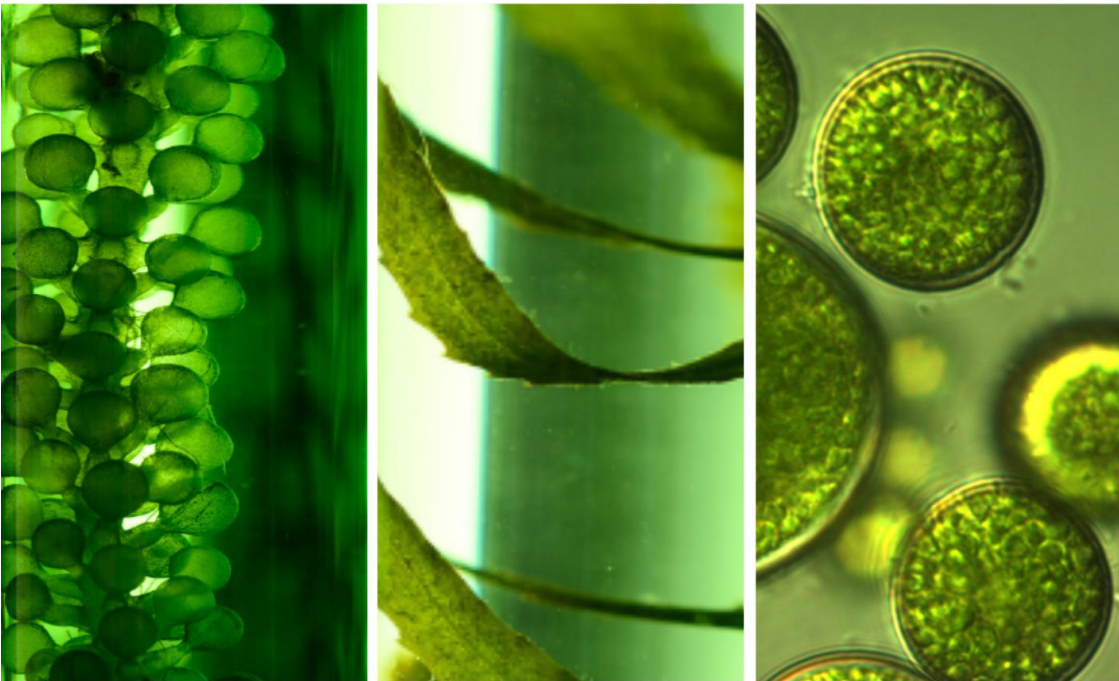




## Tomo I: Establecimiento del cultivo



**FORTALECIMIENTO DE LA FORMACIÓN CIENTÍFICA DEL PROGRAMA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL Y EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN GIADAI A TRAVÉS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE RADIACIÓN UV-C**

Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ

Editorial: Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ

Representante Legal: Oscar Orlando Porras Atencia Página web:

[www.unipaz.edu.co](http://www.unipaz.edu.co)

ISBN:

Ing. Esp. Ana Milena Salazar Beleño

**Directora Escuela de Ingeniería Agroindustrial**

PhD. Oscar Orlando Porras Atencia

Mba. Janice Ballesteros Bandera

Mic. Esp. Irina Alean Carreño

Ing. Esp. Ana Milena Salazar Beleño

Ing. Esp. Luisa Fernanda Medina Caballero

Ing. Daniel Augusto Buitrago Ibañez

Ing. Dally Esperanza Gafaro

Ing. Mg. Sandra Milena Montesino Rincón

### **Autores**

Ing. Esp. Luisa Fernanda Medina Caballero

Ing. Mg. Daniel Augusto Buitrago Ibañez

### **Diseño**

Dayanna Medina Muñoz

### **Fotografía**

Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y



Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial GIADAI  
**Grupo de Investigación**  
**PRÓLOGO**

La Escuela de Ingeniería Agroindustrial del Instituto Universitario de la Paz está comprometida con la implementación de tecnologías que permitan a los estudiantes fortalecer sus conocimientos a través de la investigación en nuevas fuentes de macronutrientes. Las microalgas hacen parte de esta evolución biotecnológica, por ser microorganismos fotosintéticos que crecen rápidamente debido a su estructura, entre ellas, la *Arthrospira platensis*, la cual es utilizada por su elevado contenido proteico y su alto valor nutricional; también es una fuente esencial de ácidos grasos y ácido linoleico, el cual, no se puede sintetizar químicamente y permite extraer compuestos con valiosas aplicaciones como pigmentos, aditivos alimentarios, antioxidantes, cosméticos y biofertilizantes.

El desarrollo del manual de microalgas tomo I: Establecimiento del cultivo, aporta innovación, técnicas y procedimientos para el aprovechamiento del cultivo de *Arthrospira platensis* con potencial uso en la industria alimentaria.

*Luisa Fernanda Medina Caballero*



# CONTENIDO

	pág.
<b>1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO DE MICROALGAS</b>	<b>6</b>
<b>1.1 DESINFECCIÓN DE MATERIALES Y ÁREA DE TRABAJO</b>	<b>7</b>
<b>1.2 AISLAMIENTO</b>	<b>7</b>
<b>2. MEDICIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE MICROALGAS</b>	<b>16</b>
<b>2.1 TASA DE CRECIMIENTO CELULAR</b>	<b>17</b>
2.1.1 Preparación de diluciones para el conteo	18
2.1.2 Recuento en cámara de Neubauer	19
<b>2.2 DENSIDAD OPTICA</b>	<b>21</b>
<b>2.3 PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA</b>	<b>22</b>
2.3.1 Cosecha de biomasa de la microalga <i>Arthrospira platensis</i>	22
2.3.2 Secado de la biomasa	23
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>24</b>



## TABLA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Red de fitoplancton.	8
Figura 2. Identificación de muestras en micrografía 10x.	9
Figura 3. Aislamiento por agotamiento o estría cruzada.	10
Figura 4. (A) Cultivo y (B) subcultivo. Aislamiento en caja Petri.	11
Figura 5. Micrografías del proceso de aislamiento de la microalga <i>Arthrospira platensis</i> en placa de agar. A) cultivo inicial 40x. B) Cepa aislada.	12
Figura 6. Contaminación de la cepa con bacterias.	12
Figura 7. Cultivo de microalga en rectores batch 5 L.	14
Figura 8. Fotobiorreactor de placa plana.	15
Figura 9. Vista microscópica de la <i>Arthrospira platensis</i> 15 días de cultivo.	17
Figura 10. Recuento celular en cámara Neubauer.	18
Figura 11. Diagrama de conteo en cámara Neubauer.	20
Figura 12. Micrografía de cámara Neubaer.	21



# 1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO DE MICROALGAS

La imposición de un ambiente artificial sobre una población celular que sobrevive en condiciones complejas, fluctuantes y siguiendo un ciclo de vida estacional, inevitablemente provoca un período de adaptación y/o selección fisiológica durante el cual el crecimiento de la población no ocurrirá o será muy lento.

Para obtener un cultivo unialgal, una especie debe ser aislada; tres técnicas principales tomadas de la microbiología están disponibles para obtener aislados unialgal: estriado y placas sucesivas sobre medio de agar; dilución en serie; y aislamientos mono celulares utilizando pipetas capilares. A fin de logra el cultivo se realizaron los siguientes procedimientos:

## 1.1 DESINFECCIÓN DE MATERIALES Y ÁREA DE TRABAJO

Los procedimientos de desinfección del área de trabajo y de los materiales de vidrio se realizaron según el protocolo de microalgas realizado por el CRIP<sup>1</sup>, donde se especifica que deben ser lavados con agua y jabón seguido de una desinfección con alcohol etílico al 70% y/o hipoclorito de sodio 200ppm.

## 1.2 AISLAMIENTO

La microalga se aisló empleando el método de **aislamiento por rayado en agar**, para ello se adiciona el agar nutritivo esterilizado a 15 psi y 121°C durante 30 min hasta completar 2/3 de la placa Petri. Posterior a la esterilización se adiciona el material algal y se realiza el rayado en zig-zag sobre la superficie de la placa. Las placas se mantienen en cámara de incubación hasta observar las primeras colonias. Se procede a observar a través del microscopio

---

<sup>1</sup> CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN PESQUERA. Protocolo de microalgas: Protocolo de microalgas para la producción de alimento vivo en las instalaciones del CRIP. Manzanillo, Colima: Tecnología y Planeación para el Desarrollo Sustentable, s.f. p. 21-22.



óptico la presencia de la cepa y a replicar el proceso donde se encuentre en mayor proporción.

A continuación, se presenta un protocolo de aislamiento de la cepa *Arthrospira platensis* basado en Arenas<sup>2</sup>

1. Inicialmente, se identifican fuentes hídricas eutrofizadas cercanas al desarrollo de la investigación para realizar el muestreo en un perímetro definido.
2. Para realizar el proceso de muestreo es necesario esterilizar los recipientes de vidrio para el almacenamiento de 250 a 500 ml de capacidad.
3. Las muestras pueden recolectarse directamente en los envases esterilizados o puede utilizarse una red de fitoplancton a fin de separar otros microorganismos.

Figura 1. Red de fitoplancton.



Fuente: Weather Controls.

4. La temperatura de almacenamiento de las muestras debe mantenerse similar al medio natural donde fue recolectada, una vez se trasladen al centro de investigación debe verificarse la presencia de la cepa en estudio.
5. Para verificar la presencia de la microalga se utiliza un microscopio óptico y se visualiza una gota de cada muestra, seleccionando la muestra que posea mayor presencia de la

---

<sup>2</sup> ARENAS AGAMEZ, Jaime Miguel. Capacidad de la microalga *Chlorella* sp. para fijar dióxido de carbono en un fotobiorreactor tubular helicoidal. Instituto Universitario de la Paz UNIPAZ. Barrancabermeja. 2019.





cepa en estudio. Si ninguna de las muestras contiene la microalga de interés se debe cambiar el punto de muestreo y repetir el procedimiento desde el apartado 3.

Figura 2. Identificación de muestras en micrografía 10x.



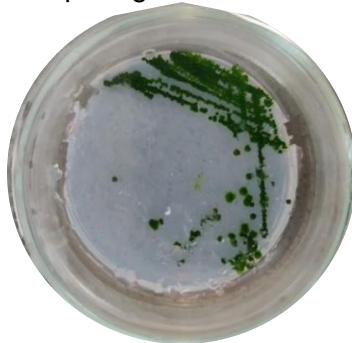
Fuente: Los autores.

6. Una vez sea identificada la muestra de mayor población celular, se procede a limpiar el área de trabajo y los materiales, para ello, se lava con agua y jabón seguido de una desinfección con alcohol etílico 70% y/o hipoclorito de sodio 200 ppm.
7. Para el realizar el aislamiento se utilizan cajas Petri y agar bacteriológico en relación 1,5% p/v en el medio de cultivo seleccionado de acuerdo a los nutrientes requeridos por la cepa en estudio. El agar y el medio nutriente se esterilizan a 121°C y 15 psi durante 15 min en un autoclave a fin de eliminar cualquier contaminante biológico.
8. En una cabina de flujo laminar o en un ambiente desinfectado y en presencia de mecheros encendidos a fin de impedir la contaminación cruzada del medio. Se procede a servir el agar con el medio nutriente en las cajas Petri y se espera unos minutos a que este gelifique.



9. Posterior a la gelificación del agar, las cajas Petri se colocan en forma invertida durante 20 minutos, para eliminar el exceso de humedad.
10. Para realizar la siembra o aislamiento por estrías, se toma un asa bacteriológica la cual se esteriliza utilizando un mechero y se enfría rápidamente introduciendo en el agar para tomar el inóculo de la muestra, se deposita en un costado del agar de una placa Petri, se estría a partir de ese punto pasando suavemente el asa en zig-zag por la superficie del agar sin rasparlo, rotar la placa en 1/3 y repetir el procedimiento 2 a 3 veces.

Figura 3. Aislamiento por agotamiento o estría cruzada.



Fuente: Los autores.

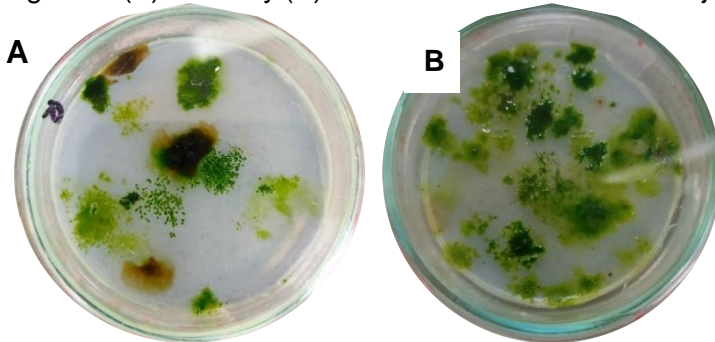
11. Para el almacenamiento se mantiene la posición invertida en un lugar aislado, con iluminación artificial en fotoperiodo 12:12 y temperatura acorde a la cepa en estudio. Un lugar aislado hace referencia a una cabina, cuarto o recipiente aséptico, de lo contrario, se puede cubrir el borde de las cajas Petri con papel parafilm, manteniéndolas aisladas de cualquier contaminación del medio externo. Para la cepa *Arthrospira platensis* se almacenó a 30°C en incubadora Biobase modelo BOV-D50.
12. Siete días después de la siembra se verifica la presencia de



la cepa utilizando un microscopio y se realiza directamente en la caja a fin de evitar contaminación de la muestra. El proceso se repite hasta que aumente la densidad celular.

13. Un mes después de la siembra, se realiza el subcultivo sembrando en una nueva placa con agar y medio nutriente, para esto es necesario repetir los pasos 6 al 12. Se recomienda utilizar un estereoscopio previamente esterilizado para facilitar la selección de la cepa y evitar tomar otro microorganismo presente. Una vez se obtenga la muestra se realiza el procedimiento descrito en el paso 10. Finalmente, este proceso se repite hasta lograr el aislamiento de la cepa, el tiempo dependerá de la asepsia aplicada en el proceso.

Figura 4. (A) Cultivo y (B) subcultivo. Aislamiento en caja Petri.



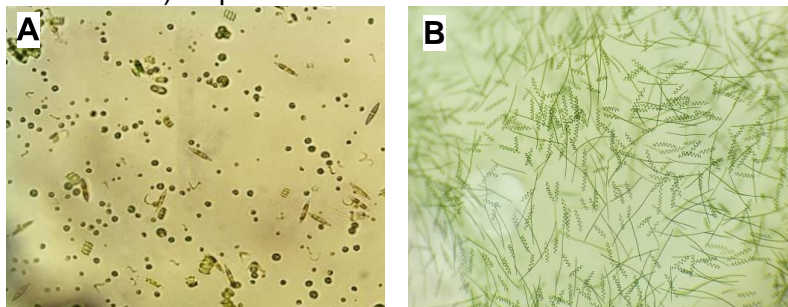
Fuente: Los autores.

14. Luego de obtener la cepa de la microalga aislada, se da inicio al escalamiento a fin de aumentar la densidad celular del cultivo. Para ello, se toma el inóculo empleando un asa bacteriológica y se transfiere a tubos de ensayo con 7 ml del medio de cultivo seleccionado.
15. Luego inocular los tubos de ensayo, se dejan en agitación en un agitador de cultivo, bajo las mismas condiciones de



iluminación y temperatura mencionadas en el apartado 11.

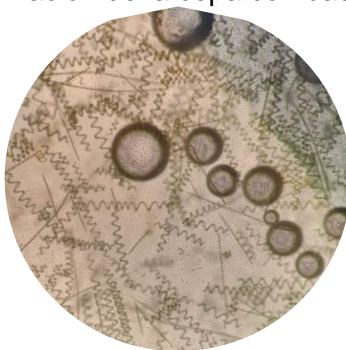
Figura 5. Micrografías del proceso de aislamiento de la microalga *Arthrospira platensis* en placa de agar. A) cultivo inicial 40x. B) Cepa aislada.



Fuente: Los autores.

16. Pasados siete días del escalamiento se verifica la presencia de la cepa, se toma una gota de cada tubo y se observa en el microscopio. Si se observan bacterias, se utilizan bactericidas como el Telurito de potasio ( $K_2TeO_3$ ) en concentración de 10 mg/L, otra alternativa en el uso de antibióticos, pero se debe tener en cuenta el tipo y la concentración ya que la bacteria puede generar resistencia o dañar la microalga.

Figura 6. Contaminación de la cepa con bacterias.



Fuente: Los autores.



### 1.3 CONSTITUCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para definir el medio de cultivo se realizó una búsqueda bibliográfica, como reporta Herrera<sup>3</sup>, el medio Zarrowk es el único medio convencional usado para la producción de *Spirulina* a gran escala. Tanto el medio Zarrowk como el medio Schlösser modificado tienen una buena producción, y el costo para producir 1 gramo de biomasa en masa seca es mucho menor que con otros tipos de medios de cultivo.

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo Zarrowk modificado.

<b>Macroelementos</b>	NaCl	5 g/L
	NaNO <sub>3</sub>	2 g/L
	NaHCO <sub>3</sub>	16 g/L
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/L
<b>Microelementos</b>	FeSO <sub>4</sub>	0,01 g/L
	MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/L
	CaCl <sub>2</sub>	0,04 g/L

Fuente: HERRERA PERALTA.

### 1.4 AUMENTO DEL VOLUMEN DE CULTIVO

Para aumentar el volumen de cultivo, una vez seleccionado el medio de cultivo Zarrowk modificado, el cual bibliográficamente registra los mejores resultados para la cepa en estudio, se procede a realizar la réplica por dilución en relación de 0,1:4 cepa en medio de cultivo en envases de 5 L como se observa en la figura 6, para lo cual, es necesario realizar una adaptación a las tapas de los

---

<sup>3</sup> HERRERA PERALTA, Celic, Cantú Lozano, Denis y Medina Meza, Ilce Gabriela. Determinación de perfil de aminoácidos y fitoquímicos de *Spirulina platensis* usando suero lácteo como fuente de carbono. 2019. <http://repositorios.orizaba.tecnm.mx:8080/xmlui/handle/123456789/331>



recipientes, realizando aberturas del tamaño del diámetro de las mangueras (0,5 cm) acopladas a bombas de aire, a fin de mantener agitación continua. Además, el cultivo se somete a fotoperiodos de luz 12:12.

Figura 7. Cultivo de microalga en rectores batch 5 L.



Fuente. Los autores.

Una vez se controlaron las condiciones de cultivo se replicó 40 L de cultivo y se implementó un fotobiorreactor de placa plana con una capacidad de 50 L, placas diseñadas en acrílico y conectado por tuberías de PVC sobre una base metálica. El fotobiorreactor contiene tres placas con toma muestras, dos lámparas de luz y un sistema de agitación con mangueras y bombas de aire como se observa en la figura 7. Para el mantenimiento del fotobiorreactor es necesario la limpieza en cada cosecha para evitar propagación de bacterias, sellar las placas con resina epoxica para evitar fugas y mantener una fuente de energía para garantizar el sistema de iluminación y agitación.



Figura 8. Fotobiorreactor de placa plana.



Fuente: Los autores.



## 2. MEDICIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE MICROALGAS

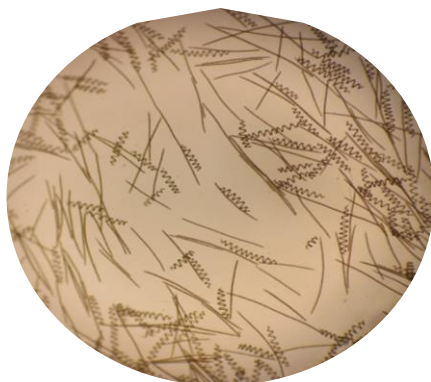


Una vez se establece el cultivo, se fijan los parámetros de medición pertinentes para controlar factores como: Tasa de crecimiento celular, densidad óptica y productividad de biomasa. A continuación, se describe el procedimiento para la determinación de estos factores de crecimiento.

## 2.1 TASA DE CRECIMIENTO CELULAR

El recuento celular es el más utilizado por ser un método sencillo y de bajo costo, el cual permite además un mejor seguimiento del cultivo mediante su inspección visual.

Figura 9. Vista microscópica de la *Arthrspira platensis* 15 días de cultivo.



Fuente. Los autores.

Una de las dificultades para el recuento celular en el microscopio es obtener una buena reproducibilidad, por lo cual es importante saber seleccionar el tamaño de la muestra, la dilución, el tipo de cámara de recuento, el objetivo del microscopio y la técnica de llenado de la cámara. En algunos casos, puede ser necesario corroborar el volumen de la cámara que se está utilizando. Para realizar el recuento celular se han diseñado diferentes cámaras que contienen un volumen determinado de muestra, para el desarrollo del estudio se seleccionó la cámara Neubauer.



Figura 10. Recuento celular en cámara Neubauer.



Fuente: Los autores.

**2.1.1 Preparación de diluciones para el conteo.** Se debe tomar una fracción de la muestra representativa de la población (200 ml). Para realizar el análisis se parte de una solución de concentración conocida denominada madre (relación 1:10 ó  $10^{-1}$ ). Para obtener este valor de dilución, se mide una cantidad de la muestra (ejemplo 1 ml) y se multiplica por nueve. El resultado será la medida del diluyente que se añade para lograr la dilución decimal. A partir de esta dilución se preparan las demás: relación 1:100, 1:1000,  $10^{-4}$ , etc.). Para este análisis es necesario cambiar la pipeta entre cada dilución y mantener en frío los tubos de las diluciones hasta comenzar el conteo con un tiempo máx. de 2 h de refrigeración.

Para obtener diferentes factores de dilución se aplica la siguiente ecuación:

$$F_D = \frac{\text{Soluto}}{\text{Solvente} + \text{Soluto}}$$

Donde,  $F_D$  es el factor de dilución adimensional, soluto es la muestra de estudio en ml y solvente es el diluyente utilizado en ml. Para determinar las siguientes diluciones se debe multiplicar por el factor de dilución inmediatamente anterior.



Para realizar las diluciones, es necesario esterilizar el material que se va a utilizar, posteriormente, se introduce un volumen de la muestra adecuado y se pesa. Utilizando una pipeta graduada, se mide la cantidad de diluyente para definir la dilución deseada.

**Selección del diluyente.** La principal característica del diluyente, es que no produzca modificaciones cualitativas, ni cuantitativas en la muestra. En microbiología, habitualmente se utilizan medios como: agua de triptona con sal, solución de Ringer  $\frac{1}{4}$  y agua de peptona tamponada. En el caso de las microalgas puede utilizarse el medio de cultivo.

**2.1.2 Recuento en cámara de Neubauer.** A continuación, se describe el proceso para conteo de microalgas en cámara Neubauer basado en Rojas<sup>4</sup>

1. Verifique que la muestra se encuentre diluida para iniciar a calcular la concentración de células por mililitro de muestra.
2. Adapte la cámara de Neubauer al microscopio en resolución 10x y localice la cuadrícula de esta. Identifique los cuatro cuadrantes de 16 recuadros cada uno, es importante reconocer los límites del cuadrante para realizar el conteo.
3. Ubique el cubreobjetos de la cámara al borde de la misma cubriendo la cuadrícula de conteo.
4. Homogenice en vórtex la muestra y con ayuda de una micropipeta con punta estéril, tome una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y permita que, por capilaridad la cámara absorba la muestra.
5. Proceda a verificar la homogenización de la muestra en la

---

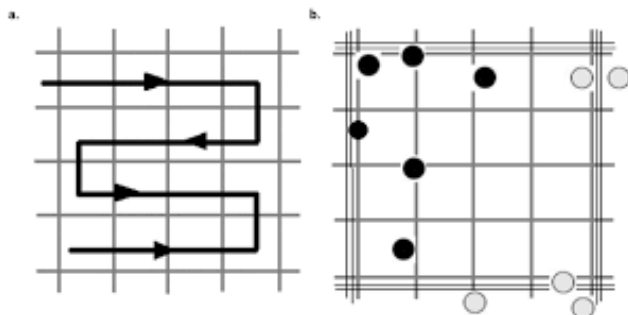
<sup>4</sup> ROJAS TRIVIÑO, Alberto. Concepto y practica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 2011.



cámara, de no obtener la homogeneidad, retire la cámara y repita el procedimiento.

- Finalmente, realice el conteo iniciando en el cuadro superior izquierdo del cuadrante y desplazando de izquierda a derecha, hasta llegar a la siguiente línea (figura 11). Registre sus datos y calcule la concentración de células/ml. Para evitar el doble conteo, el criterio es no contabilizar las células que tocan las líneas inferior y derecha que limitan el cuadrado.

Figura 11. Diagrama de conteo en cámara Neubauer.



Fuente: SANTOS DIAZ, Diana Marcela. Control de calidad microbiológico de plaguicidas a base de agentes de control biológico.

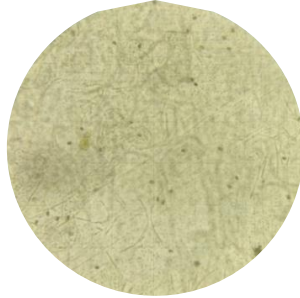
- Para obtener una estimación de la cantidad de células por mililitro de la suspensión original, el promedio del recuento obtenido en cada cuadrante se multiplica por el factor de conversión de la cámara y el factor de dilución.

$$X = \frac{N_{\text{células}}}{F_D} * F_{\text{cámara}}$$

Donde, X es la concentración de células/mL,  $N_{\text{células}}$  es el número de células obtenidas en el recuento celular de 16 cuadros en 4 cuadrantes y  $F_{\text{cámara}}$  es el factor de la cámara 1/10 mm.



Figura 12. Micrografía de cámara Neubaer.



Fuente: Los autores.

## 2.2 DENSIDAD OPTICA

La densidad optica es la cantidad de luz dispersada o transmitida a traves de un cultivo microbiano (efecto Tyndall). La dispersion es proporcional a la masa del cultivo y solo es valido en concentraciones mayores a  $10^7$  células/mL; donde, la proporcionalidad de la absorbancia y la masa se conservan. Con este fin se utiliza un espectofotometro para determinar la densidad optica.

Para evaluar el crecimiento de la cepa mediante espectrofotometría, se utiliza el espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S marca Thermo Scientific, a una longitud de onda de mayor absorbancia para la cepa en estudio de 680 nm (OD 680nm). En este método se implementa como blanco el medio de cultivo (Zarrouk modificado). El análisis se realiza cada 48 h durante 16 días desde el replique de la muestra, para determinar el aumento de la densidad celular del cultivo.

Procedimiento:

1. A cada dilución del recuento en cámara de Neubauer se realiza medición de absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis. Es importante calibrar el equipo con agua



destilada.

2. Grafique la curva de calibración obtenida de la densidad óptica en función de la concentración de células/mL en cada dilución.
3. Una vez obtenida la curva de calibración, proceda a determinar la densidad óptica de las muestras en estudio, el blanco utilizado para la medición es el medio de cultivo para el caso de la *Arthrospira platensis* es el medio Zarrouk.
4. Finalmente, determine la población celular en células/mL.

## 2.3 PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA

Para determinar la productividad en biomasa se toma como base el cultivo de 5 L y se evalúa la productividad de masa por volumen en un tiempo de 7 días, cosechando la biomasa como se describe a continuación:

**2.3.1 Cosecha de biomasa de la microalga *Arthrospira platensis*.** Para realizar el proceso de cosecha se implementa el método de separación por decantación.

Figura 13. Cosecha de biomasa.



Fuente: Los autores.

**2.3.2 Secado de la biomasa.** El proceso de secado se realiza en un deshidratador digital Weston Pro serie 280301 de bandeja a una temperatura de 50°C durante 8 h.

Figura 14. Secado de biomasa en deshidratador.



Fuente: Los Autores.

Finalmente, para la cuantificación de la productividad de biomasa seca por litros por días se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Productividad de biomasa} = \frac{m}{V * t}$$

Donde, m es la masa medida en g de la biomasa seca, V es el volumen en L cultivados y t es el tiempo en días en el cual se cosechó la biomasa.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENAS AGAMEZ, Jaime Miguel. Capacidad de la microalga *Chlorella* sp. para fijar dióxido decarbono en un fotobiorreactor tubular helicoidal. Instituto Universitario de la Paz UNIPAZ. Barrancabermeja. 2019.

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN PESQUERA. Protocolo de microalgas: Protocolo de microalgas para la producción de alimento vivo en las instalaciones del CRIP. Manzanillo, Colima: Tecnología y Planeación para el Desarrollo Sustentable, s.f. p. 21-22.

HERRERA PERALTA, Celic, Cantú Lozano, Denis y Medina Meza, Ilce Gabriela. Determinación de perfil de aminoácidos y fitoquímicos de *Spirulina platensis* usando suero lácteo como fuente de carbono. 2019. <http://repositorios.orizaba.tecnm.mx:8080/xmlui/handle/123456789/331>

ROJAS TRIVIÑO, Alberto. Concepto y practica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 2011.







**UNIPAZ**  
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE LA PAZ

ESCUELA DE  
**INGENIERIA**  
**AGROINDUSTRIAL**