumen de la muestra problema en uno de los cuadros grandes de 1 mm² de superficie será igual a 1.0 mm² X 0.1 mm = 0.1 mm³. Las técnicas de conteo consideran el número de células presentes en la muestra de volumen determinado y comúnmente se expresan como número de células por cada mililitro.

Mediante una micropipeta se toma una muestra de plancton y se desliza en la cámara que previamente tiene colocado el cubreobjetos, se deja pasar 5 a 10 minutos para que la muestra se estabilice; se procede a contar mediante un contador de mano, en algunos casos es necesario diluir la muestra cuando la densidad es alta y también es necesario fijarla cuando el plancton es móvil utilizando alguna sustancia inmovilizante (Torrentera y col., 1989).

El hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, se recomienda para el conteo de algas pequeñas (2 a 30 μm) y cultivos que lleguen a densidades de 5×10^6 cel/mL (Paniagua y col., 1989).

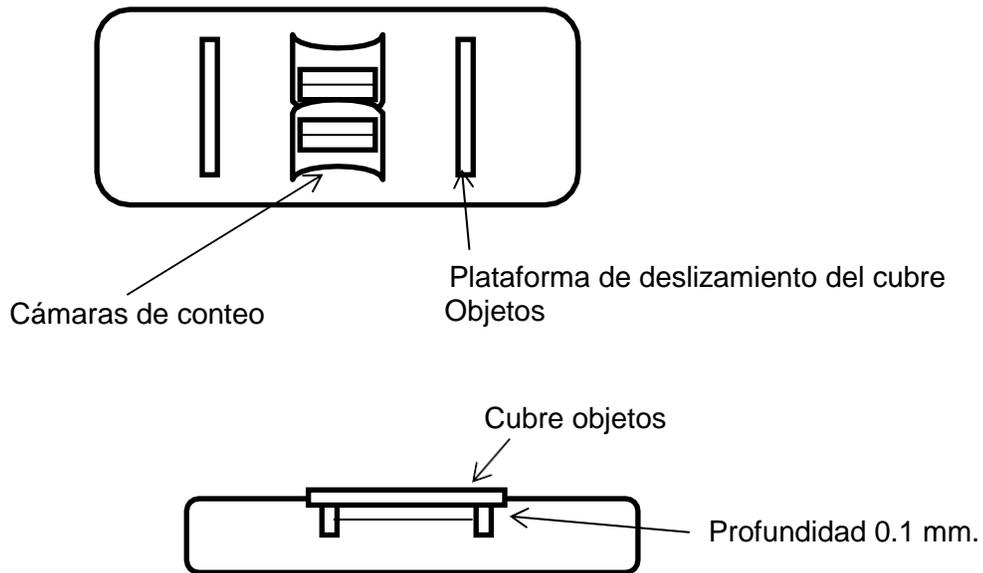


Figura 2. Esquema de la cámara de conteo Neubauer.

Fuente: Adaptada de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (1989).

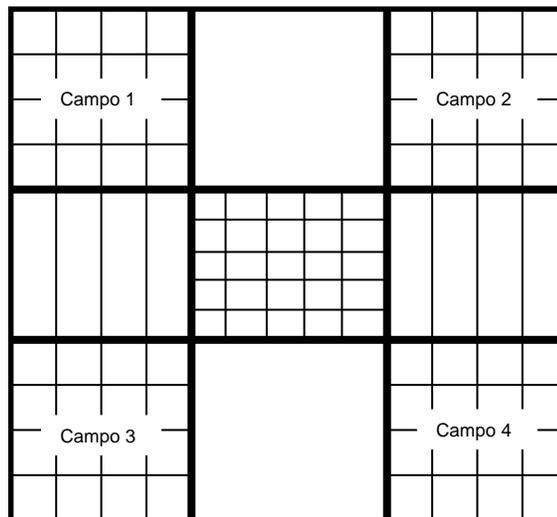


Figura 3. Cuadrantes de la cámara de conteo.

Fuente: Adaptada de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (1989).

Densidad óptica. Mediante un espectrofotómetro se determina la concentración celular de la muestra por densidad óptica (calibrando con anterioridad el equipo, siguiendo las instrucciones del manual correspondiente), se determina la absorbancia a una longitud de onda en el que el compuesto químico o biológico presenta la máxima absorbancia la cual tiene unidades de nanómetros, que se extrapola con una curva patrón previamente construida que corresponda a la especie problema (se construye graficando absorbancia vs. núm. de células/mL). Así en la intersección de la recta conociendo la concentración se puede calcular la cantidad de microalgas de la muestra problema. Por otro lado, conociendo la ecuación de la recta de cada gráfica, según la especie, se determina directamente la concentración de células de la muestra sustituyendo el valor de la absorbancia en esta ecuación (Torretera y col., 1989). Este tipo de metodología de densidad óptica (absorbancia) es muy utilizada para la determinación de biomasa de las microalgas, debido a la ventaja de poder leer varias muestras en corto tiempo y con precisión (Sorokin, 1973).

Volumen celular. Por centrifugación, se obtiene “un paquete celular” que desechando el sobrenadante, puede ser pesado y determinada en unidades de peso por volumen (w/v), la cantidad de células o biomasa de la muestra problema en peso seco. Este método es útil para grandes volúmenes. La principal desventaja de esta técnica es que su determinación incluye no solo microorganismos activos sino microorganismos muertos, material inerte y materia orgánica adsorbida. Además no puede aplicarse cuando los sustratos a degradar son insolubles. Los métodos gravimétricos son simples, pero consumen bastante tiempo y son poco reproducibles. A la vez en este método los componentes volátiles de las células pueden perderse en el secado y puede existir alguna degradación. También la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene humedad relativa alta (Torretera y col., 1989).

Validación de Métodos Analíticos

La acuicultura en nuestro país, requiere cada vez más de la incorporación de elementos científicos en la maximización de la eficiencia de procesos biológicos. Esto significa la introducción de la experimentación para la búsqueda de soluciones eficientes.

El proceso analítico se puede considerar dividido en 3 etapas: 1) operaciones previas (muestreo, acondicionamiento, disolución, separaciones, reacciones analíticas y otras); 2) medición y traducción de la señal analítica mediante el uso de instrumentos y; 3) toma y

tratamiento de datos. La calidad de los resultados depende de la calidad de las diferentes etapas del proceso analítico (Moron y col., 1997).

Entre los atributos a considerar en la calidad de un método se deben mencionar aquellas características que son básicas: confiabilidad, aplicabilidad, especificidad, exactitud, precisión, detectabilidad y sensibilidad.

Exactitud

Es la cercanía del valor analítico al "valor verdadero" de concentración del compuesto de interés en el material bajo examen. Es la concordancia entre la mejor estimación de una cantidad y su valor real. La inexactitud es la diferencia numérica entre el valor promedio de un conjunto de repeticiones y el valor verdadero (ec. 5) (Moron y col., 1997).

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida} \times 100}{\text{Concentración real}} \quad (5)$$

Precisión

Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea. Preparar por lo menos un triplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% de la muestra procesada para su medición; preparadas por dilución o por pesadas independientes. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. El criterio de aceptación para métodos instrumentales es de $\leq 2\%$ del coeficiente de variación (CV) (García y col., 2002).

Para evaluar la precisión se deben evaluar algunos conceptos estadísticos fundamentales como el cálculo de la media:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (6)$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (7)$$

Y el coeficiente de variación:

$$\% CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (8)$$

Linealidad del método

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados de ensayo que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra (CENAM-ema, 2008).

La concentración central debe ser igual a la obtenida teóricamente o la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración contra respuesta analítica. Es conveniente trazar la gráfica de la concentración (x) contra la respuesta analítica (y), incluyendo en ella la ecuación, línea de ajuste y el coeficiente de determinación (García y col., 2002; ICH, 2005).

Obtener el límite de detección de un procedimiento analítico individual que es la cantidad más baja de analito que se puede detectar en una muestra (ICH, 2005).

Pendiente:

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (9)$$

Ordenada al origen:

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n} \quad (10)$$

Coefficiente de determinación:

$$R^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)} \quad (11)$$

Dónde:

$$Y = \sum y/n \quad (12)$$

Coefficiente de correlación de Pearson

$$R = \frac{[a \sum y + b \sum x - n(\bar{y})^2]}{\sum y^2 - n\bar{y}^2} \quad (13)$$

Dónde:

$$\bar{Y} = \sum y/n \quad (12)$$

Sensibilidad

Es la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración de analito, es decir, la pendiente de la función de calibración y no es sinónimo de límite de detección. Cuando la función de calibración es una recta, la sensibilidad analítica es constante en todo el intervalo de medida. Por el contrario, con funciones de calibración diferentes de la recta, la sensibilidad varía en función de la concentración del analito. El valor absoluto de sensibilidad analítica tiene utilidad para comparar entre sí diferentes procedimientos de medida o métodos basados en la medición de una misma señal física. Cuando se trata de funciones de calibración que no corresponden a una recta, la sensibilidad debe especificarse para una concentración determinada de analito o en forma de función de la concentración de analito (CENAM-ema, 2008).

Según la IUPAC (2014) la sensibilidad (m) se define como el cociente entre la señal medida (absorbancia, s) y la concentración (c) de analito:

$$m = \frac{s}{c} \quad (14)$$

En una regresión lineal, la sensibilidad es la pendiente de la curva a una concentración dada. En caso de ser una recta, coincide con la pendiente de la misma. Como valor se puede utilizar el promedio de las pendientes obtenidas en las rectas de los ensayos de estandarización, indicando su desviación estándar (CENAM-ema, 2008).

Límite de Detección. Se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado.

$$LD = y_b + 3 S_b \quad (15)$$

Dónde:

y_b = concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco.

S_b = Desviación estándar del blanco.

Límite de Cuantificación. Es la mínima concentración o masa de analito que se puede cuantificar para un nivel de confianza dado.

$$LC = y_b + 10 S_B \quad (16)$$

Dónde:

y_b = concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco.

S_B = Desviación estándar del blanco.

Especificidad

La especificidad es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de componentes que se pueden esperar para estar presentes. Normalmente, estos podrían incluir impurezas, degradantes, etc. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede ser compensada por otro procedimiento analítico de apoyo (ICH, 2005).

Para métodos de contenido/ valoración de impurezas, se adicionan éstas al analito en niveles que incluya la especificación. Cuando no se dispone de las impurezas, el analito se somete a condiciones que generen su inestabilidad química y aplicar el método. Para métodos de límite de impurezas se analizaran las muestras de impurezas individualmente, el producto y la mezcla de éstos. Para métodos indicadores de inestabilidad, si se cuenta con los productos de degradación, preparar muestras con placebos adicionado de éstos, el placebo adicionado de analito, el placebo adicionado de analito y productos de degradación y se analizan con el método (García y col., 2002).

Repetibilidad

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos, en un intervalo corto de tiempo (mismo día) (Marcillo Morla, 2010).

Repetibilidad en exactitud. De los datos de exactitud y repetibilidad utilizar la información del porcentaje de recobro. Calcular la varianza del porcentaje de recobro de cada método. El intervalo de confianza para la razón de varianzas, debe incluir el valor de 1 (García y col., 2002).

Varianza:

$$s^2 = \frac{n \sum y^2 - (\sum y)^2}{n(n-1)} \quad (17)$$

Reproducibilidad

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios. Una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen los cambios en las condiciones del análisis o calibración. Estos cambios pueden incluir: el principio en que se basa la medición, el método, analista/observador e instrumento, material y patrones de referencia, ubicación, condiciones de uso y tiempo. Para que una expresión de la reproducibilidad sea válida, se deben especificar las condiciones que pueden cambiar de una medida a otra (Canela Campos y col., 2002).

Recuperabilidad

Capacidad de un método de determinar todo el analito presente en la muestra, según el alcance del método (algunos solo determinan algunas especies del analito). La mejor manera de determinar la eficacia de extracción del método es adicionar diferentes concentraciones del analito a las muestras y procesarlas por el método completo. Aunque es la manera más común de cuantificar la recuperación, el analito adicionado puede no enlazarse tan fuertemente a la matriz como el presente de manera natural y dar como resultado la impresión de una elevada eficacia de extracción. La alternativa es efectuar el proceso con material de referencia (MR) en la matriz deseada, si existen; si estos MR han sido generados mediante caracterización de muestras naturales el estudio de recuperación representará con mayor precisión la extracción de muestras reales (Pérez y col., 2001).

El ensayo de recuperación se puede llevar a cabo de dos maneras: con placebo o con muestra, que se enriquece con estándar. El % de recuperación obtenido debe ser entre 85 - 115 % (Salazar, 2004).

Robustez

Es una medida de la capacidad de un procedimiento de permanecer inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee información de su comportamiento en la rutina. Establecer los factores instrumentales (temperatura y presión de

la columna) y/o no instrumentales (pH de fases) relacionados al método y sean críticos. En condiciones normales y distintas de operación, analizar la muestra por triplicado. Reportar el contenido/potencia/valoración del analito en la muestra de condiciones normal y distinta, expresadas como % (García y col., 2002; Salazar, 2004).

Parámetros estudiados:

1. Efectos del congelado- descongelado
2. Tiempos de incubación
3. Temperaturas de incubación
4. Longevidad de los reactivos
5. Preparación de la muestra
6. Conservación de la muestra

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción General del Trabajo

Para llevar a cabo el desarrollo de esta investigación, el trabajo experimental se dividió en tres etapas:

1. Estandarización de técnicas para medir el crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri*, al que se le llamó método estandarizado.
2. Aplicación de las técnicas estandarizadas a un cultivo experimental de la microalga *Chaetoceros muelleri*, al que se le llamó método experimental.
3. Aplicación de las técnicas sin estandarizar a un cultivo experimental de la microalga *Chaetoceros muelleri*, al que se le llamó método no estandarizado.

En la etapa uno, del método estandarizado, se obtuvo la biomasa de un cultivo de la microalga la cual fue concentrada por centrifugación y se obtuvo un paquete celular al que se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro, se registró la lectura y se obtiene un stock de células de concentración conocida para obtener los parámetros de medición del cultivo celular.

- a) Densidad óptica, a partir de la concentración del stock de células se hicieron los cálculos para preparar una serie de diluciones en un rango de densidad óptica de cero a uno, se midió la Absorbancia a 560 nm, se graficó la absorbancia de las muestras contra la concentración de células calculada (a la que se le llamó teórica) para obtener así una curva estándar de células.
- b) Conteo de células, a la serie de diluciones anterior también se les realizó el conteo celular en una cámara de conteo Neubauer en un microscopio óptico de contraste de fases, el conteo celular se reportó como células/mL. De los datos obtenidos de la densidad óptica y la cuenta celular se graficaron para obtener una correlación entre estos parámetros.
- c) Peso seco, a la serie de diluciones preparadas anteriormente, después de contar las células se les determinó peso seco. Se procedió a filtrar las muestras a través de membranas Milipore utilizando un sistema de vacío, se registró el peso de las membranas Milipore sin células antes de secar y después de secar, el peso seco se obtuvo por diferencia de peso y se reportó en mg/mL. Se obtuvieron las siguientes

correlaciones: 1) densidad óptica contra conteo celular, 2) densidad óptica contra peso seco de células y 3) conteo celular contra peso seco de células.

En la etapa dos, del método experimental, se monitoreó un cultivo experimental desde el tiempo cero de crecimiento y a diferentes tiempos de su desarrollo. Las muestras de cultivo fueron evaluadas en conteo celular, densidad óptica y peso seco siguiendo los procedimientos de acuerdo a los parámetros obtenidos en el método estandarizado. A partir de los datos obtenidos experimentalmente se obtuvieron las correlaciones descritas en el método estandarizado.

En la etapa tres, del método no estandarizado, se monitoreó un cultivo experimental desde el tiempo cero de crecimiento y a diferentes tiempos de su desarrollo. Las muestras de cultivo fueron evaluadas en conteo celular, densidad óptica y peso seco, sin seguir el procedimiento del método estandarizado. Los datos obtenidos de los parámetros experimentales de este método también fueron correlacionados como se describió en el método estandarizado y el método experimental.

Se obtuvieron los parámetros cinéticos de los tres métodos practicados en esta investigación y se analizaron los resultados obtenidos por los tres métodos y se hicieron las comparaciones entre ellos.

A continuación se describen los materiales y la metodología utilizada en este trabajo de investigación.

Materiales y Reactivos

Microorganismos

Se seleccionó la cepa de microalga de *Chaetoceros muelleri* obtenida del laboratorio de Microbiología Acuícola del Departamento Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

Medio de Cultivo

El medio de cultivo se preparó con agua de mar filtrada, obtenida del estero de bahía de Kino y enriquecida con medio Guillard f/2 (Tabla 2). Se prepararon cuatro soluciones por separado: una solución nitrato/fosfato, una solución de vitaminas, una solución de metales y por último una solución de metasilicatos. Posteriormente, se tomó un litro de agua de mar y se le adicionó un

mL de cada una de las soluciones preparadas, mencionadas anteriormente (Torretera y col., 1989).

Tabla 2. Medio de Guillard f/2.

Constituyentes	Fórmula	Unidades
Nutrientes Mayores		g/L de agua destilada
Nitrato de Sodio, granulado y refinado	NaNO ₃	75
Fosfato de Sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5
Silicato de Sodio metasoluble	Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	30
Metales Traza		g/100 mL de agua destilada
<i>Solución Primaria</i>		
Sulfato Cúprico, cristales finos	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.98
Sulfato de Zinc, cristales finos	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2
Cloruro de Cobalto, cristales finos	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0
Cloruro Manganoso, cristales finos	MnCl ₂ ·4H ₂ O	18.0
Molibdato de Sodio, cristales finos	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.63
<i>Solución Secundaria</i>		g/L de agua destilada
Cloruro Férrico	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15
EDTA Disódico	Na ₂ -EDTA	4.36
<i>Metales Traza o Alternativamente</i>		1 mL de c/u
EDTA Férrico	Fe-EDTA	5.0
Vitaminas		1 ml de c/u
<i>Solución Primaria</i>		g/L de agua destilada
Biotina cristalizada	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	0.1
Cianocobalamina	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	1.0
<i>Solución Secundaria</i>		Cantidad en 100 mL de agua destilada
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	1 mL
Cianocobalamina (B12)	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	1 mL
Tiamina Clorhídrica (B1)	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS	20 mg

Fuente: Adaptada de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (1989).

Preparación del Inóculo

Para el escalamiento del cultivo se siguió el esquema propuesto por Paniagua (1989) con el fin de caracterizar un ciclo de producción de microalgas para la acuicultura. Este escalamiento involucra el cultivo estático desde el tubo de ensayo hasta la producción masiva en el fotobiorreactor, por lo que se considera como representativo para la diatomea empleada.

La Figura 4 muestra el procedimiento para la preparación del inóculo de la microalga *Chaetoceros muelleri*. El medio de cultivo preparado se trasvasó a matraces Erlenmeyer de 500 mL y se introdujeron a la autoclave, calentándose hasta alcanzar 15 lb/in² (psi) de presión, manteniéndose por 20 minutos. De esta forma se esterilizó el medio de cultivo y los materiales de trabajo (pipetas y matraces). Finalizado este tiempo, el medio se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente. En todo momento se aseguró que la temperatura del medio de cultivo fuera la misma que la del inóculo antes de ser inoculados manteniéndolos en un área fría en ausencia de luz. Se debe de tener precaución en este paso debido a que no se debe de inocular con el medio de cultivo aún caliente, debido a que causa muerte celular.

La inoculación se llevó a cabo en una campana de flujo laminar limpiando previamente el área de trabajo con alcohol, se encendieron dos mecheros y se energizó el interruptor de la campana de flujo laminar esperando cinco minutos para evitar cualquier tipo de contaminación y se procedió a inocular los dos matraces con la cepa de microalga.

La cantidad de inóculo para sembrar dependerá del propósito del cultivo. Si sólo se requiere como respaldo o mantenimiento de la cepa para trabajos de investigación se sembrará 1 mL del inóculo microalgas en cada matraz. Si el objetivo es la reproducción para escalar el volumen se debe sembrar de un 5% a un 10% del volumen de inóculo (25-50 mL). Se tomó la cepa de *Chaetoceros muelleri* y se inoculó cada matraz con 5 ml de inóculo. Se agitaron los matraces y se depositaron en una incubadora, con temperatura controlada (23°C) e iluminación continua.

En esta etapa de cultivo se hace necesaria la mayor precaución en medidas asépticas, así como en el control y verificación de las condiciones de crecimiento de la microalga. Se observó el cultivo de microalgas cada 24 h por un periodo de 7 días para verificar que las condiciones del cultivo permanezcan constantes. Los matraces se agitaron diariamente para evitar que el cultivo se sedimentara.

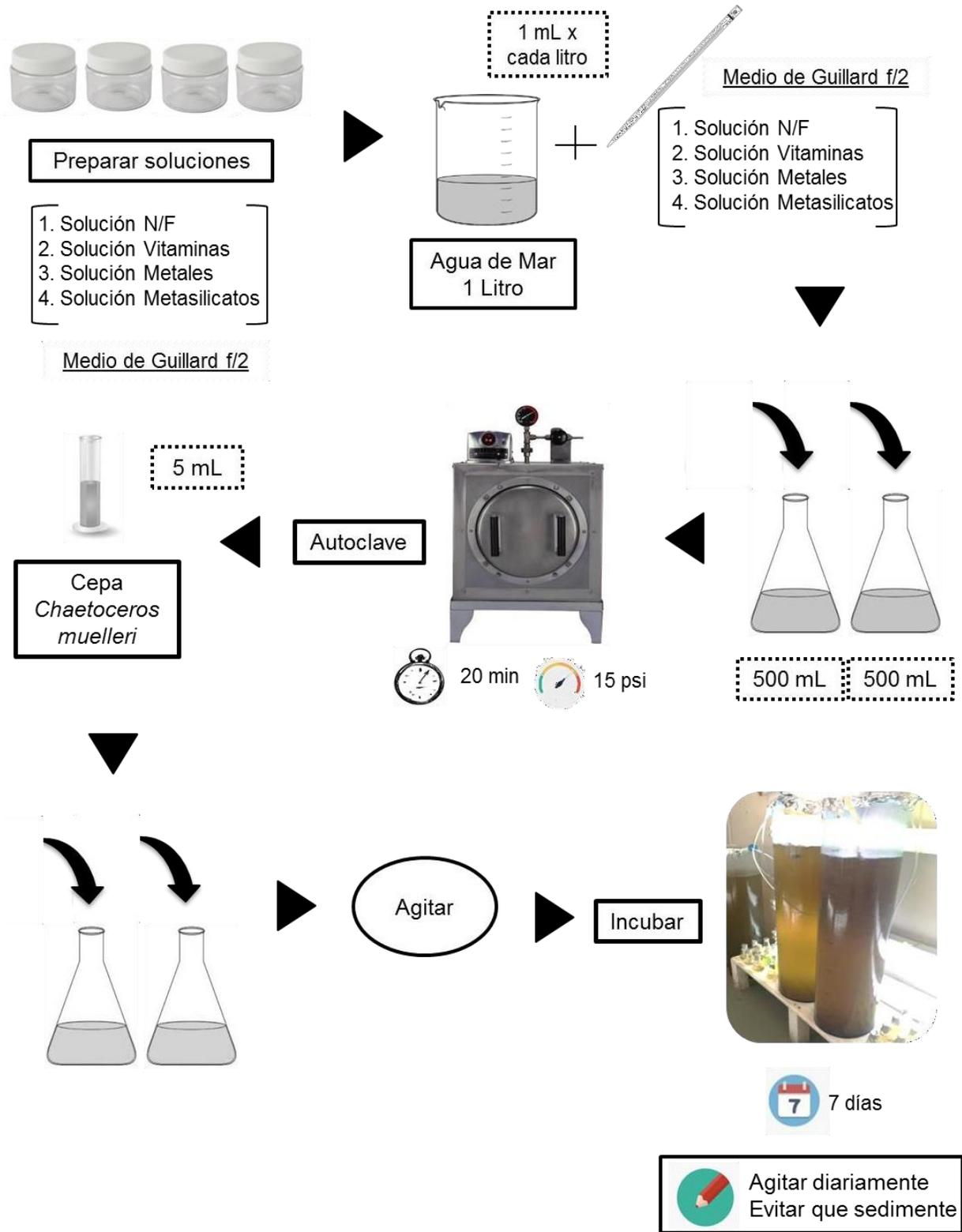


Figura 4. Diagrama de flujo para la propagación del inóculo de *Chaetoceros muelleri*.

Preparación del Medio para el Cultivo

Se prepararon dos litros de agua de mar y se les agregaron los nutrientes del medio de Guillard f/2 (Tabla 2). El medio de cultivo se filtró utilizando una membrana Milipore de 0.45 μm en un sistema de filtración al vacío, colocada sobre un matraz Kitazato de un litro, que a su vez se conecta a través de una manguera a una bomba de vacío para facilitar el filtrado como se muestra en la Figura 5. Todo el material utilizado se encontraba previamente esterilizado en la autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

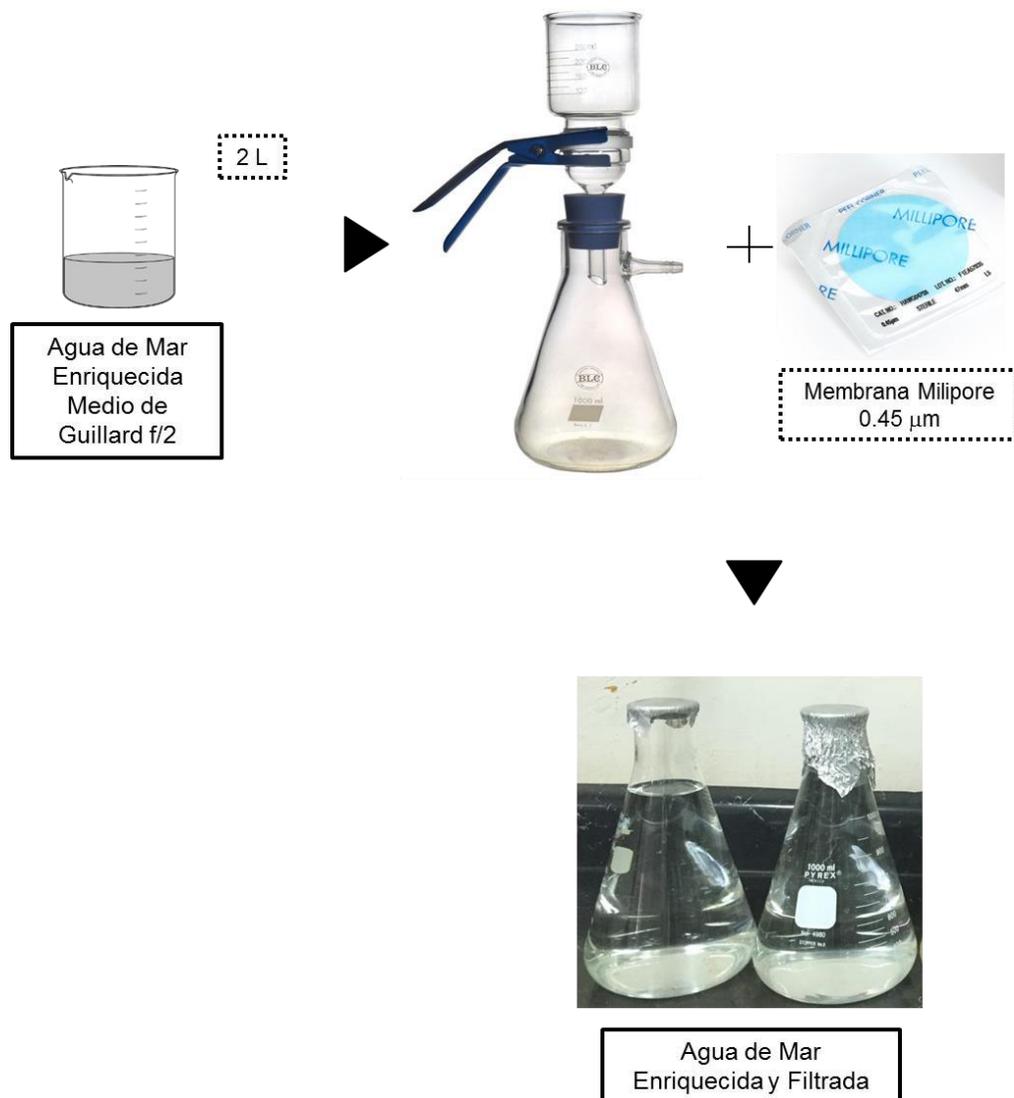


Figura 5. Diagrama de flujo para la preparación del medio de cultivo.

Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactor

Para el cultivo de la microalgas en el fotobiorreactor se prepararon dos litros de agua de mar enriquecida y filtrada además de un litro de inóculo, como se describe anteriormente (Figura 4 y 5). La Figura 6 muestra los elementos mencionados anteriormente para iniciar el cultivo de la microalga.

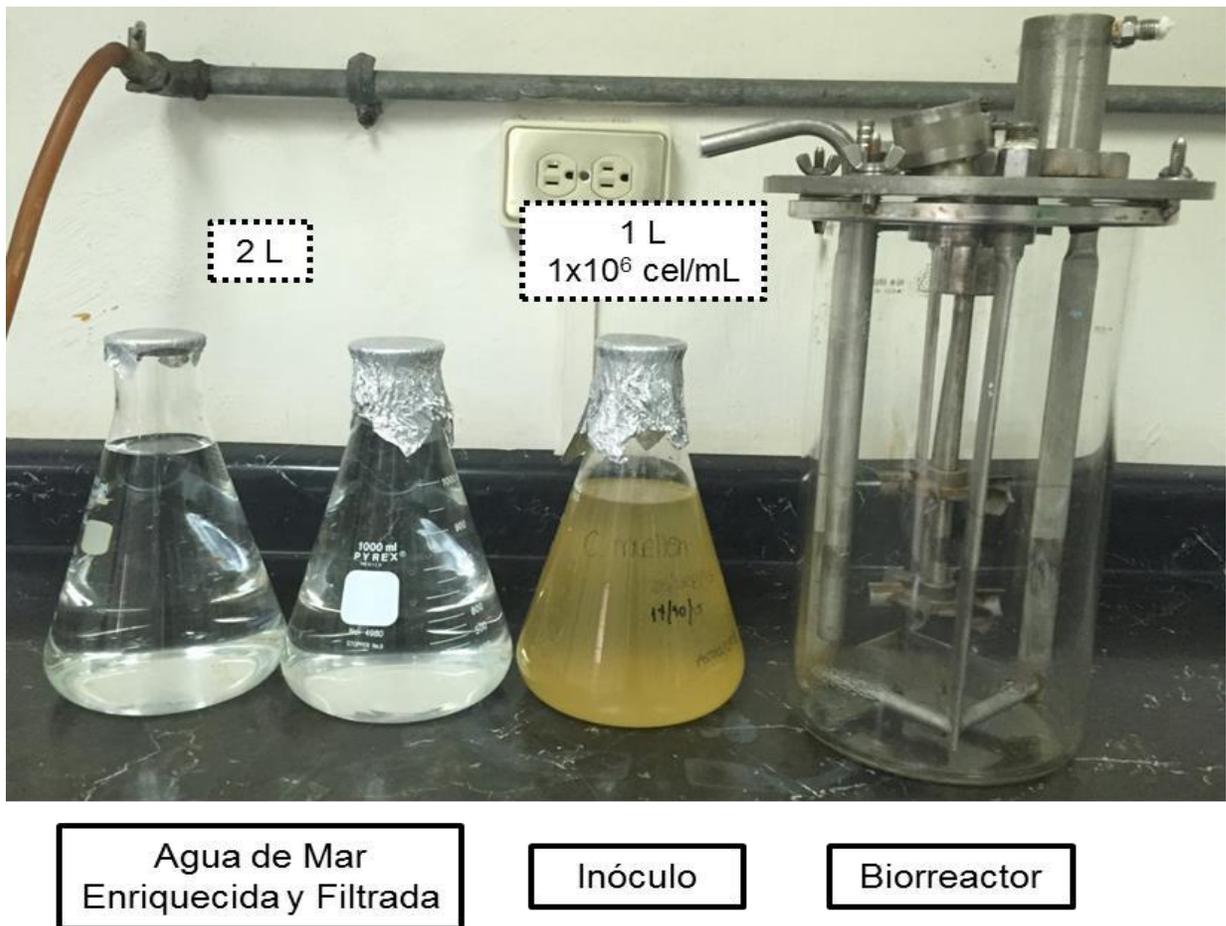


Figura 6. Preparacion del cultivo de *Chaetoceros muelleri*.

El frasco del biorreactor, junto con todas sus partes fue lavado y esterilizado en autoclave (121°C, 15 psi por 15 min). Una vez enfriado se procedió a llenar con el medio de cultivo y se inoculó con la cepa de microalga activada previamente bajo condiciones asépticas.

El cultivo experimental de la microalga se propagó en un fotobiorreactor cilíndrico de vidrio *Microferm-Fermentor* (New Brunswick) de modo vertical operado de manera batch con un volumen de tres litros (Figura 7). La temperatura se mantuvo a 23°C, utilizando un baño de recirculación de agua fría (PolyScience). Se alimentó al biorreactor con una mezcla de gases con la ayuda de un compresor conteniendo aire y CO₂ en una proporción de 95:5% v/v (1.5 L aire/min y de 75 mL CO₂/min) respectivamente, la iluminación fue de forma continua y proporcionada por dos lámparas de luz LED blanca (7.2 W).

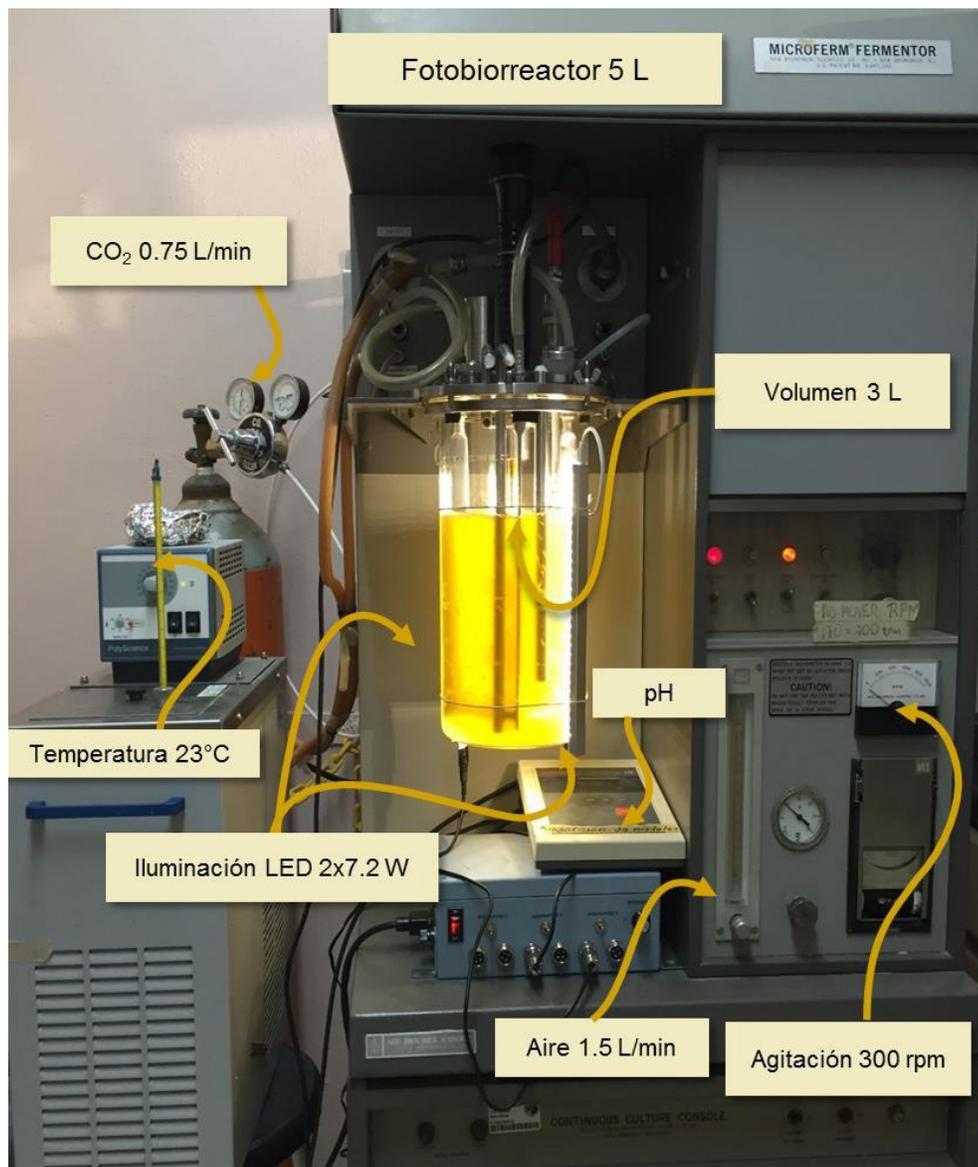


Figura 7. Cultivo de microalgas en fotobiorreactor instrumentado.

Técnicas Analíticas para el Seguimiento del Cultivo

Concentrado de Microalgas

A partir de un cultivo de microalgas, se hizo un concentrado de biomasa, centrifugando (10,000xg) en repetidas ocasiones y separando el caldo de cultivo agotado. Una vez concentrado el paquete celular se re-suspendió a una concentración conocida, utilizando el medio de cultivo agotado que se separó en la centrifugación y se midió la densidad óptica del paquete celular a una longitud de onda de 560 nm. A partir de esta solución madre se hicieron diluciones por triplicado, a diferentes concentraciones de células, que dieran lecturas en un rango de cero hasta uno de Absorbancia, utilizando el medio agotado del cultivo como diluyente. A estas muestras se les midió la Densidad Óptica (DO), se les determinó conteo celular y el peso seco celular. Con los datos obtenidos se construyen gráficas para obtener las siguientes correlaciones: DO vs número de células, número de células vs peso seco, DO vs peso seco. A los datos obtenidos en esta etapa se le llamó método estandarizado.

Medición Espectrofotométrica

Mediante un espectrofotómetro se determinó la concentración celular de las muestras experimentales por densidad óptica, se determinó la Absorbancia a una longitud de onda de 560 nm y se extrapola con la curva de células antes determinada que corresponda a la especie problema (se construye graficando absorbancia vs número de células/mL de los datos del método estandarizado). Las lecturas de DO se leen en la cuenta de células que se obtuvo en el método estandarizado por medio de la intersección de la recta se puede calcular la cantidad de microalgas de la muestra problema experimental. Por otro lado, conociendo la ecuación de la recta de cada gráfica, según la especie, se determina directamente la concentración de células de la muestra sustituyendo el valor de la absorbancia en esta ecuación (Torrentera y col., 1989).

En la Figura 8 se muestra el procedimiento para la obtención de las lecturas de densidad óptica. Para la lectura de la muestra el procedimiento es el siguiente, primero se calibra el equipo con un blanco agua de mar filtrada y enriquecida a cero de absorbancia. Se homogeniza la muestra y se toma un volumen de aproximadamente un mililitro y se deposita en una celda para espectrofotómetro. Posteriormente, se procede a leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm donde no exista interferencia por pigmentos. Por último, se lee la muestra y se registra la absorbancia.

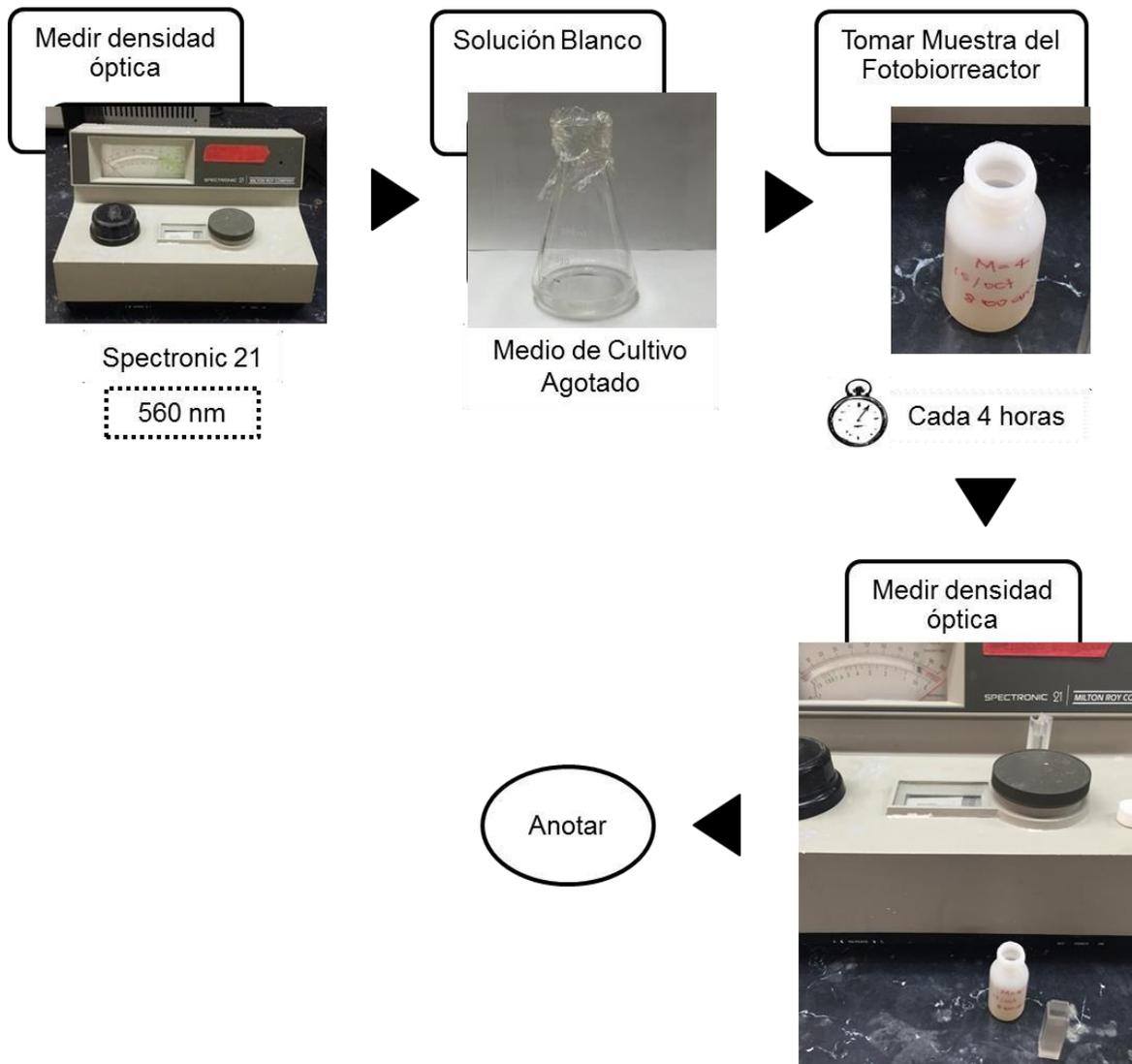


Figura 8. Diagrama de flujo para la medición de densidad óptica de *Chaetoceros muelleri*.

Cuenta Directa al Microscopio

En la Figura 9 se muestra el procedimiento para el conteo celular. Se extrajeron 15 μL de cada una de las muestras con una micropipeta depositándolas en la cámara de Neubauer por cualquiera de los canales laterales. Se colocó el cubre objeto y se observó en un microscopio de contraste de fases utilizando el objetivo de 10X. Dependiendo de la densidad del cultivo, se

puede hacer dilución de la muestra para efecto de conteo. Para la determinación de la dilución a usar se observó la muestra en la cámara de conteo y si el número de microalgas localizadas en los cuadros de 4 x 4 de la cámara era mayor a 100 se procedió a diluir la muestra.

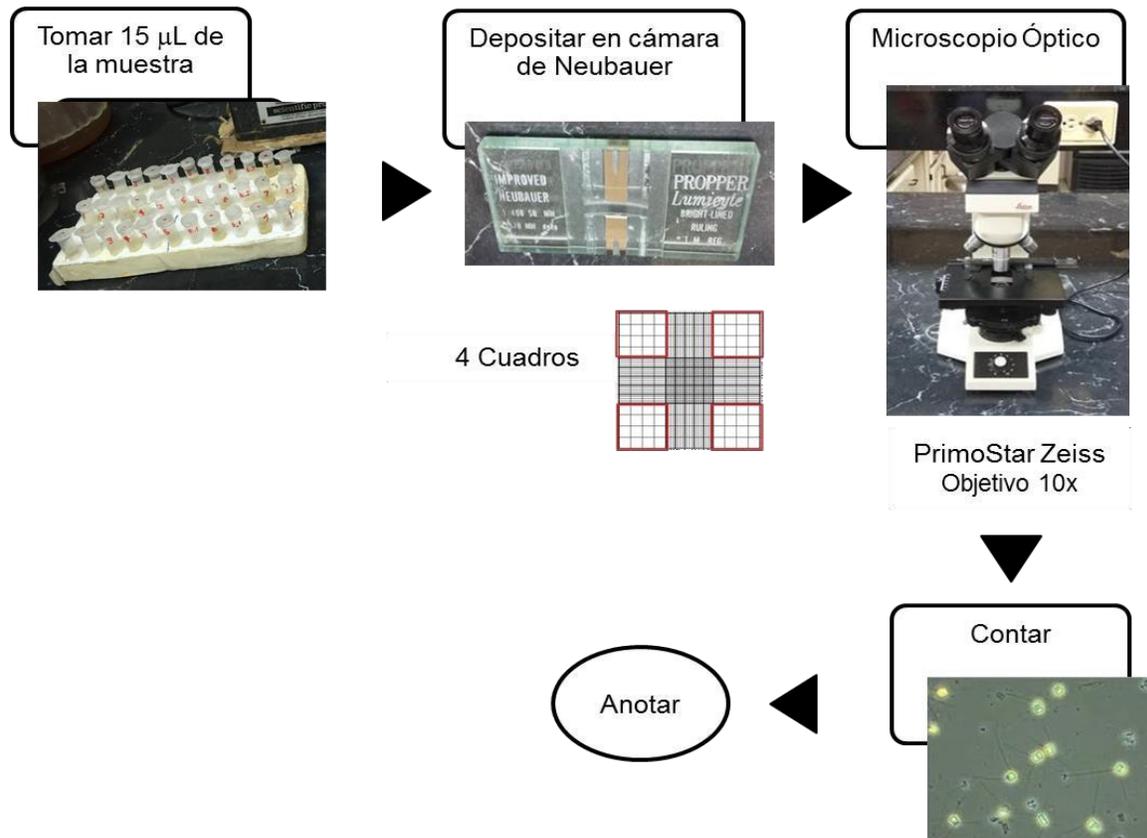


Figura 9. Diagrama de flujo para el conteo celular de *Chaetoceros muelleri*.

La fórmula para obtener el número de células por mililitro dependerá de las cuadrículas utilizadas en la cámara (Manacorda y col., 2007).

$$X = \frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{(\text{No. de células})(\text{Factor volumen de la cámara de conteo})(\text{Factor de dilución})}{(\text{Número de cuadros})} \quad (18)$$

Factor volumen de la cámara = 10^4

Algunas de las condiciones preliminares que se contemplaron para el uso de estas técnicas es homogenizar el cultivo y hacer una adecuada selección de la cámara de conteo que se utilizó se asume que la distribución de las células es al azar.

Obtención de Peso Seco

En la Figura 10 se muestra el procedimiento para la obtención de peso seco. Inicialmente se pesan los platos más la membrana Millipore para filtración con tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro *S-Pak* (Millipore) en una balanza analítica y se resguardan en un desecador. Las diluciones celulares obtenidas en el experimento se agitaron con un vortex para homogenizar la dilución y se filtraron a través de la membrana Millipore, utilizando un sistema de vacío. Posteriormente, se secaron a una temperatura de 100°C por aproximadamente 6 horas. Después del secado, las muestras se dejaron reposar en un desecador por aproximadamente 2 horas para que alcanzaran el equilibrio de la temperatura ambiente. Después de este tiempo, las membranas se pesaron con la biomasa seca y se obtuvo el peso seco por diferencia.

$$\text{peso seco } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) = \frac{(\text{peso plato} + \text{membrana} + \text{muestra seca}) - (\text{peso inicial plato} + \text{membrana})}{\text{Volumen de la muestra}} \quad (19)$$

Todo material utilizado fue previamente esterilizado en la autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

Estandarización del Experimento

Para la estandarización de las técnicas analíticas, se partió de un cultivo de microalgas y se hizo un concentrado de biomasa centrifugando en repetidas ocasiones para descartar el caldo de cultivo agotado. A partir del concentrado se hicieron diluciones determinando la concentración celular por medio de conteo directo en una cámara de Neubauer en el microscopio con el objetivo de 10X. A las muestras se les midió su densidad óptica a una longitud de onda de 560 nm contra un blanco del medio de cultivo agotado, previamente filtrado.

El peso seco se determinó filtrando las muestras sobre membranas con tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro *S-Pak* (Millipore), posteriormente se secaron en una estufa a una temperatura de 100°C por aproximadamente seis horas. Se realizaron correlaciones estadísticas entre la concentración celular (cel/mL), densidad óptica (560 nm), y peso seco (mg/mL).

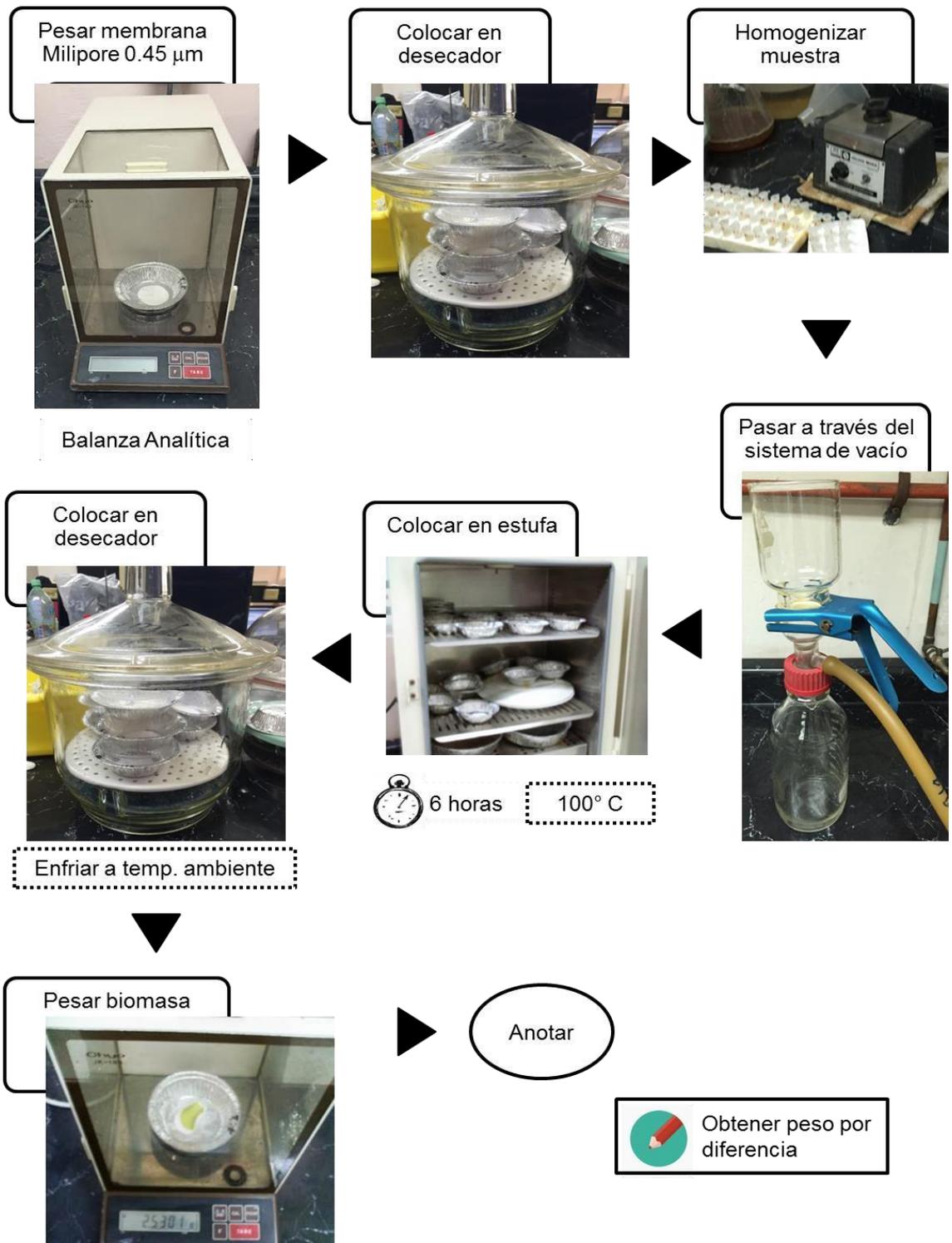


Figura 10. Diagrama de flujo para determinar peso seco de *Chaetoceros muelleri*.

Parámetros de las cinéticas de crecimiento

Los parámetros cinéticos para el crecimiento de la microalga fueron obtenidos por medio de un ajuste no-lineal a la ecuación logística de crecimiento (ec. 20).

$$X = \frac{X_0 e^{\mu(t-t_{lag})}}{1 - \frac{X_0}{X_\infty} (1 - e^{\mu(t-t_{lag})})} \quad (20)$$

Dónde:

X = Densidad celular (cel/mL)

X_0 = Concentración celular inicial (cel/mL)

X_∞ = Máxima concentración celular (cel/mL)

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

t = Tiempo en horas de cultivo

t_{lag} = Tiempo de acondicionamiento (h)

Los parámetros cinéticos obtenidos fueron concentración celular inicial (X_0), la velocidad específica de crecimiento (μ), se determinó el tiempo de fase *lag* de crecimiento (t_{lag}), máxima concentración celular (X_∞) y tiempo de duplicación de la población (t_d).

Validación del Experimento

La validación consistió en esencia, en confirmar y documentar que los resultados emanados de la aplicación de un método de análisis son confiables. Se consideraron los siguientes parámetros: 1) Exactitud, 2) Precisión, 3) Linealidad, 4) Sensibilidad.

Análisis Estadístico

Todos los experimentos y análisis se realizaron por triplicado. A los datos experimentales se les realizaron análisis de correlación de Pearson y regresión lineal, mediante el paquete estadístico JMP 11.2 (SAS Inc.) y las herramientas estadísticas de Excel 2010 (Microsoft).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método Estandarizado

Linealidad

La linealidad de las medidas de absorbancia se evaluó por el análisis de dispersión de los datos experimentales contra la absorbancia teórica por dos parámetros estadísticos: el coeficiente de correlación de Pearson (R), el cual indica el grado de asociación entre dos variables y el coeficiente de determinación (R^2) el cual indica que tan apropiado es el modelo de regresión utilizado. La linealidad de la curva de calibración se determinó utilizando nueve concentraciones diferentes con un rango de 0-1 de absorbancia (cel/mL), con tres repeticiones cada una, obteniendo un total de 37 lecturas a una longitud de onda de 560 nm. En la Figura 11 se muestra la correlación entre la absorbancia teórica esperada en la preparación de las muestras contra la absorbancia experimental.

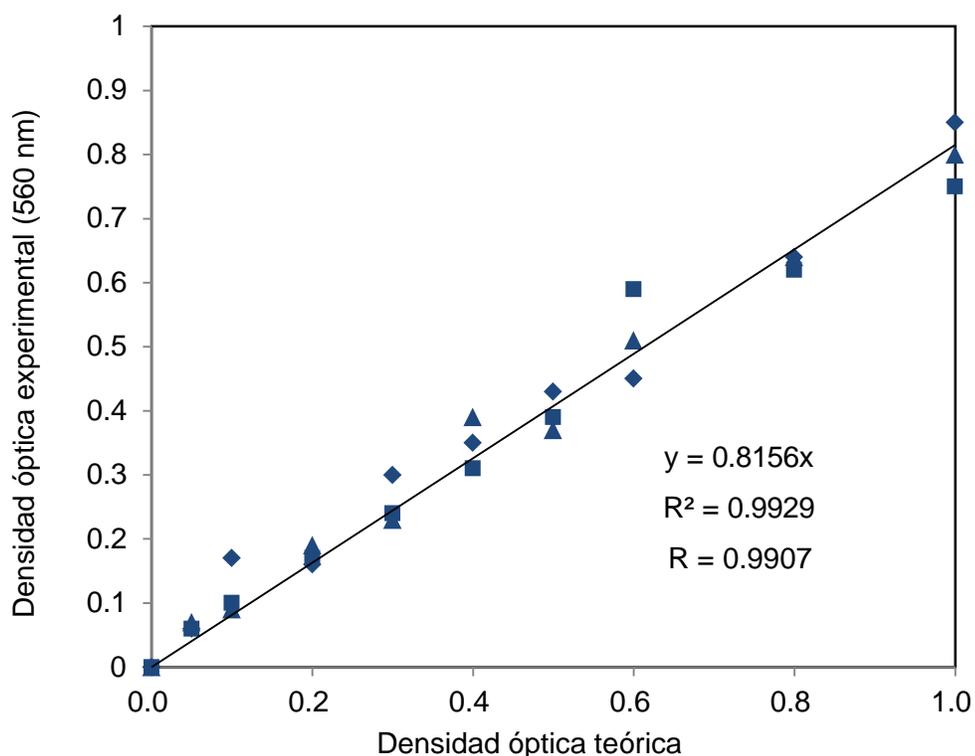


Figura 11. Correlación entre densidad óptica experimental y densidad óptica teórica. Cada figura corresponde a una réplica.

Al realizar el análisis de correlación, se obtuvo un coeficiente de Pearson (R) a través de las ecs. (12-13) de 0.9907, lo que indica una alta correlación lineal entre los valores esperados contra los valores experimentales que de acuerdo a lo establecido por García y col. (2002) concuerda con el criterio de aceptación $R^2 > 0.98$ para la validación de métodos analíticos. El coeficiente de determinación a través de las ecs. (11-12) resultó un valor de 0.9929, indicando que el método de preparación de muestras por dilución cumple ampliamente con la condición de linealidad en las condiciones experimentales.

En la Figura 12 se muestra la correlación entre la concentración celular y la densidad óptica experimental. Al realizar el análisis se obtuvo un coeficiente de Pearson (R) a través de las ecs. (12-13) de 0.9649. El coeficiente de determinación (R^2) a través de las ecs. (11-12) resultó en un valor de 0.9420. No se encontraron reportes de trabajos de estandarización de técnicas espectrofotométricas para el crecimiento de microalgas. Sin embargo, en un trabajo reportado por Díaz y col.(2011), consideraron alta correlación con un valor del coeficiente de Pearson menor ($R = 0.89$), al estandarizar la técnica de conteo de células seminales en perros.

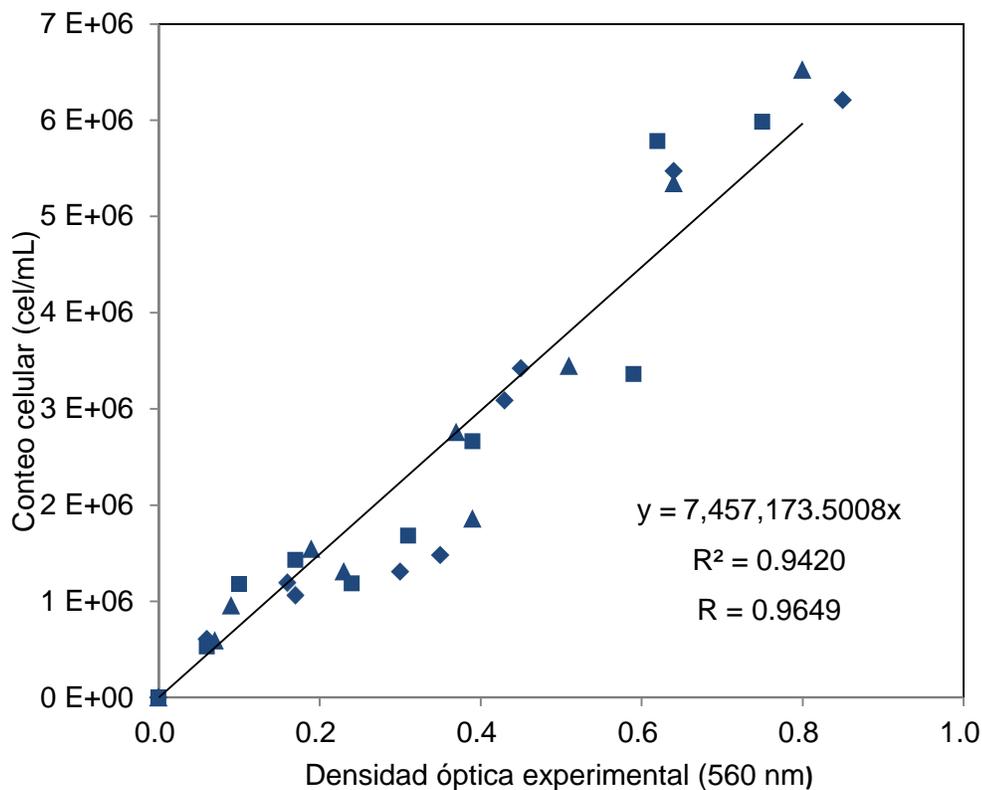


Figura 12. Correlación entre concentración celular y densidad óptica experimental. Cada figura corresponde a una réplica.

En la Figura 13 se muestra la correlación el peso seco contra la absorbancia experimental. En la figura se puede observar que después de 0.6 de absorbancia hubo un descenso en la obtención de peso seco, por lo que se descartó la última réplica. Al realizar el análisis de correlación, se obtuvo un coeficiente de Pearson (R) a través de las ecs (12-13) de 0.9235. El coeficiente de determinación (R^2) a través de las ecs. (11-12) resultó un valor de 0.9364, lo que nos dice que la regresión con la absorbancia, en el intervalo de 0 a 0.6, explica el 96.5% de la variación del peso seco.

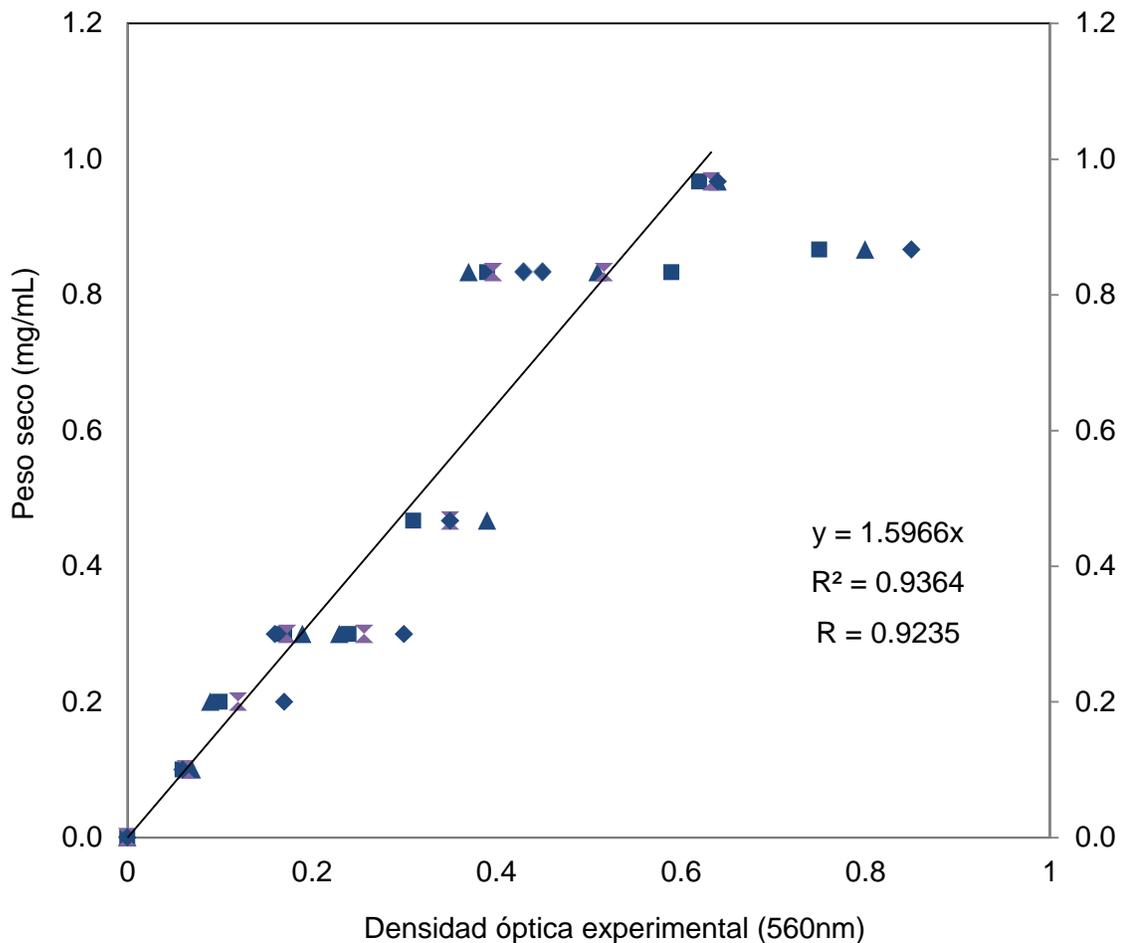


Figura 13. Correlación entre peso seco y densidad óptica experimental. Cada figura corresponde a una réplica.

Determinación de Rango Lineal

Para la determinación del rango lineal se toman las lecturas de absorbancia del cero al uno, obteniendo un mejor resultado en las diluciones de bajas concentraciones.

En la Figura 14 se presenta la gráfica en donde se observó un error sistemático, de modo proporcional, es decir, es más grande a medida que la concentración teórica se incrementa. Cuando la concentración es cero, el error proporcional también lo es y por ello la recta pasa por el origen, pero tiene una pendiente diferente a 1.

El coeficiente de determinación (R^2) de las diluciones respecto a la densidad óptica teórica fue de 0.9929, siendo aceptable de acuerdo a (García y col., 2002). con un criterio de aceptación $R^2 > 0.98$ para la validación de métodos analíticos.

El rango de linealidad es el intervalo de concentración del analito dentro del cual es confiable cualquier resultado obtenido, por lo cual se puede apreciar en la Figura 14 que el método es lineal de 0 a 0.6 debido a que se asemeja más a la absorbancia teórica, después de 0.6 presenta una mayor diferencia.

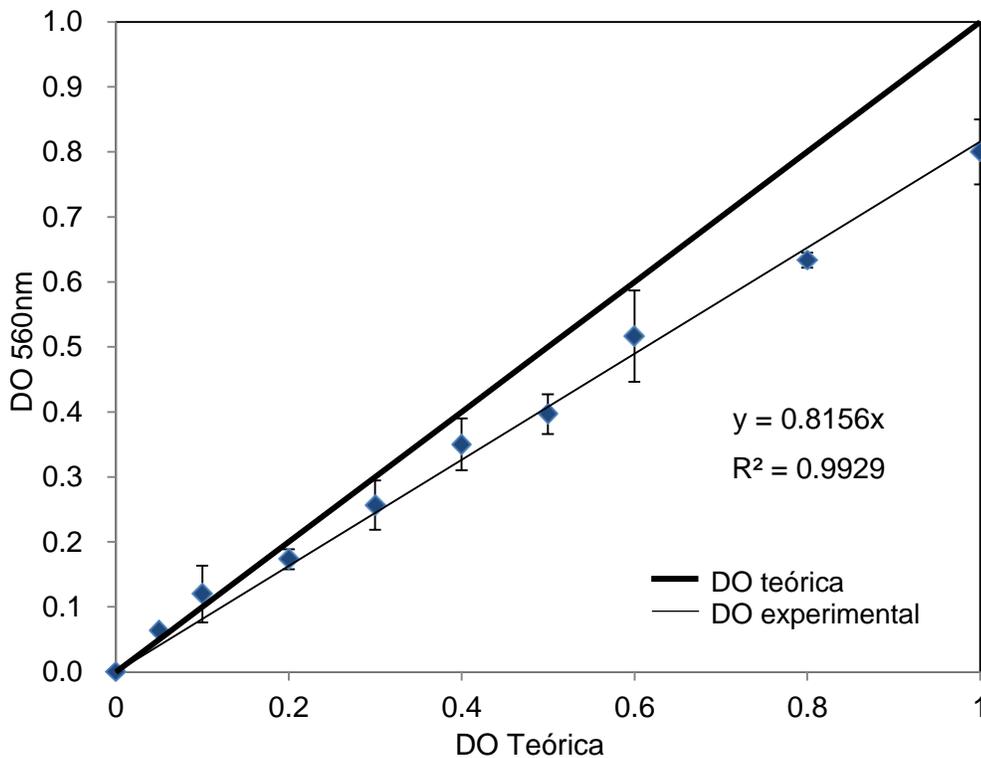


Figura 14. Rango lineal de trabajo.

Correlación de Densidad Óptica con Conteo Celular y Peso Seco

Se realizó una correlación entre conteo celular y densidad óptica (Figura 15), obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9420 indicando que el modelo de regresión utilizado es lineal. El conteo puede estimarse mediante la ecuación de y multiplicando por 7.45×10^6 .

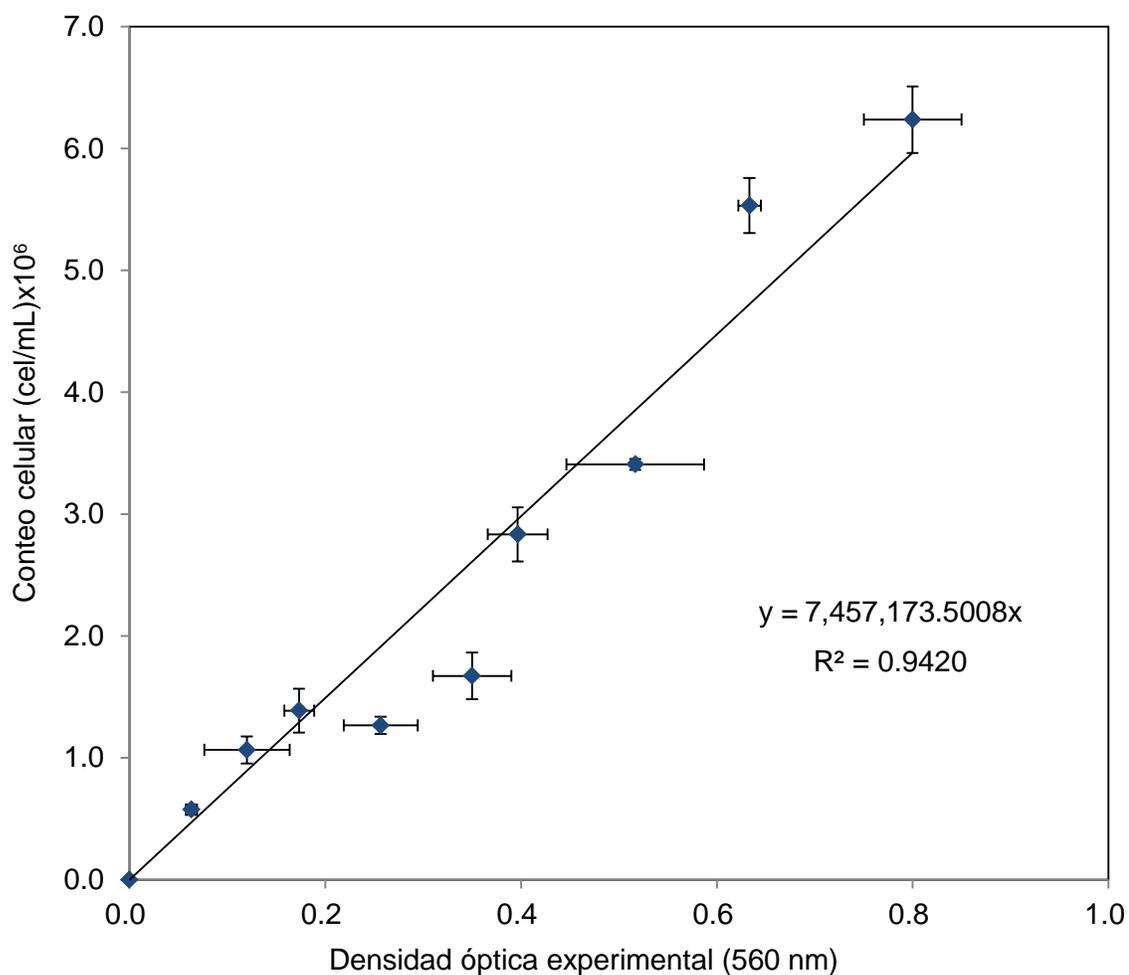


Figura 15. Correlación entre conteo celular y densidad óptica.

En la Figura 16 se muestra la correlación entre peso seco y densidad óptica en la cual se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9887 (ecs. 11-12) siendo aceptable de acuerdo a García y col. (2002).

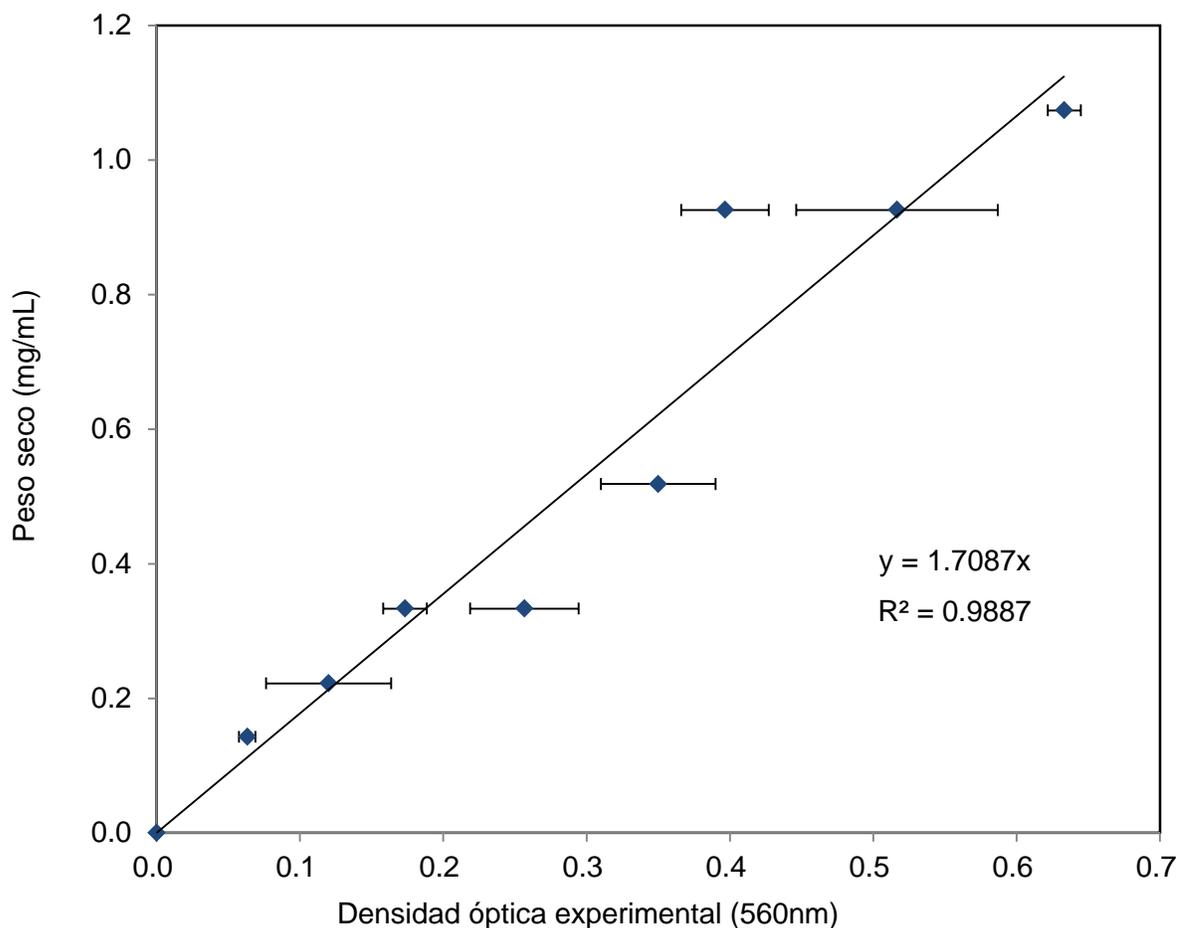


Figura 16. Correlación entre peso seco y densidad óptica.

Las Figuras 17 y 18 muestran la comparación de las correlaciones entre la concentración celular y la densidad óptica del método estandarizado y no-estandarizado. Se encontró que existe una relación lineal entre la concentración celular y la densidad óptica con un coeficiente de correlación de Pearson (R) (ecs. 12-13) de 0.964 y una R^2 (ecs. 11-12) de 0.9420 en la estandarización del método y una R^2 de 0.95 en el método no-estandarizado cumpliendo ampliamente con la condición de linealidad en las condiciones experimentales. Aun cuando existe un valor menor de R^2 para el método estandarizado, se observaron mayores desviaciones (barras de error) en los resultados experimentales con el método no-estandarizado (Figura 18), además, en el método estandarizado los valores consideran el valor de blanco mientras que la regresión de los datos del método no-estandarizado no se considera la intersección con el cero del blanco.

Para obtener la concentración celular una vez obtenida la densidad óptica se utilizó la ecuación $X = 7,457,173.5008 (DO)$.

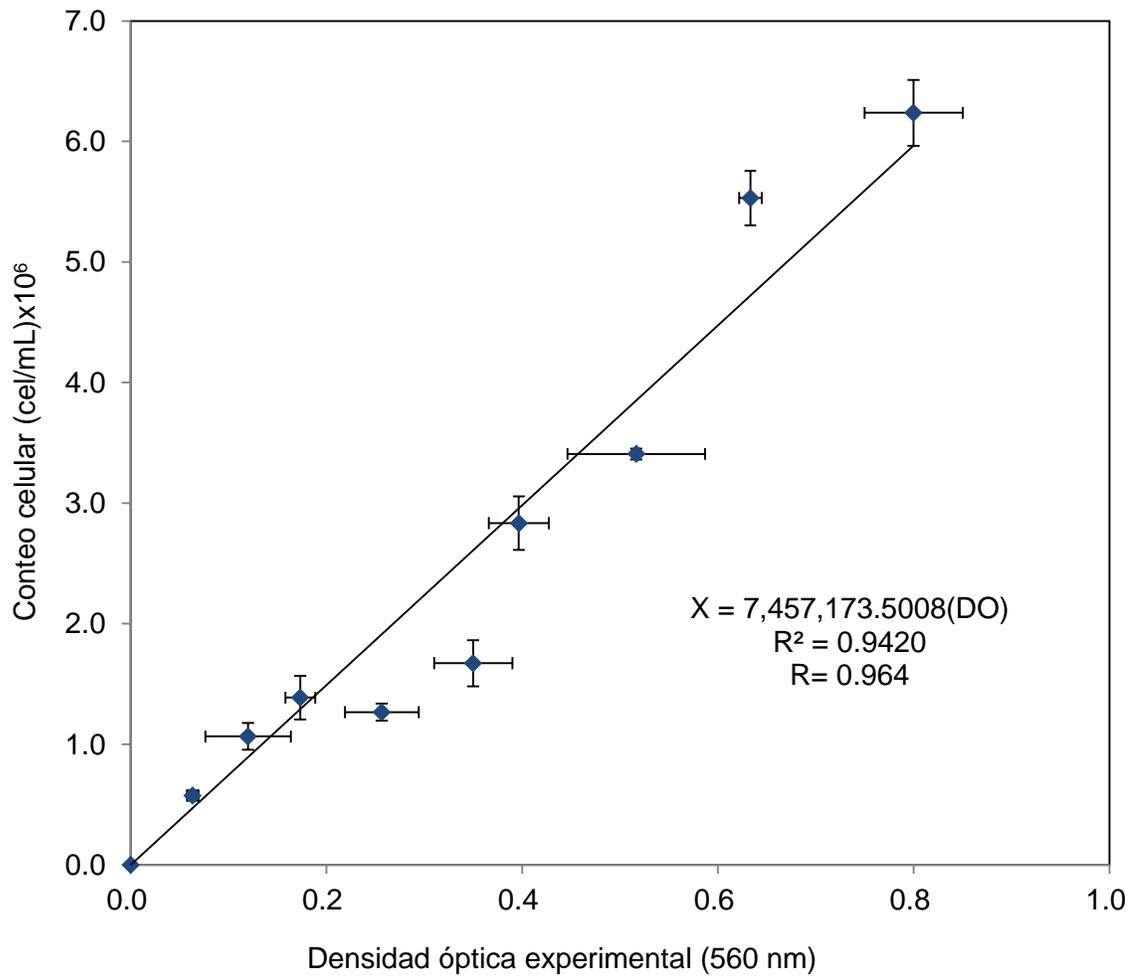


Figura 17. Correlación entre concentración celular y densidad óptica del método estandarizado.

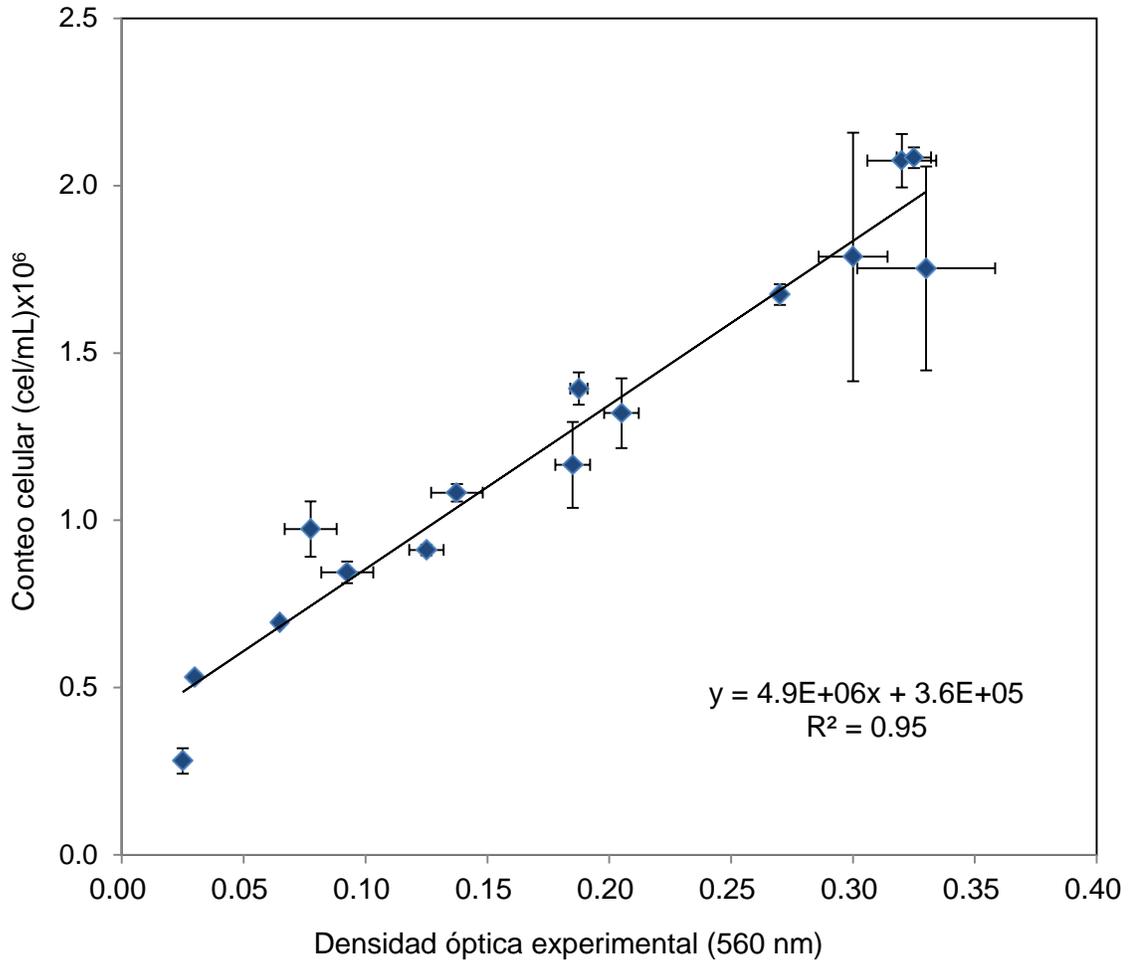


Figura 18. Correlación entre concentración celular y densidad óptica del método no-estandarizado.

En el fotobiorreactor se observó que el medio f/2 de Guillard mantuvo la producción de biomasa constante, la biomasa alcanzó un máximo de 2.34×10^6 cel/mL en cuatro días de cultivo con una tasa diaria de crecimiento de 1.24×10^6 cel/mL, lo que concuerda con lo reportado por (Medina y col., 2011) donde obtuvieron un crecimiento máximo de 2.5×10^6 cel/mL en cinco días de cultivo, mostrando una semejanza en el crecimiento obtenido.

En la Figura 19 y 20 se muestran las correlaciones del método estandarizado del peso seco contra densidad óptica y concentración celular. En la correlación entre el peso seco y la densidad óptica se encontró que existe una relación lineal con una R^2 (ecs. 11-12) de 0.9364, mientras que la correlación entre el peso seco y la concentración celular, se obtuvo un valor de R^2 (ecs. 11-12) de 0.9645 indicando que existe una fuerte relación lineal, No se encontraron

reportes de trabajos donde se correlacione la concentración celular con la densidad óptica y el peso seco, considerando el valor como aceptable debido a que la variabilidad en sistemas biológicos es muy grande.

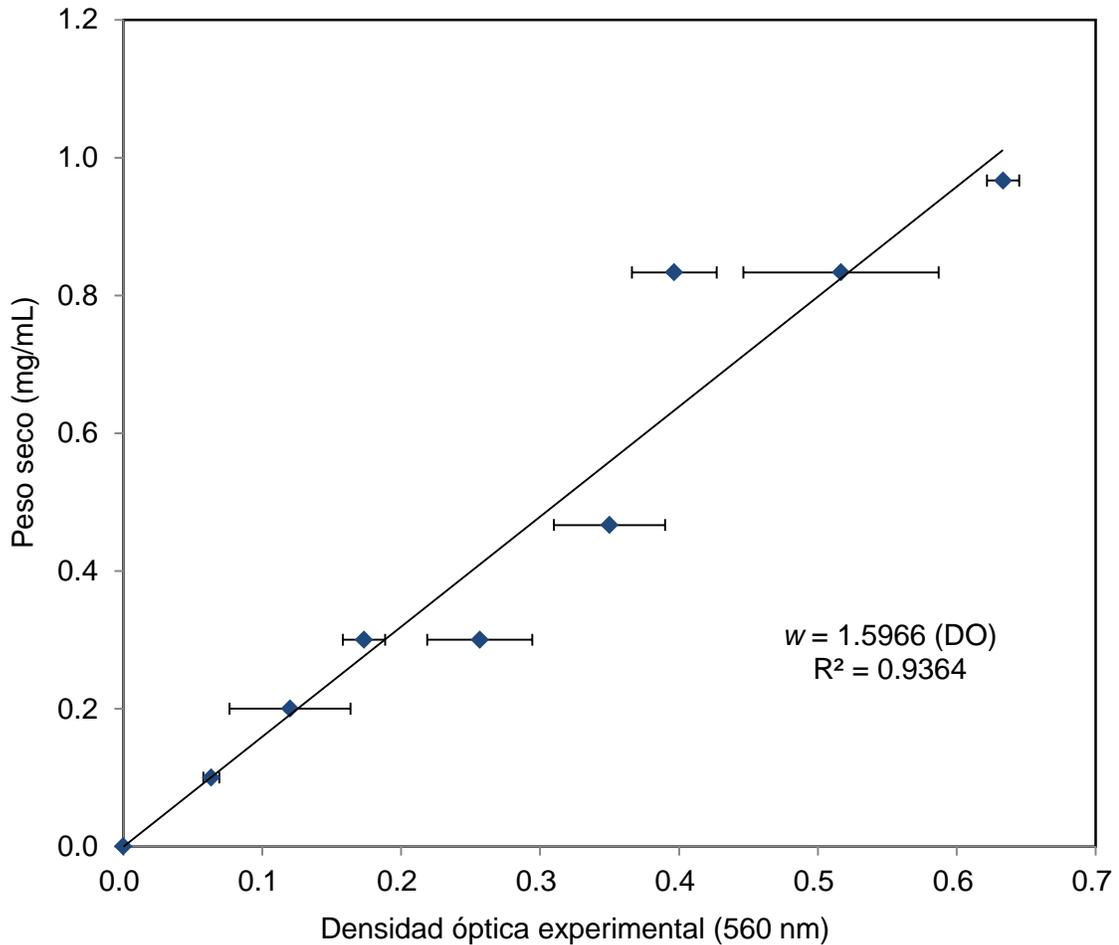


Figura 19. Correlación entre peso seco y densidad óptica.

Una vez que se obtiene la densidad óptica, el peso seco (w) puede obtenerse mediante la ecuación $w=1.5966 (DO)$. De igual manera al obtener la concentración celular, se puede obtener el peso seco mediante la ecuación $w= 2.5E-07 x$.

Con estas correlaciones fue posible determinar la concentración celular y la cantidad de biomasa producida indirectamente utilizando las lecturas de la densidad óptica a 560 nm respectivamente.

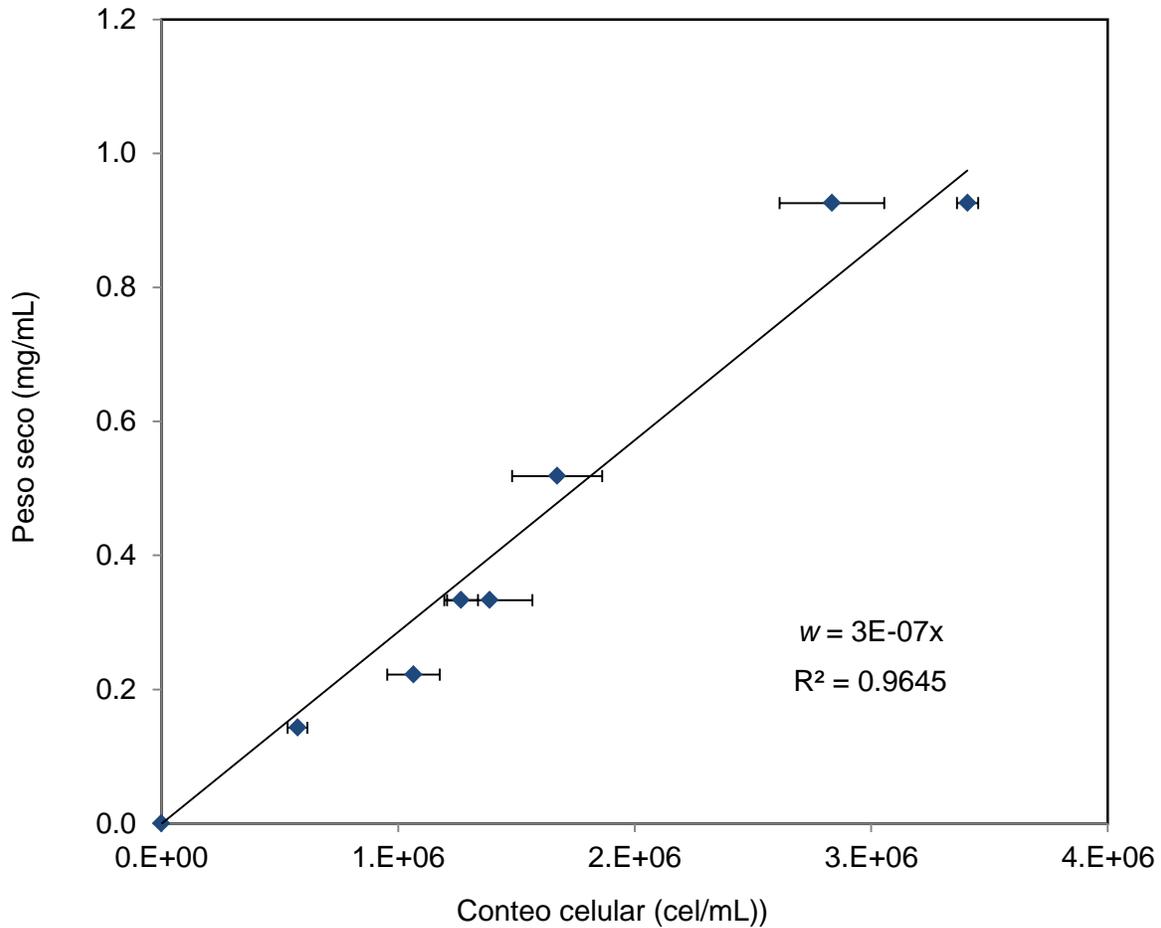


Figura 20. Correlación de peso seco y concentración celular.

Cinética de Crecimiento

Una vez estandarizadas las técnicas analíticas se realizó y se le dio el seguimiento al crecimiento de un cultivo de la microalga en un fotobiorreactor instrumentado. Se tomaron muestras a diferentes períodos de tiempo y se analizaron con cada una de las técnicas estandarizadas. El medio de cultivo fue cambiando en su coloración y turbidez en el transcurso del tiempo (Figura 21) esto es debido al incremento de la población de la microalga y a los cambios metabólicos que se presentan durante el crecimiento.

Los parámetros cinéticos para el crecimiento de la microalga fueron obtenidos por medio de un ajuste no-lineal a la ecuación logística de crecimiento ec. 20.

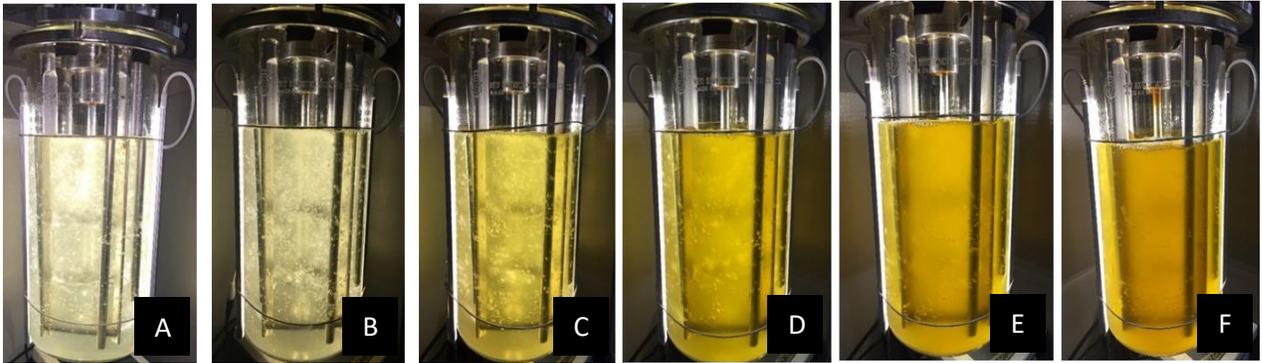


Figura 21. Seguimiento del crecimiento del cultivo de la microalga *Chaetoceros muelleri* en un fotobiorreactor a diferentes tiempos. A (0 h), B (12 h), C (24 h), D (48 h), E (72 h) y F (90 h).

En la Figura 22 se muestra la cinética de crecimiento de la microalga *C. muelleri* ajustada a la ecuación logística de crecimiento, la cual muestra los valores experimentales y el método no estandarizado. Se puede apreciar que el método no estandarizado no se ajusta al modelo logístico de crecimiento.

En la Figura 23 se muestra la cinética de crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri* ajustada a la ecuación logística de crecimiento, la cual muestra los valores experimentales y el método estandarizado. Se puede apreciar que aunque los puntos se encuentren un poco dispersos al aplicar el modelo logístico estimado, el modelo se ajusta correctamente a los valores experimentales.

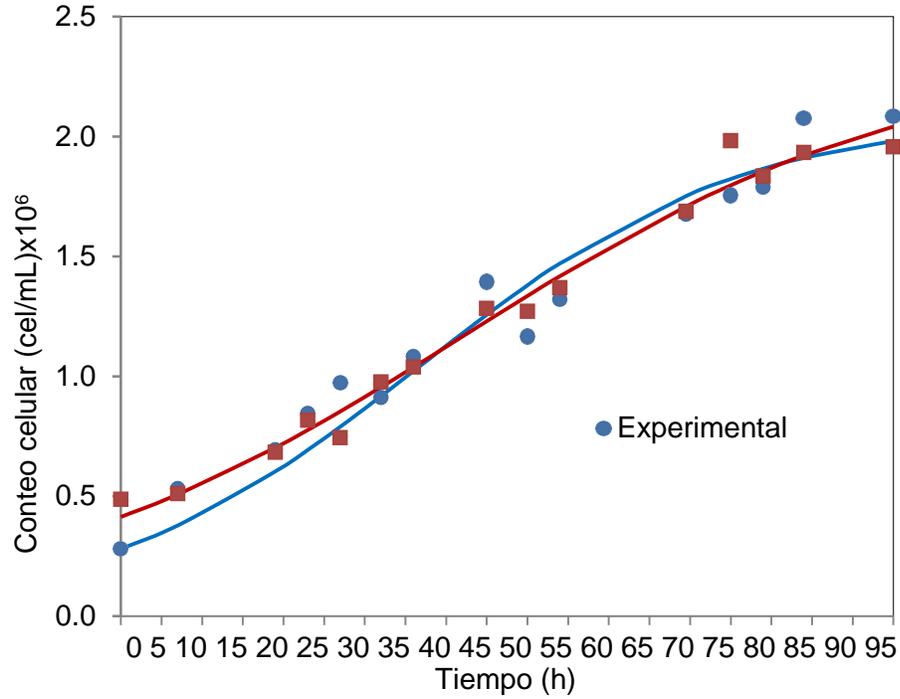


Figura 22. Cinética de crecimiento de la microalga *C. muelleri* ajustada del método experimental y del método no estandarizado.

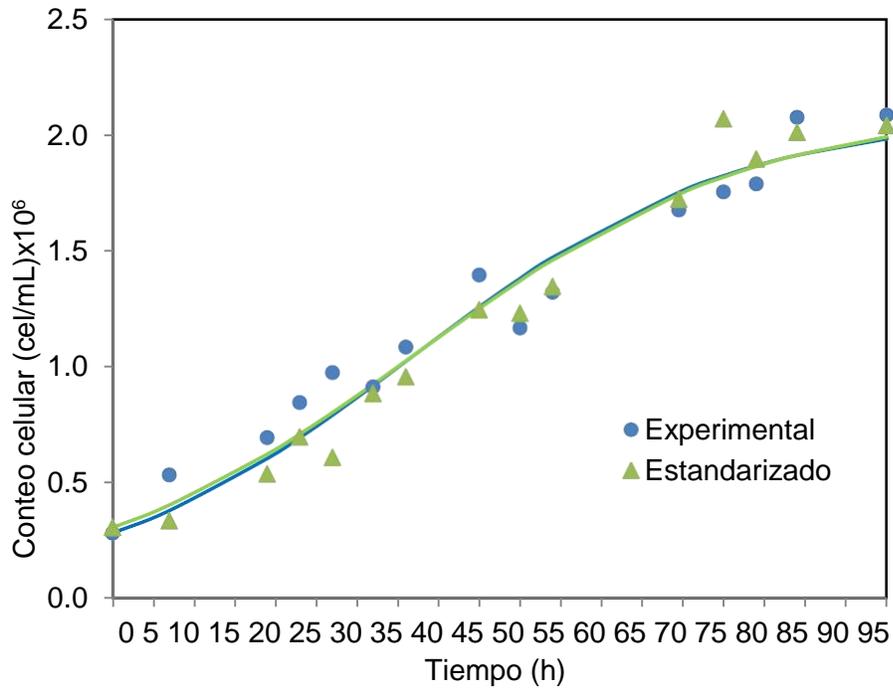


Figura 23. Cinética de crecimiento de la microalga *C. muelleri* ajustada del método experimental y del método estandarizado.

En la Figura 24 se muestra la comparación entre el método estandarizado, el método no-estandarizado y los valores experimentales, en la cual se puede apreciar que el método estandarizado se ajusta correctamente a los valores experimentales.

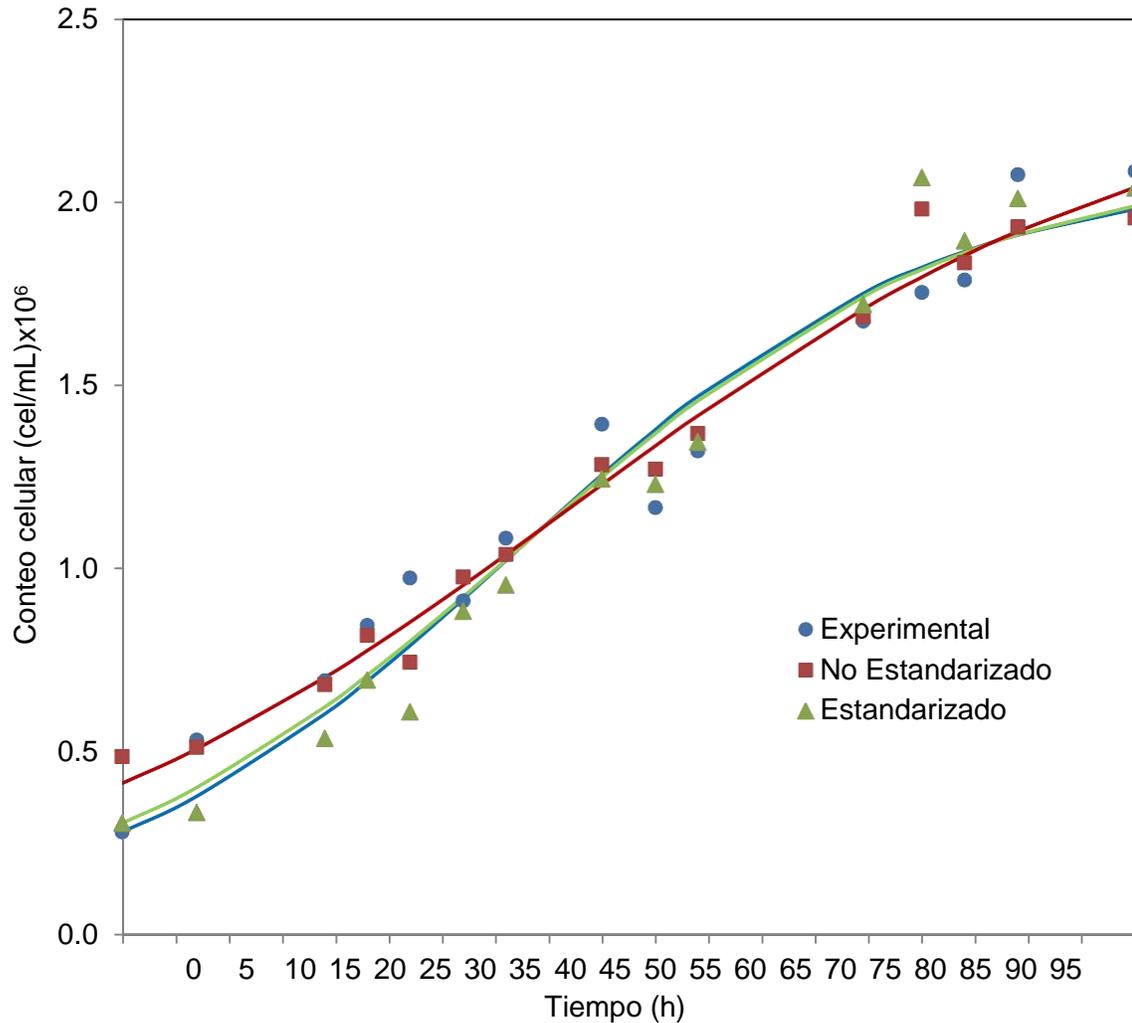


Figura 24. Cinética de crecimiento de la microalga *C. muelleri* ajustada.

El modelo logístico permitió determinar los parámetros cinéticos del crecimiento experimental y de los datos estimados con los métodos analíticos (Tabla 3). Con este modelo fue posible determinar con precisión los parámetros experimentales de crecimiento para la microalga como la velocidad específica de crecimiento ($\mu = 0.051 \text{ h}^{-1}$), tiempo de duplicación ($t_d = 13.7 \text{ h}$) y el máximo crecimiento ($X_{\infty} = 2.09 \times 10^6 \text{ cel/mL}$). Se puede observar que los

parámetros estimados de μ , X_{∞} , t_d , con el método estandarizado, se aproxima más al obtenido experimentalmente que los obtenidos con el método no estandarizado.

Tabla 3. Parámetros de la cinética de crecimiento de *C. muelleri*.

Parámetro	Experimental	Estandarizado	Error %	No Estandarizado	Error %
X_0 (cel/mL)	2.81E+05	3.05E+05	8.54	4.87E+05	59.67
X_{∞} (cel/mL)	2.09E+06	2.12E+06	1.43	2.34E+06	10.37
μ (h^{-1})	0.051	0.048	5.88	0.036	25
t_{lag} (h)	0.00	0.00	0.00	5.52	552
t_d (h)	13.70	14.5	5.83	19.0	9.03

Para el ajuste de los datos estimados con el método estandarizado se encontró un tiempo de acondicionamiento celular $t_{lag} = 0$ h similar al experimental.

En la Tabla 3 se muestran los errores porcentuales referentes a los métodos utilizados. En cuanto al método estandarizado el error porcentual es menor en comparación con el no estandarizado. En definitiva el método estandarizado comprueba una vez más que se ajusta mejor a los valores experimentales. Por ejemplo, el tiempo lag tanto del método estandarizado y el experimental es igual a cero, lo que quiere decir que las microalgas se adaptan fácilmente a las condiciones de crecimiento; no obstante en el método no estandarizado el error porcentual es de 552%.

Validación de Métodos Analíticos

Dentro de la validación se analizaron diferentes parámetros, dentro del cual está la exactitud, parámetro que muestra de manera evidente el grado de concordancia entre el valor real (experimental) y el valor teórico (verdadero) y que se sustenta a través del porcentaje de recuperación.

Los valores obtenidos para la exactitud del método por medio del porcentaje de recuperación calculados a partir de la (ec. 5) se muestran en la Tabla 4. Como se puede apreciar, los valores para el porcentaje de recuperación alcanzan un valor hasta del 120%. Solo algunos de los porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los límites ($100 \pm 15\%$)

establecidos por la (AOAC, 2005) para la validación o prevalidación de métodos analíticos mediante análisis espectrofotométricos.

En este estudio, la precisión se evaluó mediante el %CV el cual se calculó a partir de la (Ec. 8), tal y como se puede apreciar en la Tabla 4, los resultados para este parámetro no rebasan el valor de 1.6, por lo cual, la precisión para este método analítico se considera aceptable, ya que para métodos instrumentales debe ser menor del 2% (García y col., 2002).

Tabla 4. Exactitud y precisión del método estandarizado.

Absorbancia	Absorbancia	DE	Exactitud	CV
Teórica	Experimental*			
0	0.0000	0	0	0
0.05	0.0633	0.0058	126.6667	0.091
0.1	0.1200	0.0436	120.0000	0.363
0.2	0.1733	0.0153	86.6667	0.882
0.3	0.2567	0.0379	85.5556	0.147
0.4	0.3500	0.0400	87.5000	0.114
0.5	0.3967	0.0306	79.3333	0.077
0.6	0.5500	0.0400	91.6667	0.072
0.8	0.6333	0.0115	79.1667	0.018
1	0.8300	0.0265	83.0000	0.031

*Promedio de tres determinaciones, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación. La exactitud fue evaluada por el porcentaje de recuperación (ec. 5).

CONCLUSIONES

Se lograron establecer varias técnicas para el seguimiento del crecimiento del cultivo de la microalga *C. muelleri*, como son el conteo directo al microscopio, la densidad óptica y el análisis de peso seco.

Fue posible correlacionar las técnicas analíticas entre sí por medio de relaciones lineales sencillas, estableciendo los rangos lineales de trabajo y las correlaciones para la estimación indirecta de sus valores.

Se obtuvieron ecuaciones para la cuantificación del conteo celular y peso seco utilizando el análisis de densidad óptica.

El método estandarizado facilitó el seguimiento confiable de la cinética de crecimiento de la microalga.

Los parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos por el ajuste de los datos experimentales con los modelos, demuestran que el método estandarizado aporta una mayor confiabilidad en su determinación, validando los resultados del método.

Al utilizar estas técnicas analíticas y ecuaciones se facilitará el seguimiento del proceso de producción industrial de la microalga *C. muelleri*.

BIBLIOGRAFIA REVISADA

- ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, P., TORRES, E. & HERRERO, C. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. *Universidad de la Coruña. España*.
- AOAC, I. 2005. *Official methods of analysis of AOAC International*, AOAC International.
- AZNAY, M. G., LOPEZ, T. R. & ALBA, L. V. 2006. Evaluación del crecimiento de *Thalassiosira fluviatilis* frente a diferentes concentraciones de Nutrilake. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7, 1-6.
- BOLAÑOS, E. R. A. 2008. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 14.
- BRITO, D., CAÑA, E., GUEVARA, M., SUBERO, J. & COLIVET, J. 2016. Efecto de tres fuentes de nutrientes en la producción de biomasa y pigmentos de la microalga dulce acuícola *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias*, 4, 15-26.
- CAMPAÑA-TORRES, A., MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R., VILLARREAL-COLMENARES, H. & CORTÉS-JACINTO, E. 2010. Evaluation of different concentrations of adult live *Artemia* (*Artemia franciscana*, Kellogs 1906) as natural exogenous feed on the water quality and production parameters of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) pre-grown intensively. *Aquaculture Research*, 42, 40-46.
- CANELA CAMPOS, M. A. & GRIFUL PONSATI, E. 2002. Gestión de Calidad. UPC ed. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya, SL.
- CANTIZANO, J. G. 1990. Fraccionamiento de la productividad primaria en un ecosistema microbiano: fotosíntesis oxigénica, fotosíntesis anoxigénica y fijación a oscuras: trabajo experimental en el programa de "Biotecnología microbiana".
- CENAM-EMA 2008. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México, DF.
- COLL, M. J. 1983. Acuicultura marina animal. *Mundi-Prensa, Madrid. España*.
- CHAUMONT, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5, 593-604.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25, 294-306.
- DEL MAR, T. 2005. Acuicultura Marina. *Tendencias tecnológicas a medio y largo plazo. Fundación OPTI y AINIA. Madrid*.
- DIAZ, J. D., VALIENTE, C., CORRADA, Y. A. & GOBELLO, C. 2011. Estandarización de la espectrofotometría para la medición de la concentración seminal en el perro doméstico. *Analecta Veterinaria*, 31.
- DUNSTAN, W. M. & MENZEL, D. W. 1971. Continuous cultures of natural populations of phytoplankton in dilute, treated sewage effluent. *Limnology and Oceanography*, 16, 623-632.
- DUNSTAN, W. M. & TENORE, K. R. 1972. Intensive outdoor culture of marine phytoplankton enriched with treated sewage effluent. *Aquaculture*, 1, 181-192.
- FOGG, G. E. & THAKE, B. 1987. *Algal cultures and phytoplankton ecology*, Univ of Wisconsin Press.
- FOX, J. M. 1983. Intensive algal culture techniques. *Handbook of Mariculture*, 1, 15-41.
- GARCÍA, M., SOBERÓN, E., CORTÉS, M., RODRÍGUEZ, R., HERRERA, J., ALCÁNTARA, A., CHÁRVEL, A., MOTA, R. & GARZÓN, A. 2002. Guía de validación de métodos analíticos. *Colegio Nacional de Químicos Biólogos México, AC México*.
- GELDENHUYS, D. J., WALMSLEY, R. D. & TOERIEN, D. F. 1988. Quality of algal material produced on a fertilizer-tap water medium in outdoor plastic-enclosed systems. *Aquaculture*, 68, 157-164.
- GONZALEZ-RODRIGUEZ, E. & MAESTRINI, S. Y. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. *Aquaculture*, 36, 245-256.

- GRANADOS, C. & BÜCKLE, L. 1983. Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. 1 ed.
- GUILLARD, R. R. L. 1973. Division rates. *Handbook of phycological methods*, 1, 289-312.
- HARRISON, P. J., WATERS, R. E. & TAYLOR, F. J. R. 1980. A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology*, 16, 28-35.
- HOFF, F. & SNELL, T. 2008. Plankton Culture Manual, 6th edn. Florida Aqua Farms. Inc., Dade City, FL.
- HORS, J. P. C. 2011. Las algas como recurso: valorización, aplicaciones industriales y tendencias. *Funciones de las microalgas en acuicultura*: CETMAR.
- HOSHAW, R. W., ROSOWSKI, J. R. & STEIN, J. R. 1973. Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press, Cambridge, England*, 53.
- ICH 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).
- JAMES, C. M. & ABU-REZEQ, T. S. 1989. An intensive chemostat culture system for the production of rotifers for aquaculture. *Aquaculture*, 81, 291-301.
- KAPLAN, D., RICHMOND, A. E., DUBINSKY, Z. & AARONSON, S. 1986. Algal nutrition. *Handbook of Microalgal Mass Culture*, 147-198.
- KUBITSCHKE, H. E. 1970. Introduction to research with continuous cultures.
- LÓPEZ-ELÍAS, J. A., VOLTOLINA, D., NIEVES-SOTO, M. & FIGUEROA-ORTIZ, L. 2004. Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del noroeste de México. *Avances en Nutrición Acuícola*, 7, 636-649.
- LUBZENS, E., ZMORA, O. & BARR, Y. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Rotifera IX*. Springer.
- MANACORDA, A. M., CUADROS, D. P. & ÁLVAREZ, A. S. 2007. Manual práctico de microbiología. *Tomo I: Microbiología Ambiental I*.
- MANDUJANO, M. A. B. 2012. *Biología, Ecología e Investigación Sobre el Langostino de Río Macrobrachium carinus*. Linnaeus, 1758, Palibrio.
- MARCILLO MORLA, F. 2010. Taller de estadística aplicada a la acuicultura.
- MATHIESEN, Á. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 231p. *Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italia*. ISBN, 978-9253072255.
- MEDINA, R. C. & CORDERO, E. B. 2011. Crecimiento y composición bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, mantenida en cultivo estático con un medio comercial. *Ciencia y mar*, 19-25.
- MORON, C., ZACARIAS, I. & PABLO, S. D. 1997. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. *Produccion y manejo de datos de composicion quimica de alimentos en nutricion*. FAO. Direccion de Alimentacion y Nutricion.
- MULLER-FEUGA, A., MOAL, J. & KAAS, R. 2003. The microalgae of aquaculture. *Live feeds in marine aquaculture*, 206-252.
- PANIAGUA, M., RAMÍREZ, J. B., MACHUCA, L. F. G. & SALINAS, C. L. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. *Informe especial Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada 2da. Edición. Baja California, México*.
- PÉREZ-URRIA, E. 2011. Fotosíntesis: aspectos básicos. *REDUCA (Biología)*, 2.
- PÉREZ, A., PUJOL, F. & MARTÍ, J. 2001. Validación de métodos analíticos. *Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria*, 45-118.
- PROVASOLI, L., MCLAUGHLIN, J. J. A. & DROOP, M. R. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Archiv für Mikrobiologie*, 25, 392-428.
- RICHMOND, A. 1986. *CRC Handbook of microalgal mass culture*, CRC press.

- SALAZAR, L. N. 2004. Validación de Métodos Analíticos. Temuco, Chile.: Universidad de la Frontera.
- SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P. 1989. Diseño de un biodigestor aeróbico de alimentación periódica y utilización de los nutrientes producidos para el cultivo de microalgas.
- SINGH, B., GULDHE, A., RAWAT, I. & BUX, F. 2014. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29, 216-245.
- SOROKIN, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements*, 321-343.
- SPOTTE, S. 1979. *Seawater aquariums: the captive environment*.
- TORRENTERA, B. L. & TACON, A. G. J. 1989. La Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. In: FAO (ed.) *II. Cultivo de microalgas*. Roma.
- UNGSETHAPHAND, T., PEERAPORNPISA, Y., WHANGCHAI, N. & SARSDUD, U. 2007. Productivity and chemical composition of *Spirulina platensis* using dry chicken manure as nitrogen sources.
- VÁSQUEZ-SUÁREZ, A., GUEVARA, M., GONZÁLEZ, M., CORTEZ, R. & ARREDONDO-VEGA, B. 2013. Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. *Rev. Biol. Trop.*, 61, 1003-1013.
- WAYNE, N. H. 1973. Growth media-freshwater. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*, 1, 39-78.
- WIJFFELS, R. H., KRUSE, O. & HELLINGWERF, K. J. 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current opinion in biotechnology*, 24, 405-413.