

|                                                   |                                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>1 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |

## RECOMENDACIONES PARA EL CULTIVO DE *SPIRULINA*

### MANUAL DE LABORATORIO

Las microalgas azul-verde (cianobacterias) de los géneros *Spirulina* y/o *Arthrospira* se han ubicado entre los organismos más interesantes y de mayores perspectivas para el cultivo masivo. Desde más de 30 años a la fecha se han realizado diversos estudios que muestran las bondades de este microorganismo, cosa que se refleja actualmente por la producción masiva y comercialización que hacen algunas empresas en diversos países.

### IDENTIFICACIÓN

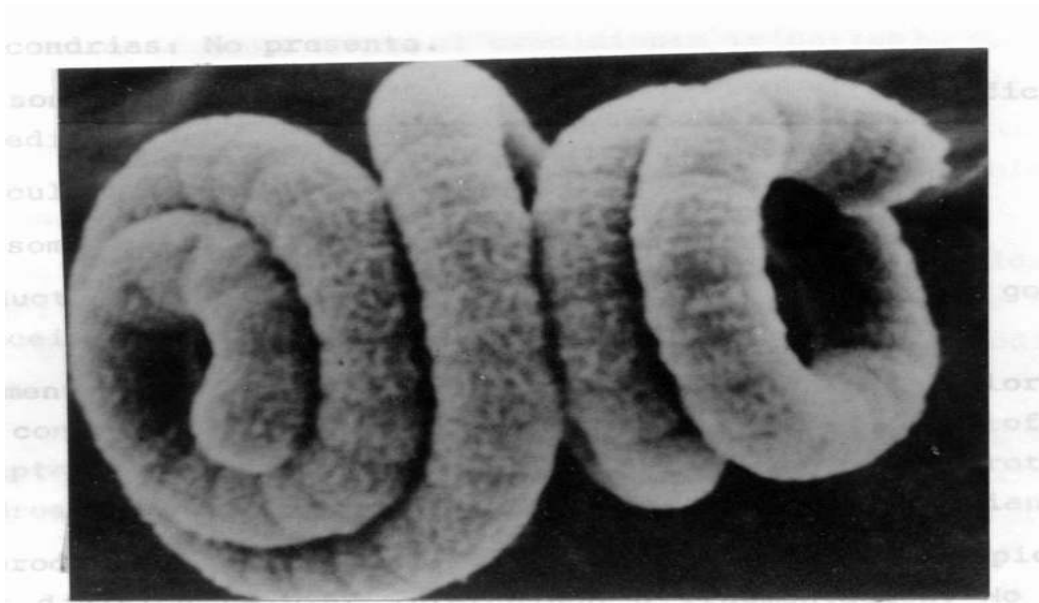
La taxonomía de esta cianobacteria es la siguiente:

|          |                                                |                  |
|----------|------------------------------------------------|------------------|
|          | <b>Procarionte</b>                             |                  |
|          | <b>Schizophyta</b>                             |                  |
| Phylum   | <b>Cyanophyta</b>                              | (Cyanochloronta) |
| Clase    | <b>Cyanophyceae</b>                            | (Cyanobacteria)  |
| Orden    | <b>Oscillatoriales</b>                         | (Nostocales)     |
| Familia  | <b>Oscillatoriaceae</b>                        |                  |
| Género   | <b>Spirulina/Arthrospira</b>                   |                  |
| Especies | <b>Spirulina platensis, Arthrospira maxima</b> |                  |

### Principales características de *Spirulina* y/o *Arthrospira* en su ambiente natural:

Se presentan como un filamento simple de forma espiralada o helicoidal. Poseen una morfología variable en función de múltiples factores, en algunos casos se presentan como un espiral más abierto o más cerrado, variando el diámetro de las espiras y en oportunidades como un filamento recto, sin espiras. Normalmente poseen entre 5 y 9 espiras, con una longitud que va de los 200 a los 500 µm y de 8 a 10 µm de grosor. Tienen una casi imperceptible movilidad propia, rotando muy lentamente sobre su eje longitudinal.

|                                                   |                                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>2 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Anibal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |



*Illustration 1: Micrografía de Spirulina (tomada con microscopio electrónico)*

## Algunas otras características de estas cianobacterias son las siguientes:

- Pared celular:** Es una estructura multiestratificada compuesta por mucopolímeros, polisacáridos, compuestos pépticos y mucilaginosos. La membrana celular prácticamente no contiene el material celulósico característico de los vegetales.
- Cloroplastos:** No presentan estos organelos celulares, en su reemplazo cuenta con tilacóides distribuidos al azar dentro de la célula sin estar envueltos por alguna membrana.
- Pigmentos:** Poseen solo clorofila A, no tiene clorofila B, contiene carotenoides (beta caroteno) y pigmentos tetrapirrólicos hidrosolubles (ficocianina, ficoeritrina, mixoxantofilas, oscilaxantinas, etc.).
- Núcleo:** No presentan, los ácidos nucleicos están distribuidos sin membrana dentro de la célula.

|                                            |                                   |                   |                   |
|--------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                    | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>3 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br>Revisión:02 | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |

-**Vacuolas:** No presentan, salvo las vacuolas de gas que regulan la flotación.

-**Mitocondrias:** No presenta.

-**Ribosomas:** Se encuentran presentes, según antecedentes tiene un coeficiente de sedimentación de 70 S.

-**Retículo endoplásmico:** No presentan.

-**Mesosomas:** Están presentes.

-**Productos de almacenamiento:** Glicogeno, cianoficina, gotitas de ácidos grasos, beta-caroteno.

-**Reproducción:** Principalmente por división celular intercalada o fragmentación y por fisión binaria apical en algunas ocasiones. No tiene reproducción sexual.

## ***Aspectos básicos sobre el crecimiento***

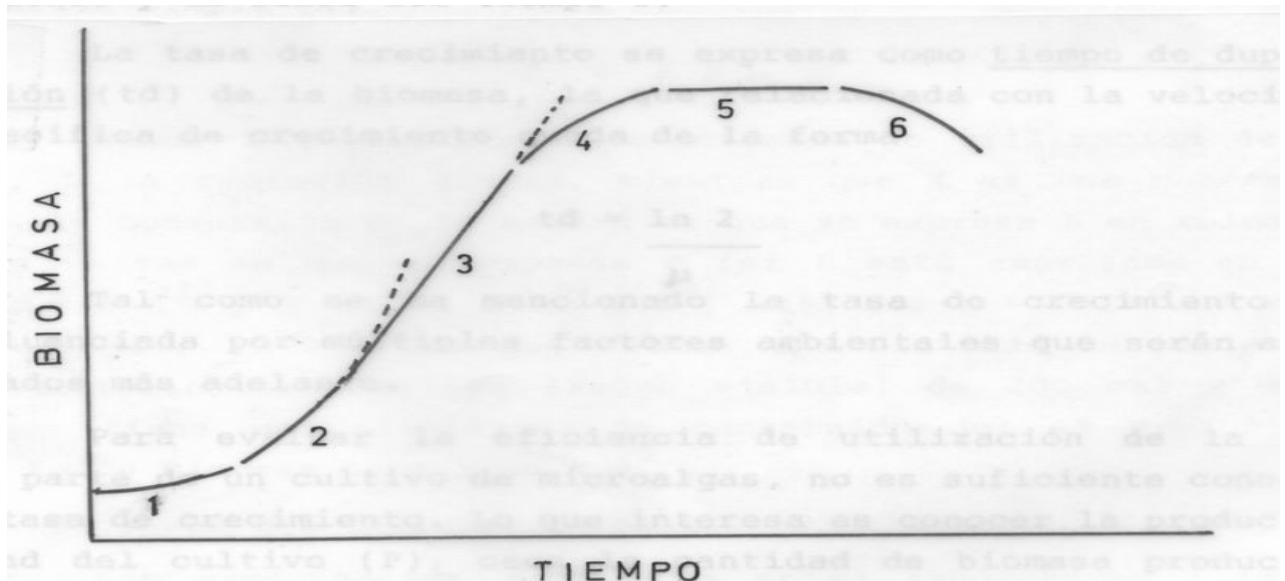
Para su cultivo, *Spirulina/Arthrospira* necesitan de un medio líquido compuesto fundamentalmente por sales minerales disueltas en agua. En este ambiente diversos factores físicos y químicos influirán sobre la velocidad de crecimiento. Así, habrá numerosas reacciones que tendrán mayor o menor incidencia en el desarrollo de un cultivo. Estas reacciones en ciertas oportunidades serán limitantes del crecimiento en forma relativamente independiente de otras simultáneas.

## **Evolución del crecimiento en relación al tiempo**

El crecimiento y desarrollo de un cultivo de *Spirulina/Arthrospira* está adaptándose continuamente a los cambios ambientales, por lo que es difícil afirmar en forma categórica, cuanto tiempo demorará en alcanzar una determinada concentración. Sin embargo, si se mantiene un régimen de cultivo batch en condiciones controladas, el crecimiento de esta microalga evoluciona pasando por las siguientes fases características:

|                                                   |                                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>4 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Anibal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |

1. Fase de adaptación (lag)
2. Fase de crecimiento exponencial (log)
3. Fase de crecimiento lineal
4. Fase de disminución del crecimiento
5. Fase estacionaria
6. Fase de muerte



*Illustration 2: Curva de crecimiento típico de Spirulina/Arthrospira*

El parámetro fundamental que caracteriza el crecimiento de un microorganismo se denomina **tasa o velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )** definida por la relación:

$$\ln \left( \frac{x}{x_0} \right) = \mu T$$

Donde  $X_0$  y  $X$  constituyen la concentración celular al comienzo y al final del tiempo  $T$ .

La tasa de crecimiento se expresa como **tiempo de duplicación ( $t_d$ )** de la biomasa, la que relacionada con la velocidad específica de crecimiento queda de la forma

|                                                   |                                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>5 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Tal como se ha mencionado la tasa de crecimiento es influenciada por múltiples factores ambientales que serán analizados más adelante.

Para evaluar la eficiencia de utilización de la luz por parte de un cultivo de microalgas, no es suficiente conocer la tasa de crecimiento. Lo que interesa es conocer la productividad del cultivo (P) o sea la cantidad de biomasa producida en un lapso de tiempo dado. La productividad es igual al producto de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) por la cantidad total de biomasa (x) o sea:

$$P = \mu \times V$$

Donde V, es el volumen total del cultivo. Sin embargo, cuando se trata de cultivos en reactores al aire libre, la relación se modifica para obtener la productividad por unidad de superficie.

$$P = \mu \times d$$

Donde d, es la profundidad del cultivo. Si la unidad de tiempo en que se expresa  $\mu$  es día, X en  $\text{gL}^{-1}$  y d en mm, la productividad P resulta expresada en gramos de biomasa  $\times \text{m}^{-2} \times \text{día}^{-1}$  que constituye la expresión más usada para referirse al rendimiento de un cultivo masivo.

En términos generales, la cantidad de biomasa posible de obtener en un cultivo masivo, puede preverse teóricamente conociendo la radiación solar diaria, la eficiencia de conversión fotosintética en biomasa y el contenido energético (calor de combustión) de la biomasa; de la forma expresada en una relación simple (5)

$$P = KEL$$

Donde E representa la eficiencia de utilización de la luz, L la radiación diaria, mientras que K es una constante para la conversión de la unidad en que se expresa L en relación a la unidad en que se expresa P (si L está expresada en  $\text{cal} \times \text{cm}^{-2} \times \text{d}^{-1}$  y P en  $\text{Kg} \times \text{ha}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ , entonces  $K = 0,17$ ).

|                                                   |                                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>6 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |

A modo de ejemplo, un cultivo que recibe una cantidad de radiación fotosintéticamente activa (en el rango visible) de  $200 \text{ cal x cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$  y que tiene una eficiencia de conversión del 4% produciría 135 Kg de biomasa seca  $\text{x ha}^{-1} \text{ x d}^{-1}$ .

La cuantificación en horas de cada fase será variable y representará la reacción de las células a los cambios ambientales, también dependerá de las condiciones del inóculo, del método de cultivo, del contenido de nutrientes en el medio de cultivo, de la temperatura ambiental, de la intensidad luminosa, etc.

Cuando se tienen unidades de producción, lo más práctico es mantener los cultivos permanentemente en fase exponencial. Lo que implica controlar las condiciones de cultivo en alguno o en varios de los factores que influyen en el crecimiento de las cianobacterias.

Dado que son varios los factores que afectaran el desarrollo de un cultivo, se analizará brevemente los más importantes:

## **FACTORES QUÍMICOS**

### **1) Salinidad del medio de cultivo:**

Si mantenemos condiciones controladas a nivel de laboratorio (temperatura constante 30,0 °C, luminosidad 5 a 10 Klux en períodos de 12/24 horas), la velocidad de crecimiento será independiente de la salinidad del medio de cultivo en un rango que va de los 10 a los 60 g/L. Habrá una disminución de la velocidad de crecimiento cuando la salinidad sea inferior a los 10 g/L o bien superior a los 60 g/L. Sin embargo, experimentalmente se ha determinado que se puede sobrevivir a una salinidad mínima de 2g/L y una máxima de 80 g/L.

### **2) pH del medio de cultivo:**

En condiciones controladas de temperatura y luminosidad, la velocidad de crecimiento será constante en un rango de pH comprendido entre 8,5 y 10,5. Disminuirá el cultivo cuando el pH sea inferior a 7,0 o superior a 11,5.

En su hábitat natural estas algas se reproducen en aguas alcalinas ricas en bicarbonatos, sulfatos y otros iones. Por esta razón el medio sintético óptimo para *Spirulina* y *Arthrospira* es

|                                                   |                                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>7 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |

el mismo y contiene una elevada proporción de  $\text{HCO}_3^-$ .

El pH del cultivo aumentará a medida que haya crecimiento, debido al consumo de  $\text{CO}_2$  proporcionado por los iones bicarbonato, así mismo la reacción de asimilación de los nitratos también contribuirá al aumento del pH. Sin embargo, este aumento de pH será recomendable siempre que se mantenga dentro de los límites descritos, por lo tanto en oportunidades habrá que reajustar el pH mediante la inyección de  $\text{CO}_2$ . Un valor de pH óptimo para mantener el crecimiento de estas microalgas en fase exponencial es 9,5.

### 3) Las sales utilizadas en el medio de cultivo:

Como todos los organismos las microalgas requieren de la presencia de un cierto número de elementos nutritivos en el medio de cultivo. Para el caso de *Spirulina* y *Arthrospira* a diferencia de otras microalgas, estas no necesitan vitaminas ni otros nutrientes preformados. Sus necesidades las podemos clasificar en macronutrientes (C, N, P, K, S, Mg, Na, Ca, Cl) y micronutrientes o elementos trazas (Fe, Zn, Cu, Ni, Co, W, etc.). Todos estos elementos son aportados por sus respectivas sales que se disuelven en agua, estableciéndose un equilibrio y manteniéndose en disolución.

La tabla 1. muestra la composición del medio de cultivo que se recomienda para la mantención de cepas y como medio control para experiencias de laboratorio.

| Compuesto                                            | Concentración g/L |
|------------------------------------------------------|-------------------|
| $\text{NaHCO}_3$                                     | 16,8              |
| $\text{Na NO}_3$ ( $\text{KNO}_3$ )                  | 2,5               |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$ ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) | 1                 |
| $\text{NaCl}$ ( $\text{KCl}$ )                       | 1                 |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  | 0,5               |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$           | 0,2               |
| EDTA - Na                                            | 0,08              |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,04              |
| $\text{Fe SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$          | 0,01              |
| Solución A <sub>5</sub>                              | 1,0 mL/L          |
| Solución B <sub>6</sub>                              | 1,0 mL/L          |

|                                            |                                   |                   |                   |
|--------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                    | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>8 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br>Revisión:02 | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |

### Composición de las soluciones de micronutrientes:

Solución A5 (en g/L):  $\text{H}_3\text{BO}_3 = 2,86$  ;  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O} = 1,80$  ;  
 $\text{Zn SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} = 0,22$  ;  $\text{MoO}_3 = 0,01$  ;  $\text{Cu SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O} = 0,08$  .-

Solución B6 (en mg/L):  $\text{NH}_4\text{VO}_3 = 22,9$  ;  $\text{Ni SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} = 47,8$  ;  
 $\text{Na}_2\text{WO}_4 = 17,9$  ;  $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3 = 40,0$  ;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O} = 4,4$  ;  
 $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O} = 120,0$ .- Diluidas en 1 L de solución 0,1 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

## FACTORES FÍSICOS

### 1) Luminosidad:

Diversas experiencias demuestran que estas microalgas son bastante sensibles a la luz cuando se someten a la exposición prolongada. Sin embargo, la experiencia de cultivos en gran escala demuestra también que es cultivable en zonas con alta irradiación solar, siempre y cuando se aplique una técnica de cultivo apropiada.

A nivel de laboratorio se ha observado que la velocidad de crecimiento aumenta a medida que se hace mayor la luminosidad, hasta un cierto límite luego del cual se hace constante. Si se mantiene constante la temperatura (30,0°C) y la iluminación en períodos de 12/24 horas, la velocidad de crecimiento aumenta entre 0 y 25 Klux manteniéndose constante a intensidades superiores.

Una iluminación intensa mantenida durante un largo tiempo lleva a un deterioro de los pigmentos y a la destrucción de los filamentos y del cultivo (fotolisis).

En general, respecto a la iluminación de los cultivos de microalgas, se pueden distinguir dos nociones: la primera es la alternancia de períodos luz y sombra (día/noche) y la segunda es la intermitencia, que corresponde a la necesidad de los filamentos de estar expuestos y luego protegidos de la luz durante períodos muy cortos y con una cierta frecuencia, durante el período iluminado (día). Por lo anterior es muy importante proveer al cultivo de un buen sistema de agitación que permita el mezclamiento eficiente.

### 2) Temperatura:

Para cualquier organismo este es un factor determinante de su crecimiento y desarrollo.

|                                                   |                                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>9 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                   |

Diversos tipos de algas y cianobacterias pueden vivir a temperaturas a veces muy específicas, calientes como aguas termales o volcánicas (60 a 70 °C) o aguas polares o de glaciares. Las cianobacterias *Spirulina/Arthrospira* están catalogadas como organismos mesofílicos cuya velocidad de crecimiento aumentará con la temperatura hasta un punto crítico, luego del cual se destruye en corto tiempo. En condiciones de laboratorio con régimen de luminosidad de 12/24 h, la velocidad de crecimiento comienza a disminuir entre los 35°C y 40°C. Entre los 22 y 35°C la velocidad de crecimiento se ajusta a una normal en que la concentración crece en forma exponencial.

Mantener una temperatura más elevada que 38°C por mucho tiempo, lleva a la destrucción del cultivo. Especialmente desfavorable es la mantención de altas temperaturas durante la noche. De acuerdo a experiencias, cultivos mantenidos a temperatura constante de 40°C se destruyen luego del cuarto día y a 47°C la destrucción se produce luego de una hora.

### 3) Tamaño del inoculo:

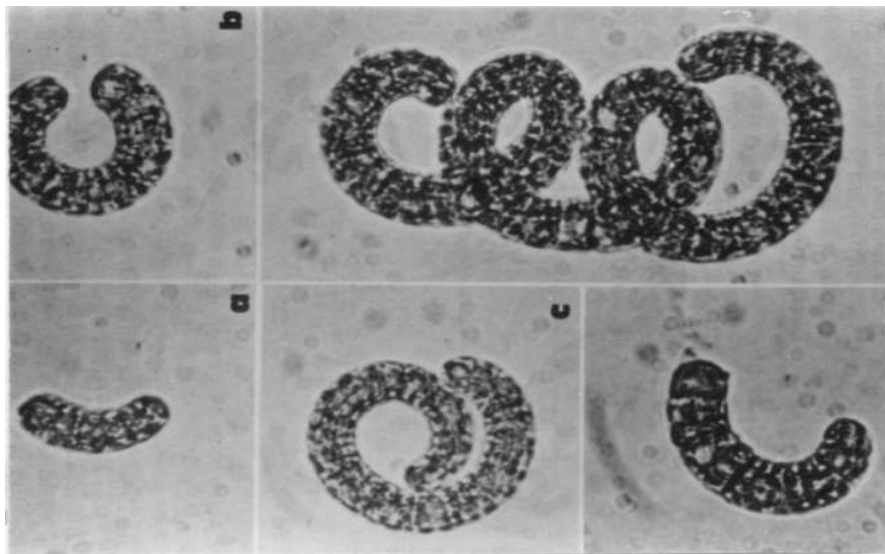
Como los demás este es un factor de gran importancia en el cultivo masivo de *Spirulina/Arthrospira*, cuando se trabaja a nivel de laboratorio en condiciones controladas, se puede partir con inóculos muy pequeños, ya que la luminosidad se puede regular a voluntad.

### 4) Agitación:

El comportamiento de las microalgas al estar en reposo es variable, algunas se mantienen en suspensión, otras tienden a precipitar y en el caso de *Spirulina/Arthrospira* se observa que algunas cepas tienen la propiedad de remontar a la superficie donde forman una capa que absorbe la luminosidad y CO<sub>2</sub>. Es importante que los cultivos se mantengan con agitación especialmente durante el período de luz, con miras a obtener un mayor rendimiento fotosintético. Además, la agitación permite homogeneizar la concentración de nutrientes, la temperatura, el pH, etc.

La agitación está correlacionada con la luminosidad y con la concentración de filamentos. Una agitación débil en condiciones de alta luminosidad, causa una disminución en la velocidad de crecimiento, en el caso que no se destruya el cultivo por foto-oxidación. Sin embargo, una agitación excesiva puede provocar la ruptura de los filamentos y con ello también la destrucción del cultivo por estrés mecánico.

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | <b>MANUAL DE CULTIVO</b>          | <b>MAN 01</b>     | Página<br>10 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |



*Illustration 3: Fases de crecimiento de un filamento de Arthrospira*

## **MANTENIMIENTO DE CULTIVOS EN LABORATORIO**

### **Reproducción inicial de la cepa en medio líquido.**

Luego de un período de adaptación que es variable para cada especie, las cepas pueden comenzar a cultivarse en pequeños volúmenes (tubos de ensayo). En esta fase también se utiliza un medio rico en todo tipo de nutrientes, no es necesario mantener con agitación constante, basta homogeneizar manualmente 4 a 5 veces por día.

Si disponemos de tubos grandes, se puede inyectar aire para lograr un crecimiento acelerado. Luego de obtenida una concentración adecuada (coloración verde intensa), se inoculan matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo. Si la concentración inicial no es inferior a los 100 mg (peso seco) por litro, se obtendrá un rápido crecimiento y se podrá pasar a cultivar volúmenes mayores.

Las condiciones para realizar la reproducción en laboratorio son las siguientes:

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | <b>MANUAL DE CULTIVO</b>          | <b>MAN 01</b>     | Página<br>11 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |

- Utilizar el medio de cultivo apropiado
- Temperatura controlada (25 a 32°C)
- Luminosidad no superior a los 5 Klux (durante el día)
- Períodos de luz y oscuridad (12/24 horas), aunque ciertos investigadores plantean que para las cianobacterias no es necesario un foto-período y pueden permanecer iluminadas de manera continua.
- Agitación por inyección de aire
- Usar una cámara de cultivo o un recinto aislado

El medio de cultivo rico en carbonato (y/o bicarbonato) permite que el pH aumente lentamente, además la inyección de aire con su pequeña concentración de CO<sub>2</sub> (0,03 – 0,04%) ayuda a que esa variación no sea rápida. De todos modos el pH puede llegar a 10,5 o más, en este nivel es recomendable hacer un reajuste mediante inyección controlada de CO<sub>2</sub>, esto hará descender el pH hasta al rededor de 9,0 donde se detendrá la adición de CO<sub>2</sub>.

Manteniendo estas condiciones se podrá obtener una concentración entre los 1000 y 1500 mg/L (materia seca), en un período que va de 8 a 15 días.

Un aspecto importante en los cultivos de laboratorio, es el mantenimiento del volumen del cultivo ya que de ello dependerá que se mantengan las condiciones de salinidad y concentración de nutrientes y también hacer la estimación correcta de la biomasa presente. Alcanzada la concentración mencionada anteriormente, se hará necesario aumentar el volumen del cultivo, replicarlo o usarlo de inóculo para volúmenes mayores (5 o 10 L).

## **MANEJO Y CONTROL DE CULTIVOS EN LABORATORIO**

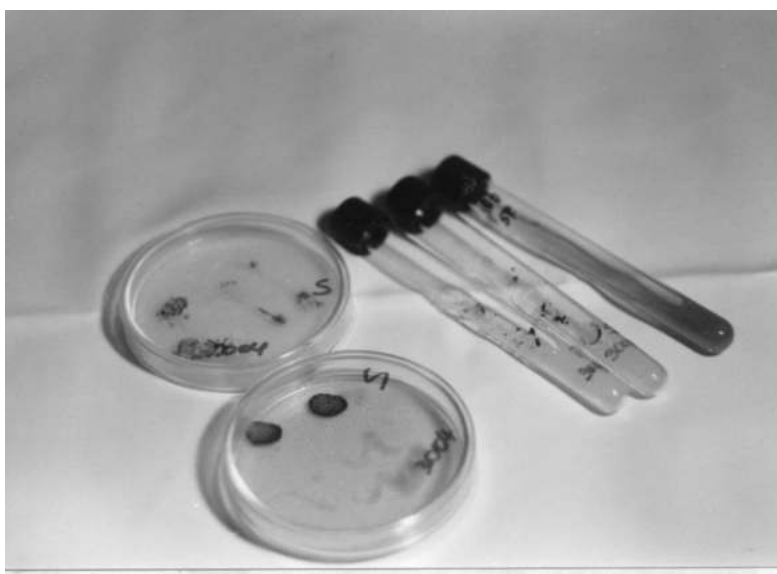
Se pueden distinguir tres actividades que hacen necesario un adecuado manejo y control de los cultivos:

### **1) Mantenimiento de cepas:**

Es una labor desarrollada dentro de una incubadora. No se requiere que los cultivos tengan una elevada velocidad de crecimiento, por lo tanto, habrá que regular las condiciones

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>12 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |

ambientales, para que la duplicación de los filamentos se realice en lapsos lo más prolongados posibles, sin que eso altere las propiedades de la cepa. Para este objeto se deben mantener cultivos en medio sólido, dentro de una cámara a temperatura de 22 a 25°C y luminosidad no superior a la entregada por un tubo fluorescente de 20 W a 50 cm de la superficie de las placas o tubos (1 a 1,5 KLux).



*Illustration 4: Cultivos de Spirulina en medio sólido*

También se mantienen cepas en medio líquido, para ello es recomendable usar tubos de ensayo o matraces pequeños (100 mL), en las mismas condiciones de temperatura y luminosidad mencionadas anteriormente, con la precaución de agitarlos manualmente unas 5 veces por día. Al utilizar matraces y volúmenes mayores en el mantenimiento de cepas, habrá que inyectar aire a fin de mantener homogéneo el cultivo.

Al usar el medio estándar no será necesario hacer suplementación de nutrientes, salvo inyectar CO<sub>2</sub> cuando el pH suba de 10,5. El control de los cultivos estará limitado a la medición del pH, la densidad óptica y la observación microscópica, cada 5 días.

## 2) Preparación de inóculos:

Tanto para realizar experiencias de laboratorio como para cultivar en escala superior, se

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | <b>MANUAL DE CULTIVO</b>          | <b>MAN 01</b>     | Página<br>13 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |

necesita esta actividad, que parte en el laboratorio en condiciones controladas. Dependiendo del uso del inóculo se definirá el ambiente propicio.

Si se trata de experiencias de laboratorio se trabajará con un medio específico y a temperatura, luminosidad y pH controlados, con inyección de aire filtrado y periódicamente de CO<sub>2</sub>. Si se trata de inóculos para cultivos al aire libre, se trabajará sin iluminación artificial ni control de temperatura. Es recomendable mantener las botellas o matraces cerca de una ventana donde les llegue luz natural durante el día, sin que les dé el sol directamente. Esto último es válido para los primeros días cuando la concentración de filamentos es baja (menos de 500 mg/L, materia seca). Cuando la concentración ha aumentado lo suficiente puede colocárselas bajo rayos del sol directamente por un par de horas todos los días, cuidando de mantener una agitación constante y verificando que la temperatura no supere los 35°C. Alcanzando una concentración superior a los 1.000 mg/L, el inóculo está en condiciones de ser utilizado.

El tipo de control será la medición diaria del pH, la densidad óptica (concentración) y el chequeo microscópico, también es recomendable verificar el peso seco por unidad de volumen cada 4 días.



*Illustration 5: Cultivos en incubadora con ambiente controlado.*

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>14 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |

### 3) Realización de experiencias puntuales:

El manejo estará dado por las características y el diseño de los experimentos, para lo cual se contará con los medios de cultivo y mecanismos de control ajustados a las necesidades. Sin embargo, estos no diferirán mucho de lo expuesto en las actividades anteriores.

**Los pasos para mantener los cultivos stock, son los siguientes:**

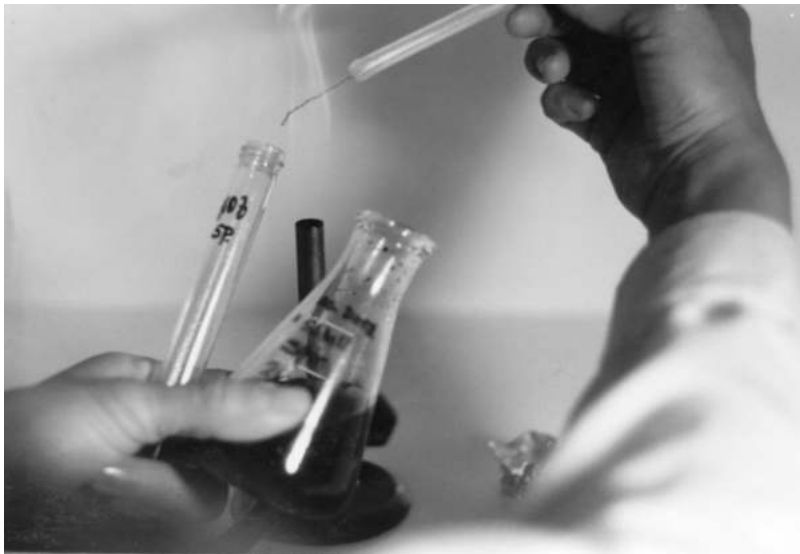
#### A) Cultivos en agar (Tubo o placa de Petri):

**Preparación:** Se prepara un volumen adecuado del medio de cultivo descrito anteriormente. El bicarbonato de sodio se disuelve en el 50% del agua destilada, en el otro 50% se disuelven todos los otros ingredientes del medio de cultivo. Se esterilizan separadamente y se agrega agar al 2% p/v. La mezcla se distribuye en tubos o placas y se deja enfriar.

**Inoculación:** Se pueden agregar 1 o 2 gotas de cultivo stock líquido directamente sobre el agar, o bien se aplican filamentos provenientes de otra placa. De esta última forma, el crecimiento en las placas o tubos inoculados, es más lento que al agregar gotas de cultivo líquido.

**Subcultivos:** Se harán cada 40 o 50 días

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | <b>MANUAL DE CULTIVO</b>          | <b>MAN 01</b>     | Página<br>15 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |



*Illustration 6: Inoculación en medio sólido.*

## **B) Cultivos en medio líquido:**

**Preparación:** Se esterilizan separadamente el bicarbonato y los demás nutrientes disueltos. Se dejan enfriar y luego se mezclan.

**Inoculación:** Se agregan de 1 a 10 mL de un cultivo stock concentrado, dependiendo si se trata de un tubo o matraz. En estas condiciones se pueden mantener cultivos de stock durante 30 o 40 días, con agitación constante.

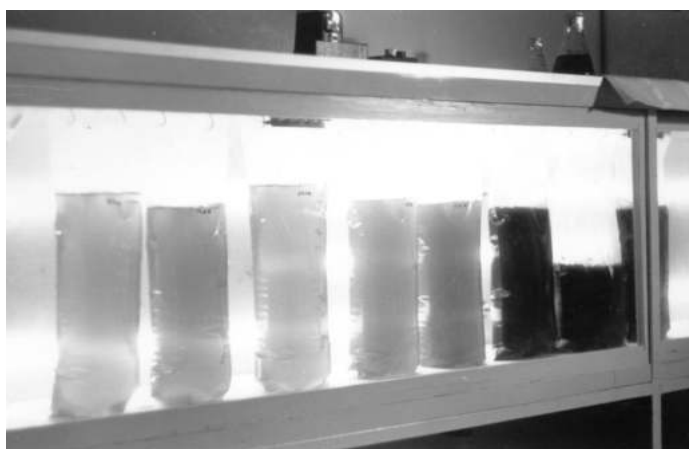
## **C) Desarrollo de inóculos:**

- Se debe definir el medio de cultivo a usar en escala superior. Lo normal serán aguas potables o salobres, enriquecidas con nutrientes específicos.
- Preparado el medio de cultivo se inoculará con algas provenientes de un cultivo stock concentrado, en un volumen adecuado a fin de que la concentración inicial no sea inferior a los 200 mg/L (peso seco). Para esto se usarán matraces de 2 y 4 L y garrafas de 15 a 20 litros a las cuales se inyectará aire proveniente de un compresor de aire o un blower (soplador)
- Los cultivos se pueden dejar al aire libre, pero a la sombra ya que en un comienzo no

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | <b>MANUAL DE CULTIVO</b>          | <b>MAN 01</b>     | Página<br>16 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |

deben ser expuestos a luminosidades superiores a los 10 Klux. Esto se hará en condiciones climáticas favorables, de lo contrario se mantendrá bajo techo o en invernadero.

- En estas condiciones los inóculos se podrán usar en cultivos al aire libre luego de 8 a 12 días, y así sucesivamente...



*Illustration 7: Cultivos de Spirulina en bolsas de 10 L en ambiente controlado.*

## ***MEDICION DE LA PRODUCTIVIDAD DE LOS CULTIVOS DE SPIRULINA/ARTHROSPIRA***

Durante el desarrollo de cultivos de microalgas es necesario llevar un control de crecimiento de la población. Este control se puede realizar de diversas formas, algunas bastante sencillas, otras más elaboradas. Para la medición de la productividad se pueden emplear los siguientes métodos:

### **a) Peso seco:**

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>17 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |

Tiene correspondencia con la medición de sólidos suspendidos totales, con ciertas modificaciones. Normalmente se utilizan pequeños filtros de fibra de vidrio, a través de los cuales se hace pasar un volumen de cultivo. La torta obtenida se lava con agua destilada para remover las sales del medio de cultivo.

Como generalmente se usa filtración con vacío, la torta queda bastante compacta. Luego de retirar el filtro con la biomasa se coloca en una estufa de secado a 60°C por espacio de 8 horas. Pasado ese tiempo se lleva a 105°C por 4 horas, haciéndose varias mediciones hasta alcanzar peso constante.

#### **b) Disco de Secchi:**

El uso de este simple instrumento nos permite estimar la concentración de un cultivo in situ, en forma bastante aproximada. El instrumento consiste en un círculo de color blanco de 10 cm de diámetro pegado en un extremo de una regla graduada en mm.

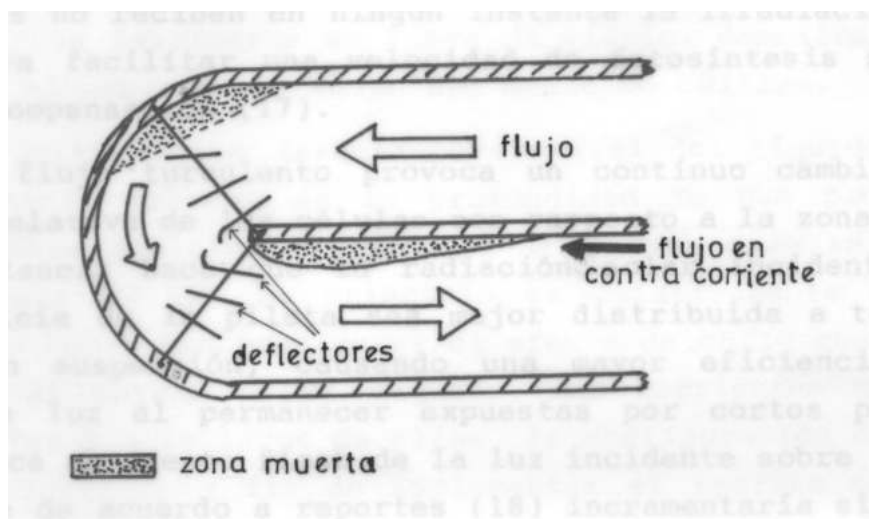
La medición consiste en determinar la profundidad a la cual el disco se hace invisible (punto de extinción). Si esto lo correlacionamos con el peso seco, tendremos un rápido auxiliar que nos permitirá tomar rápidamente las medidas que sean necesarias.

#### **c) Densidad óptica: (Absorbancia)**

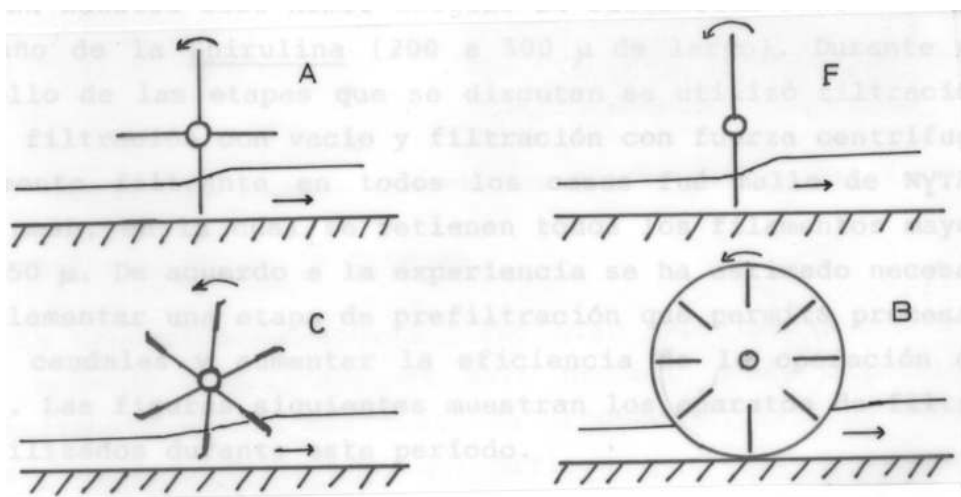
Es un método más elaborado para estimar la densidad o concentración de sólidos suspendidos de una muestra. Para esto se hace uso de un espectrofotómetro a una cierta longitud de onda, que para la *Spirulina/Arthrospira* se ha estandarizado a 560 nm. Si correlacionamos con el peso seco tendremos un método más seguro que el uso del disco de Secchi. Lo normal es hacer una curva de calibración entre el peso seco y la absorbancia a diferentes concentraciones de biomasa en el medio de cultivo. De esta forma tendremos una rápida manera de estimar con bastante precisión la concentración de filamentos en un cultivo y en cualquier momento.

|                                            |                                   |                   |                    |
|--------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                    | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>18 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br>Revisión:02 | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |

## ANEXO FOTOGRÁFICO



*Illustration 8: Ubicación habitual de puntos muertos en raceways. (Biorreactores)*



*Illustration 9: Esquemas de ruedas de paleta.*

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | <b>MANUAL DE CULTIVO</b>          | <b>MAN 01</b>     | Página<br>19 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |



*Illustration 10: Reactores de cultivo cubiertos, primer plano en fibra de vidrio, fondo en hormigón (Planta piloto en Antofagasta, 1986)*

|                                                   |                                   |                   |                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| NatWaves Asesores Ltda.                           | MANUAL DE CULTIVO                 | MAN 01            | Página<br>20 de 20 |
| Elaboró: Francisco Ayala J.<br><b>Revisión:02</b> | Revisó: Aníbal Ayala R.<br>Fecha: | Aprobó:<br>Fecha: |                    |



*Illustration 11: Molino de café para reducción a polvo.*