

# Protocolos de Microalgas de la Red RENUWAL (I)



\* ISBN: 978-84-15413-46-2

\* Editorial: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el D

---

\* Título: PROTOCOLOS DE MICROALGAS DE LA RED RENUWAL

---

\* Editor general: GOUVEIA, LUISA ; NAVARRO LLORENS, JUANA MARIA

---

\* Formato del producto: Digital: descarga y online  
*Detalle Formato:* PDF ; Formato fijo

---

\* Idioma de publicación: Español / Castellano

---

\* Número de edición: 1

\* Fecha de edición: 26/04/2022

País de edición: España

---

Materia destacada Thema: RNU : Sostenibilidad

\* Materia destacada IBIC: RNU : Sostenibilidad

---

\* Estado en la editorial: Activo

\* Disponibilidad: Disponible. Sin detalles

---

\* Precio: España  
01 (Gratis)

---

Las microalgas pueden ser utilizadas para la recuperación de nutrientes contenidos en diversos efluentes, contribuyendo de esta forma a la mejora de la sostenibilidad de multitud de procesos. Sin embargo, para poder conseguir procesos eficientes es necesario evaluar con detalle cada aplicación en función de los efluentes que se van a procesar. Dependiendo del proceso, la biomasa algal obtenida puede tener interés para su aplicación en distintos sectores y productos finales con diferente valor añadido, i.e., farmacéutico, cosmético, agroalimentario-ganadero-acuícola, ambiental, químico o incluso energético.

En el año 2019, varios grupos de investigación pertenecientes a diferentes países iberoamericanos junto con 6 empresas que trabajan con microalgas se unieron para solicitar al programa de Redes de la CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; <https://www.cytmed.org/es/cytmed>) la creación de una red temática para el tratamiento de efluentes con microalgas. Las Redes Temáticas que subvenciona este organismo, son asociaciones de grupos de investigación y desarrollo (I+D) de entidades públicas o privadas y empresas de los países miembros del Programa CYTED, cuyas actividades científicas o tecnológicas están relacionadas dentro de un ámbito común de interés y enmarcadas en una de las Áreas del Programa. En nuestro caso, la red se solicitó por el área industrial. La red RENUWAL 320RT0005 fue concedida en esta convocatoria del 2019 para iniciarse en el año 2020 durante un periodo de 4 años que, con motivo de la Pandemia, se ha extendido hasta el 2024 (<https://www.cytmed.org/es/renuwal>).

Las redes CYTED tienen como objetivo general el intercambio de conocimientos entre grupos de I+D y la potenciación de la cooperación como método de trabajo. El objetivo principal de la Red RENUWAL, es disponer de una Red multi- e interdisciplinar que permita la sinergia necesaria para impulsar las aplicaciones potenciales de las microalgas como agentes de reciclaje para la industria y el medioambiente en el marco de la Economía Circular. Para ello se analizan e implementan los procedimientos disponibles basados en microalgas que permitan el desarrollo de nuevas estrategias sostenibles de valorización de la biomasa algal. Como objetivos específicos de la propuesta, la Red trabaja en tres ejes distintos: a) Gestión del conocimiento; b) Gestión de la comunicación y c) Gestión educacional.

Dentro de la gestión de comunicación, queremos ofrecer parte de nuestro *know-how* mediante la publicación de procedimientos que puedan ser de interés para todos aquellos relacionados con el mundo de las microalgas. Es por eso, que en esta primera publicación se recopilan algunos de los protocolos utilizados para el trabajo con microalgas en diferentes disciplinas. Es nuestra intención seguir recopilando más protocolos de los centros que componen la red RENUWAL y ponerlos al servicio de aquellos interesados.

Agradecemos la ayuda que la Cyted nos ha brindado para que este proyecto pueda hacerse realidad, tanto por la concesión de la red como por ayudarnos durante todo el proceso de publicación. Para cualquier sugerencia, pregunta o aclaración pueden ustedes dirigirse por mail a las editoras. Esperemos que les guste esta iniciativa y la encuentren de utilidad.

**Editoras:**

JUANA MARÍA NAVARRO LLORENS (UCM) [jmnavarr@ucm.es](mailto:jmnavarr@ucm.es)

LUISA GOUVEIA (LNEG) [luisa.gouveia@lneg.pt](mailto:luisa.gouveia@lneg.pt)

## Contenido

<b>Protocolo de cultivo de la microalga <i>Botryococcus braunii</i> .....</b>	<b>5</b>
Andrés Alonso Arbeláez Pérez, Néstor David Giraldo Calderón, Lucía Atehortúa Garcés	
<b>Inmovilización de microalgas en perlas de alginato para su uso en procesos de biorremediación .....</b>	<b>12</b>
Patricia Laura Marconi, Myriam Zawoznik, María Daniela Groppa, Laura I. de Cabo	
<b>Flow cytometry-assisted method for cell disruption of microalgae.....</b>	<b>18</b>
Daniel Figueiredo, Teresa Lopes da Silva, Alice Ferreira, Alberto Reis, Luisa Gouveia <sup>1,2</sup>	
<b>Conjugación triparental en cianobacterias.....</b>	<b>29</b>
Sara Baldanta Callejo, Govinda Guevara, Juana María Navarro Llorens	
<b>Determinación de fosfato disuelto e intracelular en cultivos de la diatomea marina <i>Halamphora coffeaeformis</i> orientados a la producción de lípidos neutros para biodiesel.....</b>	<b>37</b>
Ana M. Martínez, Lucas A. Martín, Cecilia A. Damiani, Paolo M. Díaz Godoy, Patricia I. Leonardi, Cecilia A. Popovich	
<b>Identificación y cuantificación de clorofila <i>a</i> y fucoxantina en cultivos de la diatomea marina <i>Halamphora coffeaeformis</i>, aislada del estuario de Bahía Blanca (Pcia. de Buenos Aires, Argentina).....</b>	<b>47</b>
M. Alejandra Sequeira, M. Belén Faraoni, Ana M. Martínez, M. Cecilia Damiani, Patricia Leonardi, Cecilia A. Popovich	
<b>Analysis of microalgae lipids from adapted Bligh Dyer followed by derivatization and GC-MS analysis.....</b>	<b>56</b>
Gisele Alves, Maiara Priscilla de Souza, Liange Reck, Carlucio Roberto Alves, Rosana de Cassia de Souza Schneider	
<b>Determinación de carbohidratos totales por fenol-sulfúrico (DuBois-Gilles-Hamilton) .....</b>	<b>62</b>
Enrique Romero Frasca, Germán Buitrón	
<b>Protocolo de Preparación y Evaluación de Pilas de Combustible de Óxido Sólido .....</b>	<b>69</b>
Araceli Fuerte, Rita X. Valenzuela, Paloma Ferreira-Aparicio, Beata Bochentyn	
<b>Método de cálculo del potencial bioquímico de metano (BMP), mediante el equipo AMPTS II, para la investigación en digestión anaeróbica. ....</b>	<b>84</b>
Juan Luis Ramos, Nely Carreras	

# Determinación de fosfato disuelto e intracelular en cultivos de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis* orientados a la producción de lípidos neutros para biodiesel

Ana M. Martínez<sup>1</sup>, Lucas A. Martín<sup>2,3</sup>, Cecilia A. Damiani<sup>2,3</sup>, Paolo M. Díaz Godoy<sup>2</sup>, Patricia I. Leonardí<sup>2,3</sup>, Cecilia A. Popovich<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química - Instituto de Química del Sur (UNS-CONICET). Universidad Nacional del Sur. Alem 1253. B 8000, Bahía Blanca, Argentina.

<sup>2</sup>Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA). Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) CONICET-UNS, Camino La Carrindanga, Km

<sup>3</sup>Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. UNS, San Juan 670, B 8000, Bahía Blanca, Argentina.

<sup>4</sup>Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS) Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Bs. As (CIC-UPSO) Ciudad de Cali 320, B8000, Bahía Blanca, Argentina.

Correspondencia: [bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar) (Cecilia A. Popovich)

## RESUMEN

Este protocolo describe el procedimiento para determinar el contenido intracelular de fosfato en una diatomea marina y fosfato disuelto en el medio de cultivo.

El tratamiento de aguas residuales es una necesidad emergente ante el aumento de la población humana y la actividad industrial. Un problema para resolver en los actuales sistemas de tratamiento es la captación de nitrógeno y fósforo. Algunas especies de diatomeas acumulan altas concentraciones de nutrientes intracelularmente. La rápida incorporación de fosfato y su almacenamiento en vacuolas resulta en una potencial aplicación del cultivo en medios de aguas residuales, como biotratamiento terciario. En este trabajo, el cultivo de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis* está orientado a promover la acumulación de lípidos neutros para la obtención de biodiesel, sin embargo, el procedimiento analítico descrito para el seguimiento de la concentración de fosfato es aplicable a otros fines del cultivo. Determinar la concentración intracelular presenta varios puntos críticos. Se propone la estimación experimental de la concentración de fósforo, de la concentración microalgal y del biovolumen. Se obtuvieron resultados satisfactorios y adecuados para la comparación entre las distintas fases del cultivo.

## INTRODUCCION

El aumento de la población humana y de la actividad industrial genera cada vez más cantidad de efluentes residuales que necesitan ser tratados. Por otro lado, la escasez de los recursos hídricos incentiva la necesidad de recuperar las aguas residuales para distintos usos. La eliminación de la materia orgánica es uno de los aspectos más controlados en el proceso de depuración. No ocurre lo mismo con la eliminación del nitrógeno (N), fósforo (P) y otras sales disueltas que involucra metodologías más complejas. Las aguas residuales con altas concentraciones de N y P son una causa

importante de eutrofización en los cuerpos de agua naturales donde son vertidas, y representan un recurso inadecuado para su reutilización. En general, los tratamientos terciarios convencionales eliminan estos nutrientes, pero a expensas de un alto consumo de energía y baja eficiencia, a lo que debe sumarse la pérdida de estos elementos para el sistema productivo comercial. En contraposición, la utilización de microalgas se presenta como un bio-tratamiento terciario alternativo de gran interés a nivel mundial [1,2] debido a su alta eficiencia de remoción de nitrógeno y fósforo (entre un 80% y 100%). Además, estos microorganismos tienen la capacidad de transformar estos nutrientes en biomasa con potenciales aplicaciones industriales. En particular, algunas especies de diatomeas sometidas a altas concentraciones de nutrientes tienen la capacidad de acumular nitrato, fosfato y silicatos en vacuolas como una forma de reserva [3]. Muchas especies también pueden sintetizar lípidos, péptidos, aminoácidos, pigmentos antioxidantes y fitoesteroles [4]. Así, la biomasa producida a partir de efluentes residuales y bajo un concepto de biorrefinería puede representar una fuente de materia prima de interés para industrias de biofertilizantes, biocombustibles y alimento para animales, entre otros. Además, la depuración de los efluentes representa una ventaja ambiental y económica al permitir la reutilización del agua para otros fines comerciales de una manera sustentable.

En particular, en el presente trabajo se describe el protocolo de determinación de fosfatos disuelto e intracelular de la diatomea *Halimnobia coffeaeformis* cultivada en agua de mar con fines bioenergéticos. Esta metodología puede ser de utilidad en cultivos de diatomeas en aguas residuales con altas concentraciones de fosfatos, para evaluar tanto la remoción del fosfato disuelto como también para analizar el almacenamiento del fosfato intracelular.

## **PROTOCOLO**

### **DETERMINACION DE FOSFATO**

La estimación de la concentración de fosfato se realiza según Murphy y Riley [5], sobre alícuotas previamente filtradas por filtros de fibra de vidrio de 0,7  $\mu\text{m}$  de poro (GF/F). El método empleado se basa en reacciones específicas para el ión ortofosfato, que reacciona en medio ácido con el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio potasio para formar ácido fosfomolibdico. Este heteropoliácido es reducido por ácido ascórbico a azul de molibdeno, detectado a  $\lambda=885$  nm en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60 empleando celdas de 1 cm. El segmento de calibración empleado es de 0,3 – 10  $\mu\text{M}$ .

#### **1. Preparación del material**

1.1 Preparar una disolución de ácido clorhídrico (HCl) al 10% agregando 100 mL de HCl al 32-36% a 900 mL de agua ultrapura para lograr un volumen final de 1 L. Guarde en recipiente de polietileno de alta densidad (HDPE). **PRECAUCIÓN:** disponga de los elementos de seguridad personal para manipulación de corrosivos. Evite que los vapores se liberen en el área de trabajo. Adicione lentamente el ácido al agua para evitar salpicaduras y aumento de la temperatura.

1.2 Lave todo el material a emplear en el laboratorio y en el muestreo con detergente libre de fosfato, enjuague con abundante agua y deje en remojo en HCl 10% durante 2 horas. Enjuague con agua ultrapura y mantenga el material reservado. Asegúrese que no queden restos ácidos en el material. **PRECAUCIÓN:**

disponga de los elementos de seguridad personal para corrosivos. Use guantes y evite las salpicaduras en la piel, use protección de ojos y rostro.

1.3 Coloque los filtros de fibra de vidrio en sobres de papel aluminio individuales y coloque en la mufla los sobres abiertos. Combustione a 450°C durante 4 horas. Cierre los sobres para almacenar en lugar seco hasta su uso.

1.4 Emplee pinzas y guantes libres de polvo para manipular los filtros y el material.

1.5 Disponga de agua de mar artificial. Ajuste la salinidad a la salinidad del cultivo en caso de ser necesario.

## 2. Toma de muestras y filtrado

2.1. Defina si empleará muestra única, duplicados o más y tome muestras independientes y representativas en los frascos de muestreo.

2.2. Traslade los frascos con las muestras cerrados, al abrigo de la luz y en lugar fresco hasta el laboratorio.

2.3. Coloque un filtro de fibra de vidrio de 0,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro previamente acondicionado en el portafiltro y enjuague con agua de mar artificial.

2.4. Coloque un tubo para coleccionar el filtrado o cambie el kitasato por uno limpio.

2.5. Filtre, a presión reducida (1/8 atm), un volumen exactamente medido de la alícuota de muestra. En general 10,00 mL puede ser suficiente, dependiendo de la densidad del cultivo. Descarte como lavado los primeros mL del filtrado coleccionados en el tubo.

2.6. Retire el tubo con el filtrado y reserve para la cuantificación de fosfato en el medio de cultivo. Guarde a -20 °C hasta su análisis.

2.7. Enjuague el filtro con el material retenido antes de retirarlo del portafiltro, haciendo pasar 3 fracciones de 3 a 5 mL de agua de mar artificial para eliminar restos de medio de cultivo.

2.8. Retire el filtro y colóquelo en el tubo para la extracción de fosfato intracelular.

2.9. En este punto, puede almacenar a -20 °C hasta continuar el procedimiento de extracción.

## 3. Extracción de fosfato intracelular

3.1. Adicione 5 mL de agua ultrapura al tubo de extracción conteniendo el filtro con el material microalgal. Incorpore un "blanco" a partir de este punto, colocando un filtro limpio del lote que está empleando en un tubo e incorpore al procedimiento.

3.2. Realice el procedimiento de disrupción celular con una sonda ultrasónica en el tubo de extracción. **PRECAUCIÓN:** emplee la protección auditiva en este procedimiento.

3.3. Someta a 70°C durante 3 minutos como tratamiento adicional de disrupción y liberación del contenido intracelular.

3.4. Filtre a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,7  $\mu\text{m}$  (previamente acondicionado según el punto 1.3) recolectando el filtrado en tubos limpios. Enjuague el filtro haciendo pasar 2 porciones de 2 mL de agua de mar artificial coleccionando el lavado en el mismo tubo. Deje enfriar.

3.5. En este punto se puede interrumpir el procedimiento y conservar a -20 °C hasta su cuantificación.

3.6. Lleve a volumen de 10,00 mL con agua de mar artificial empleando material volumétrico.

#### 4. Cuantificación de ortofosfato

4.1. Reactivos (grado reactivo analítico)

**PRECAUCIÓN:** Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.

4.1.1. Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 5N: en una botella de vidrio agregue 50 mL de agua ultrapura, luego mientras agita continuamente agregue lentamente 7 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado ( $\delta=1.84 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Se puede almacenar indefinidamente.

**PRECAUCIÓN:** evite el contacto con piel y ojos, produce lesiones muy graves. Evite liberar vapores al lugar de trabajo.

4.1.2. Tartrato de Antimonio y Potasio  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ : disolver 0,136 g de  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  ( $M=334 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) en agua ultrapura y llevar a 50 mL. Puede almacenarse refrigerado en botella de vidrio o plástica hasta 2 meses.

**PRECAUCIÓN:** Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol. Evite dispersar en el ambiente de trabajo.

4.1.3. Molibdato de Amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : en una botella de polietileno de alta densidad (HDPE) disolver 1,5 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $M = 1236 \text{ g mol}^{-1}$ ) en agua ultrapura y llevar a 50 mL. Se puede almacenar varias semanas a temperatura ambiente en oscuridad; se debe reemplazar si aparece precipitado.

4.1.4. Ácido Ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ): disolver 1,35 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  ( $M = 176 \text{ g mol}^{-1}$ ) en 25 mL de agua ultrapura. Preparar diariamente o mantener a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  en recipiente plástico.

4.1.5. Disponga de solución estándar de fosfato: 1000 mg en 1000 mL ( $\pm 0,4 \%$ )

4.1.6. Solución de trabajo: diluya el estándar (1:200) tomando 150  $\mu\text{L}$  y llevando a 25,00 mL en un matraz aforado clase A.

4.1.7. **Reactivo Color:** a 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N agregue 1 mL de tartrato de antimonio y potasio, 2 mL de molibdato de amonio y 2 mL de ácido ascórbico. Es suficiente para 20 muestras. Descarte después de usar, no se conserva.

4.2 Calibración y registro de señales

4.2.1. Encienda el espectrofotómetro para estabilizar y seleccione 885 nm como longitud de onda.

4.2.2. Prepare la curva de calibrado con testigos entre 0,3  $\mu\text{M}$  y 8  $\mu\text{M}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$  llevando por ejemplo 60  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 600  $\mu\text{L}$ , 800  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo a un volumen final de 10,00 mL con agua de mar artificial.

4.2.3. Coloque 5,00 mL de cada muestra y blanco de procedimiento en tubos limpios y etiquetados.

4.2.4. Adicione a los testigos, muestras y blancos 500  $\mu\text{L}$  de Reactivo Color, tape y agite.

4.2.5. Espere el desarrollo de color a temperatura ambiente ( $<30^\circ\text{C}$ ) [6].

4.2.6. Realice la lectura de la Absorbancia entre los 15 min. y las 2 h.

4.2.7. Ajuste mediante regresión lineal y evalúe la calibración.

**PRECAUCIÓN:** disponga los residuos adecuadamente. El tartrato de antimonio y potasio es tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.



## 5. Concentración celular y biovolumen

- 5.1. Agite suavemente la muestra para extraer 1 mL de cultivo y colocar en la cámara de Sedgwick-Rafter.
- 5.2. Cuente N campos y estime el número de células por mL.
- 5.3. Agite suavemente la muestra para extraer 2 mL de cultivo.
- 5.4. *Halamphora coffeaeformis* presenta frústulos elíptico-lanceolados con ápices truncados. A partir de esta forma y de acuerdo con [7] estime el biovolumen en  $\mu\text{m}^3$

## 6. Estimación del contenido intracelular

- 6.1. Calcular el contenido de  $\text{PO}_4^{3-}$  intracelular ( $C_1 \pm S_1$ ) en mM como sigue:

$$C_1 \pm S_1 = P_1 \pm DE_{P_1} * (1/ N_1 \pm DE_{N_1}) * (1/ B_1 \pm DE_{B_1})$$

$$C_1 = P_1 * (1/ N_1) * (1/ B_1)$$

$$S_1 = C_1 \sqrt{\left(\frac{DE_{P_1}}{P_1}\right)^2 + \left(\frac{DE_{N_1}}{N_1}\right)^2 + \left(\frac{DE_{B_1}}{B_1}\right)^2}$$

$C_1$ : VALOR MEDIO DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR

$S_1$ : INCERTIDUMBRE DEL VALOR DE CONCENTRACIÓN INTRACELULAR

$P_1 \pm DE_{P_1}$ : concentración de fosfato ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ )  $\pm$  desviación estandar

$N_1 \pm DE_{N_1}$ : concentración celular (Numero de células. $\text{mL}^{-1}$ )  $\pm$  desviación estandar

$B_1 \pm DE_{B_1}$ : biovolumen (mL)  $\pm$  desviación estandar

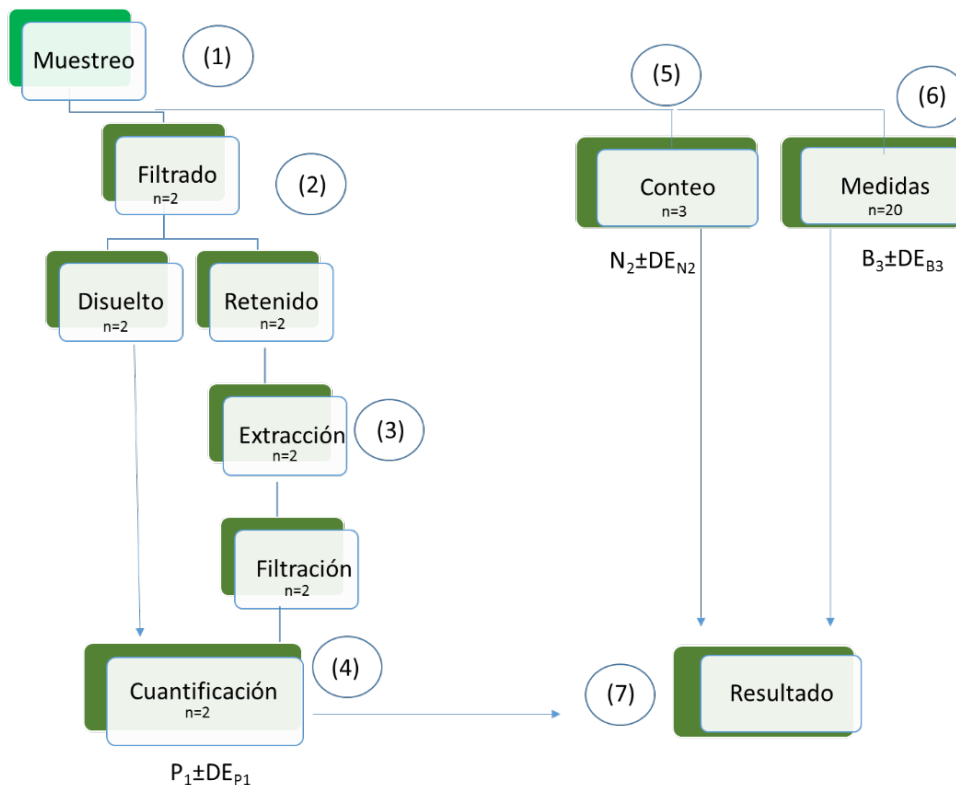
Si se tomaran dos o más muestras independientes en el punto 1, se expresaría como  $C \pm ES$  donde C es el valor promedio de las concentraciones de las réplicas  $C_1, C_2, \dots, C_n$  y la incertidumbre sería el error estándar de del valor medio expresado como  $ES = S/\sqrt{n}$  con n: número de muestras independientes.

## 7. INCERTIDUMBRE Y ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EN EL MEDIO DE CULTIVO

De la curva de calibrado se obtiene la concentración por duplicado  $C_{D1}$  y  $C_{D2}$  expresándose el resultado como la media  $\pm$  el desvío estándar.

## RESULTADOS

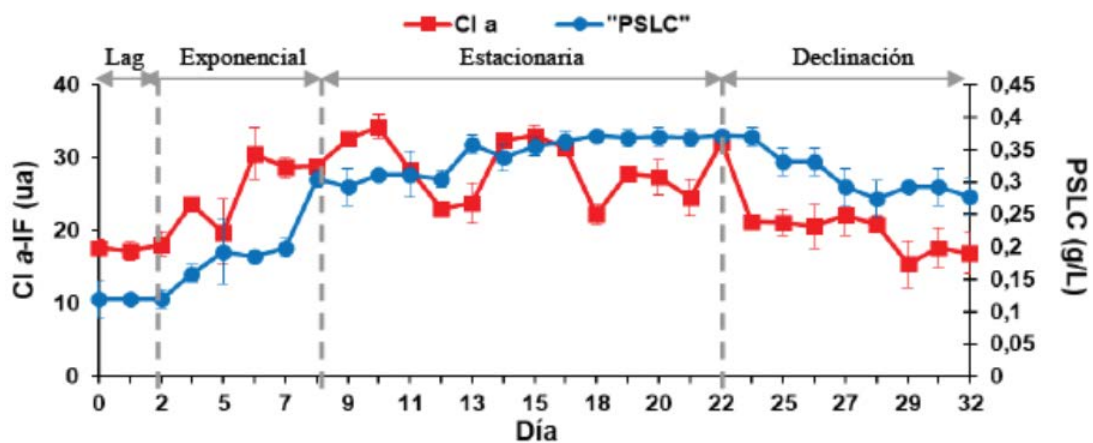
La Figura 1 presenta el proceso completo, incluyendo el muestreo y se indican las principales fuentes de incertidumbre en el procedimiento. Los componentes son agrupados en tres: a) estimación de la concentración de fósforo (P), b) estimación de la concentración microalgal (N) y c) estimación del biovolumen (B), las cuales son valoradas experimentalmente como la dispersión de medidas repetidas, expresándose como una desviación estándar según Ramsey et al. [8].



**Figura 1.** Representación esquemática general del protocolo, marcando las principales fuentes de incertidumbre. (1) Incertidumbre debida a la heterogeneidad del cultivo. (2) Incertidumbre sobre la retención de las células sin perder contenido intracelular. (3) Incertidumbre en la eficiencia en la disrupción celular. (4) Incertidumbre en el proceso de calibración. (5) Incertidumbre en la distribución al azar de las células en la cámara de recuento. (6) Incertidumbre en la medición micrométrica de las dimensiones celulares.

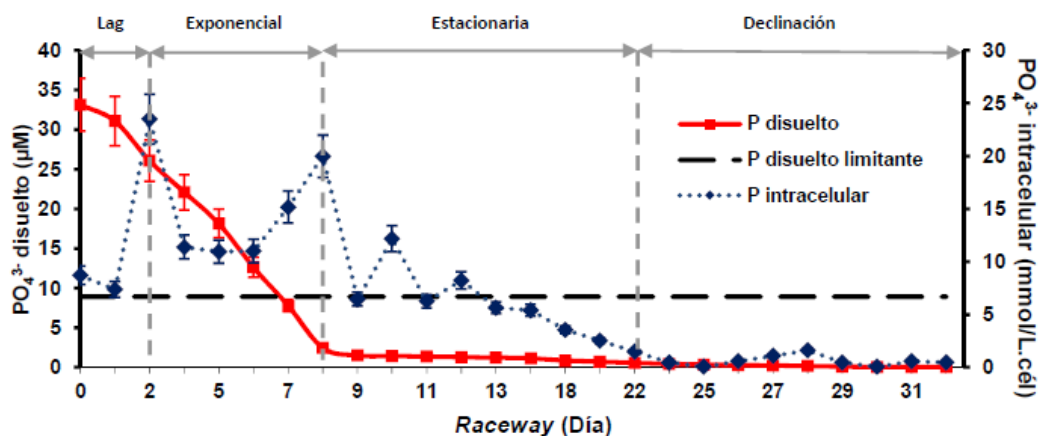
La Figura 2 muestra la variación de la densidad celular ( $\text{células.mL}^{-1}$ ) y la biomasa (peso seco libre de cenizas, PSLC,  $\text{g.L}^{-1}$ ) de *H. coffeaeformis* creciendo en pileta tipo *raceway*. Las células presentaron una fase *lag* corta, seguida de una fase de crecimiento exponencial de seis días, durante la cual los valores de PSLC aumentaron casi tres veces. La fase de crecimiento estacionaria ocurrió entre los días 10 y 22 y se caracterizó por valores relativamente estables de PSLC y densidad celular. Desde el día 22 en adelante, los valores de biomasa mostraron una tendencia decreciente, lo que indica una fase de declinación del crecimiento.

La Figura 3 muestra la variación del fosfato disuelto e intracelular en el cultivo de *H. coffeaeformis*, a partir del cual se puede evaluar el efecto del estado nutricional celular sobre la acumulación de lípidos. Se indica el fosfato disuelto limitante para el crecimiento de diatomeas, de acuerdo con Sarthou et al. [9]. El P disuelto disminuyó exponencialmente y alcanzó sus valores límite en los primeros días de cultivo ( $P < 8,9 \mu\text{M}$  en el día 7), con una tasa de remoción de  $3,62 \mu\text{M.día}^{-1}$ . En cultivos discontinuos de diatomeas, la acumulación de lípidos neutros (triacilglicéridos: TAG) en respuesta a la limitación de P es variable [10].



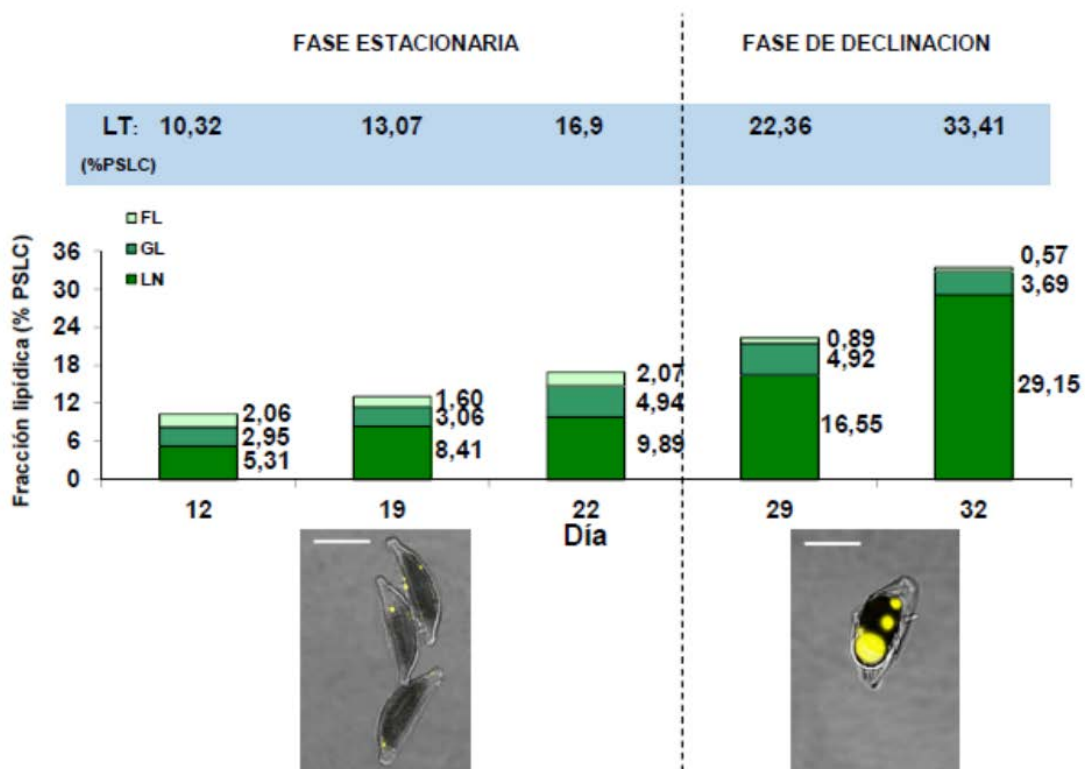
**Figura 2.** Variación de la densidad celular y la biomasa de un cultivo de *H. coffeaeformis* en pileta tipo *raceway*. DC: densidad celular; PSLC: peso seco libre de cenizas.

Esto puede deberse a que las diatomeas tienen la capacidad de absorber fosfato cuando sus concentraciones en el medio son elevadas y almacenarlo en grandes depósitos intracelulares que generan una reserva adicional [10, 11]. En el presente estudio, cabe destacar que, aunque el P disuelto alcanzó valores límite rápidamente (Figura 3), la concentración de lípidos neutros alcanzó su punto máximo en el día 32 (Figura 4). Además, la reserva de fosfato al comienzo del cultivo fue 8,71 mM P, más de 200 veces mayor que el fosfato disuelto (Figura. 2). Esta reserva de P se utilizó a lo largo de todo el cultivo y alcanzó valores mínimos durante la fase de declinación del crecimiento, cuando la acumulación de TAG fue máxima. Por lo tanto, en esta especie ambas fuentes de P (disuelto más interno) tuvieron que agotarse para inducir la máxima acumulación de lípidos neutros. Por lo tanto, la acumulación de fosfato en *H. coffeaeformis* puede explicar el retraso observado en la acumulación de TAG, que alcanzó un valor máximo el día 32. Además, esta reserva interna de P podría ayudar a comprender el efecto variable del P disuelto sobre la acumulación de TAG en las diatomeas.



**Figura 3.** Cinética del fosfato disuelto e intracelular en un cultivo de *H. coffeaeformis* en pileta tipo *raceway* (modificado de [3]).

La Figura 4 muestra la cinética de acumulación de lípidos en el cultivo de *H. coffeaeformis*. En la fase de crecimiento estacionario (días 10 a 22), el contenido de lípidos totales osciló entre el 10 y el 17% (PSLC), con un valor máximo de lípidos neutros de 9,89% (PSLC). El contenido de lípidos totales aumentó en la fase de declinación de crecimiento hasta 33,41% (PSLC) debido a un aumento de los lípidos neutros, los cuales alcanzaron un 29,15% (PSLC) o un 87% con respecto a los lípidos totales. En las fotomicrografías se puede apreciar el aumento en el tamaño de las gotas lipídicas, las cuales en el día 32 de cultivo ocupan una gran parte del citoplasma de la célula (Figura 4).



**Figura 4.** Variación de la cantidad y composición de lípidos en *Halamphora coffeaeformis* (modificado de [3]).

## DISCUSION

\*\*El protocolo descrito representa una herramienta confiable para medir la cinética del fosfato disuelto e intracelular en diatomeas.

\*\*Cuando la especie microalgal es cultivada en aguas residuales, la cinética del P disuelto es clave para evaluar la capacidad de la especie de biorremediar las aguas residuales, dado que la metodología permite determinar rangos de P desde 0,3  $\mu$ M. Por su parte, la cinética de P intracelular es una herramienta muy útil para evaluar la capacidad de la especie de almacenar P. Esta última información es relevante para evaluar el uso de la biomasa como biofertilizante fosfatado.

\*\*En biorrefinerías microalgales destinadas a bioenergía, como es el caso de los

resultados mostrados en este trabajo, el protocolo descripto es adecuado para poder definir el estado nutricional de la especie estudiada y por ende para estimar el tiempo de acumulación de los lípidos neutros aptos para biodiesel. Dicha información permite tomar decisiones en relación con el tiempo de cosecha de la biomasa. El uso de la deprivación de los nutrientes disueltos como un indicador de estrés en diatomeas no es una herramienta confiable, debido a la capacidad que tienen algunas especies de acumular altas concentraciones de nutrientes intracelulares.

#### **AGRADECIMIENTOS:**

Los autores agradecen a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) (Resolución N° 801/18), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2019-00348), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET, PIP 11220200100696CO) y a la Universidad Nacional del Sur (UNS) (PGI 24/B246 y 24/Q105) por la financiación otorgada para la realización de este estudio. CAP es investigadora de la CIC. LAM y PIL son investigadores CONICET.

#### **CONFLICTO DE INTERESES:**

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

#### **REFERENCIAS**

- [1] Acien FGF, Fernandez Sevilla JM, Molina Grima E (2017). Microalgae: The Basis of Mankind Sustainability. In: Llamas B, Mazadiego FL, De Gracia MFS (eds.). Case Study of Innovative Projects - Successful Real Cases, IntechOpen, 123-140 pp.
- [2] Pott R, Johnstone-Robertson M, Verster B, Rumjeet S, Nkadimeng L, Raper T, Rademeyer S, Harrison S (2018). Wastewater Biorefineries: Integrating Water Treatment and Value Recovery. In: Leal Filho W, Surroop D (eds.). The Nexus: Energy, Environment and Climate Change. Green Energy and Technology. Springer, Cham. 289-302 pp.
- [3] Martín LA, Popovich CA, Martínez AM, Scodelaro Bilbao P, Damiani MC, Leonardi PI (2018). Hybrid two-stage culture of *Halamphora coffeaeformis* for biodiesel production: Growth phases, nutritional stages and biorefinery approach. *Renewable Energy* 118, 984–992.
- [4] Popovich CA, Faraoni MB, Sequeira MA, Daglio Y, Martín LA, Martínez AM, Damiani MC, Matulewicz MC, Leonardi PI (2020). Potential of the marine diatom *Halamphora coffeaeformis* to simultaneously produce omega-3 fatty acids, chrysolaminarin and fucoxanthin in a raceway pond. *Algal Research* 51, 102030.
- [5] Murphy J, Riley J (1962). A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27, 31-36.
- [6] Pai SC, Wang TY, Fang TH, Jiann KT (2015). Effect of heating on the color formation reaction in the Murphy and Riley method for the determination of phosphate in natural waters. *Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2, 139.
- [7] Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae, *Journal of Phycology* 35, 403-424.
- [8] Ramsey MH, Ellison SLR, Rostron P (eds.) (2019). Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide

to methods and approaches. Second Edition, Eurachem. ISBN (978-0-948926-35-8). Available from <http://www.eurachem.org>

- [9] Sarthou G, Timmermans RKR, Blain S, Treguer P (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review, *Journal of Sea Research* 53, 25-42.
- [10] Levitan O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG (2014). Diatoms: a fossil fuel of the future, *Trends in Biotechnology* 32, 117-124.
- [11] Griffiths MJ, Harrison ST (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21, 493-507.

## MATERIALES

Material o Equipo	Casa comercial	Referencia	Descripción
Agua MilliQ	Millipore, Billerica, MA		Resistividad de ~ 18,5 MΩ y ausencia de impurezas con actividad superficial
HCl	ACS	CAS: 7647-01-0	32-36%
detergente libre de fosfatos	Biopak	NC 3402.20.90	diluido según indicaciones del fabricante
Balanza	OHAUS Corp. USA	PA 214	Legibilidad 0,0001 g
Espectrofotómetro UV-Vis	Agilent Cary 60		
celdas de lectura	de cuarzo o vidrio		de 1cm de paso optico
Mufla			hasta 800°C
Disruptor celular ultrasónico	OMNI		con tipo OR-T-156 (250 ul-10 mL), potencia límite: 50%
bomba de vacío	Milipore		con regulador para filtrado a baja presión
portafiltro de virio de 25mm	milipore		adaptado para agregar tubo de recolección de filtrado
kitasato	Gassco		de vidrio
termoreactor	HACH		temperatura regulada a 70°C
filtros de fibra de vidrio	Munktell		0.7 μm de tamaño de poro
Vortex	VELP Scientifica		
Papel aluminio			
Matraces volumetricos de 5,	Gassco		Clase A
Pipeta automática de 100-	Eppendorf		
Pipeta automática de 40 - 200	Eppendorf		
puntas para micropipetas			
Microscopio campo claro	Leica		
Cámara de recuento			
tubos de vidrio calidad optica	HACH		
Acido Sulfurico	Biopack	CAS: 7664-93-9	
Heptamolibdato de amonio	Merck	CAS: 12054-85-2	
Tartrato de antimonio y	Sigma-Aldrich	CAS:28300-74-5	
L-Acido Ascorbico	Sigma-Aldrich	CAS: 50-81-7	
Freezer -20°C			
Standard de fosfato	Merck	119898	trazable a SRM de NIST KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en H <sub>2</sub> O 1000 mg/l PO <sub>4</sub> Certipur®
agua de mar artificial			
conservadora de frio portátil			