

*Research Article*

**Floculación de *Nannochloropsis* sp. inducida por hidróxido de sodio: eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos**

Angel Humberto Rojo-Cebreros<sup>1</sup>, Manuel Eduardo Morales-Plascencia<sup>2</sup>

Leonardo Ibarra-Castro<sup>1</sup>, Juan Manuel Martínez-Brown<sup>1</sup> & María Alejandra Medina-Jasso<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Reproducción y Planta Piloto de Peces Marinos

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Sinaloa, México

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán, Sinaloa, México

<sup>3</sup>Laboratorio de Ecofisiología y Cultivo de Organismos Acuáticos, Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR)

Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México

Corresponding author: Angel Humberto Rojo-Cebreros (arojocebreros@yahoo.com.mx)

**RESUMEN.** Los laboratorios acuícolas altamente dependientes de *Nannochloropsis* sp. desarrollan mecanismos para su producción masiva, con el desafío de poder extraer altas concentraciones celulares. La floculación por agentes alcalinos es una alternativa que promete mayores ventajas, y el hidróxido de sodio puede ser el agente floculante más conveniente. Sin embargo, para lograr una eficiencia máxima de floculación son determinantes la cantidad del agente floculante, tiempo de exposición, concentración celular y tipo de microalga. Por lo anterior, se determinó la cantidad de NaOH 0,5N y el tiempo de exposición necesarios para lograr un pH óptimo de floculación en cosechas de *Nannochloropsis* sp. con concentraciones celulares mayores a  $50 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>. Los resultados mostraron que con 17 mL de NaOH 0,5N por litro de cultivo de microalgas se puede lograr una eficiencia de floculación de 94,9% a pH 9,7 en menos de 60 min. Las células del sobrenadante (subproducto del proceso) fueron viables como inóculo de un nuevo cultivo de microalgas. El concentrado microalgal ( $355,7 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, peso seco 2,03 g L<sup>-1</sup>) obtenido fue adecuado como alimento para rotíferos. Por lo tanto, se recomienda el empleo de NaOH 0,5N como método simple, práctico y de bajo costo para producir concentrados de *Nannochloropsis* sp. con fines acuícolas.

**Palabras clave:** *Nannochloropsis* sp., floculación alcalina, microalgas, acuicultura.

**Flocculation of *Nannochloropsis* sp. induced by sodium hydroxide: flocculation efficiency, viability effect on microalgae and their use as food for rotifers**

**ABSTRACT.** Aquaculture laboratories highly dependent of *Nannochloropsis* sp. develop mechanisms for mass production, with the challenge of be able to extract high cell concentrations from the culture medium. Flocculation by alkaline agents is an alternative that promises greater advantages, and sodium hydroxide may be the most convenient. However, to achieve maximum efficiency of flocculation are important the amount of flocculent, exposure time, cell concentration and type of microalgae. Therefore, the amount of 0.5N NaOH and the exposure time required are investigated to *Nannochloropsis* sp., harvests at high density at  $50 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. The results show that with 17 mL NaOH 0.5N per liter of culture of microalgae can be achieved 94.9% flocculation efficiency at pH 9.7 in less than 60 min. Supernatant cells (byproduct of the process) were viable as inoculum of a new culture of microalgae. Microalgae concentrate ( $355.7 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>, dry weight 2.03 g L<sup>-1</sup>) produced was adequate as food for rotifers. Therefore, employment of 0.5N NaOH is recommended as a simple, convenient and inexpensive method for producing *Nannochloropsis* sp. concentrates for aquaculture purposes.

**Keywords:** *Nannochloropsis* sp., alkaline flocculation, microalgae concentration, aquaculture.

## INTRODUCCIÓN

Por su alto valor nutricional, las microalgas han sido ampliamente usadas en acuicultura como alimento de moluscos, zooplancton y larvas de crustáceos y peces (Hemaiswarja *et al.*, 2011). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) es uno de los géneros de microalgas extensamente utilizados en la industria acuícola (Apt & Behrens, 1999). Este grupo taxonómico está constituido por especies unicelulares, cocoides, con diámetros menores a 5  $\mu\text{m}$ , que habitan sistemas marinos y dulceacuícolas (Fawley & Fawley, 2007). Crecen en amplios intervalos de salinidad (Boussiba *et al.*, 1987) y presentan alto contenido de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácido eicosapentaenoico (Tonon *et al.*, 2002).

En los sistemas de producción de larvas de peces marinos, *Nannochloropsis* sp. se usa tradicionalmente en el protocolo de cultivo denominado “agua verde” (Skiftesvik *et al.*, 2003) y como alimento de rotíferos (Dhert *et al.*, 2001; Hagiwara *et al.*, 2001; Lubzens *et al.*, 2001). Los costos operativos del cultivo de microalgas en los sistemas de producción de larvas de peces marinos pueden representar el 30% (Coutteau & Sorgeloos, 1992). Debido a lo anterior, el uso de concentrados microalgales comerciales puede ser una opción técnica más eficiente (Heasman *et al.*, 2000), especialmente para laboratorios en localidades remotas, donde no sea posible instalar sistemas de producción masivo de microalgas *in situ* (Knuckey *et al.*, 2006). No obstante, los altos costos de importación en países en subdesarrollo provocan que el uso de concentrados microalgales sea económicamente inviable. Tal situación ha impulsado a que los laboratorios de producción (moluscos, peces y crustáceos) generen su propio concentrado de microalgas. Entre los beneficios obtenidos por esta estrategia se encuentran: a) producción de concentrados durante periodos improductivos de la temporada, b) mejor administración para cubrir las necesidades de microalgas, y c) reducción de los costos de producción (Knuckey *et al.*, 2006).

A la fecha se han empleado distintos métodos para producir concentrados de microalgas: centrifugación (Molina *et al.*, 2003), biopolímeros floculantes (Singh *et al.*, 2000), electro-floculación (Vandamme *et al.*, 2011), flotación (Wiley *et al.*, 2009) y filtración (Molina *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que con la floculación producida por agentes alcalinos (*e.g.*,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  y  $\text{NaOH}$ ), aplicada en la producción de concentrados microalgales, se obtiene mayor eficiencia, menor costo y garantiza la inocuidad (Folkman & Wachs, 1973; Horiuchi *et al.*, 2003; Schlesinger *et al.*, 2012; Besson & Guiraud, 2013). Además, el alto pH de este método reduce eficazmente

la carga bacteriana de la biomasa de microalgas y del agua del proceso (Huo *et al.*, 2014). El proceso de floculación de células microalgales ocurre cuando cambios de pH provocados por agentes altamente alcalinos, desestabilizan la carga superficial de las células (debida a grupos funcionales amino, carboxílico protón-activo, fosfórico, fosfodiéster e hidroxilo), permitiendo que éstas se adhieran unas a otras y formen aglomeraciones que floculan (Bratby, 2006; Henderson *et al.*, 2008; Hadjoudja *et al.*, 2010). Como consecuencia de lo anterior, la cantidad de floculante alcalino requerido es una función logarítmica de la densidad celular (Schlesinger *et al.*, 2012). Así, las cosechas más densas requieren menos agente floculante que las cosechas de baja densidad y por consiguiente, la floculación ocurre a un pH menor. El hidróxido de sodio es uno de los agentes alcalinos más ampliamente usados en la floculación de microalgas (Schlesinger *et al.*, 2012). No obstante, es usual que sea aplicado junto con polisacáridos (Pestán<sup>®</sup>; Lee *et al.*, 1998), almidón catiónico (Vandamme *et al.*, 2010), quitosano (Guevara *et al.*, 2011), polielectrolitos (Magnafloc<sup>®</sup>; Knuckey *et al.*, 2006; Harith *et al.*, 2009), polímeros orgánicos (Flopam<sup>®</sup>; Sales & Abreu, 2015); sulfato de aluminio (Shen *et al.*, 2013) y cloruro férrico (Knuckey *et al.*, 2006). La combinación con alguno de estos compuestos incrementa el pH y mejora el proceso de floculación. Sin embargo, poco se ha documentado sobre el uso de  $\text{NaOH}$  como agente único de floculación para la microalga *Nannochloropsis* sp. (Nava-Gómez, 2014). Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la eficiencia del  $\text{NaOH}$  0,5N como floculante y determinar la cantidad que se requiere para lograr el punto isoeléctrico o pH óptimo de floculación de la microalga *Nannochloropsis* sp., cosechada al inicio de la fase estacionaria ( $>50 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) generada en un sistema por lotes. Los resultados de este trabajo permiten obtener concentrados microalgales adecuados para aplicaciones en larvicultura (técnica de “agua verde”), en el cultivo de rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) y como inóculos de microalgas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de microalgas

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán. Se utilizó la cepa NN-X-1 obtenida de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, en Baja California, México. Se realizaron cultivos por lotes en envases de policarbonato de 16 L. Se empleó el medio de cultivo f/2 (Guillard & Ryther, 1962), preparado con agua de mar

(salinidad 35), filtrada (1  $\mu$ ) y desinfectada por cloración. Las condiciones de cultivo fueron:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 4000 lux y aireación continua (Helm *et al.*, 2004). Los cultivos de microalgas fueron cosechados al inicio de la fase de crecimiento estacionario, cuando se obtuvo una densidad celular mayor que  $50 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . La concentración celular se determinó diariamente con un hematocitómetro (0,1 mm de profundidad, con reglilla de Neubauer mejorada, Brighline Optik Labor) y un microscopio compuesto (Leica modelo CME) de acuerdo con Guillard & Sieracki (2005).

### Efecto del NaOH sobre la floculación microalgal

Las microalgas cosechadas se colocaron en conos *Imhoff* graduados de 1 L. Como tratamientos se aplicaron en una sola ocasión, alícuotas de 34; 25,5 y 17 mL de NaOH 0,5N por cada litro del cultivo de microalgas; 0,5N de NaOH que es la concentración mínima recomendada por Nava-Gómez (2014) para obtener mejores tiempos y porcentajes de floculación con *Nannochloropsis* sp. Los tratamientos se realizaron en triplicado. Cada 10 min, durante 2,5 h, se midió el pH (potenciómetro Hanna, modelo HI98127) y el porcentaje del volumen floculado. Después de las 2,5 h, se evaluó la concentración celular en el sobrenadante y en el precipitado como se mencionó en el apartado anterior. La tasa de floculación se calculó con la siguiente ecuación:

$$TF = \frac{(VFi - VFf) \times 100}{t} \quad (1)$$

donde *TF* es la tasa de floculación (%); *VFi* es el volumen del flóculo inicial; *VFf* es el volumen del flóculo final; y *t* es el tiempo post-tratamiento en minutos.

### Eficiencia de floculación

Con base en los resultados obtenidos en el experimento anterior, se seleccionó el tratamiento de 17 mL de NaOH 0,5N para evaluar la eficiencia de floculación en una cosecha con alta densidad microalgal. Se usó el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. Se midió el pH y la concentración celular antes de aplicar el tratamiento; luego se realizaron las mismas determinaciones en el sobrenadante y el precipitado cada 10 min, durante 1 h. Adicionalmente, se tomaron muestras de la biomasa de microalgas antes y después de la aplicación del tratamiento para determinar el peso seco, mediante el método propuesto por Sorokin (1973). Para calcular la eficiencia de floculación se utilizó la ecuación propuesta por Harith *et al.* (2009):

$$EF = \left( \frac{Ci - Cf}{Ci} \right) \times 100 \quad (2)$$

donde *EF* es la eficiencia de floculación en porcentaje; *Cf* es la concentración final de células en suspensión;

*Ci* es la concentración de células en suspensión antes del tratamiento.

### Viabilidad de las microalgas contenidas en el sobrenadante

Después de efectuarse el proceso de floculación, se recuperó el sobrenadante y se sembró en matraces de vidrio de 5 L por triplicado. Se emplearon los métodos de cultivo y de determinación del crecimiento de microalgas descritos con anterioridad. La tasa de crecimiento específico (incremento del número de células por día) se usó como indicador para evaluar la viabilidad de los cultivos, calculada con la siguiente ecuación (Odum & Barrett, 2006):

$$TCE = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} \quad (3)$$

donde *TCE* es la tasa de crecimiento específico;  $\ln N_t$  es el logaritmo natural del número de células a un tiempo *t*;  $\ln N_0$  es el logaritmo natural del número de células al tiempo 0 (inoculación); *t* es la edad del cultivo en días.

### Cultivo de rotíferos con el concentrado microalgal

Se usó un concentrado de *Nannochloropsis* sp. producido mediante la floculación inducida con 17 mL de NaOH 0,5N por litro de cultivo de microalga. Para neutralizar el pH y disgregar los flóculos microalgales, se inyectó  $\text{CO}_2$  a un flujo  $5 \text{ L min}^{-1}$  durante 1,5 min (Nava-Gómez, 2014). Antes de utilizarse como alimento en el cultivo de rotíferos, el concentrado se refrigeró por tres semanas a  $2,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ . El inóculo de una cepa local del rotífero *Brachionus rotundiformis* (tipo S, 140 y 110  $\mu\text{m}$ , de largo y ancho de lóricas), se obtuvo del Laboratorio de Alimento Vivo del CIAD-Mazatlán. Esta cepa fue aislada de la eclosión de huevos en diapausa presentes en el sedimento de los estanques de una granja de camarón al sur de Sinaloa, México ( $23^\circ 9' 10,54''\text{N}$ ,  $106^\circ 18' 22,84''\text{W}$ ); con el método descrito por Román-Reyes *et al.* (2014). Para el cultivo de rotíferos se aplicó la técnica por lotes (Hirata, 1980; Lubzens, 1987), que se realizó por triplicado en envases de 15 L a  $29^\circ\text{C}$  y 35 de salinidad. La densidad inicial fue de 100 rotíferos  $\text{mL}^{-1}$ . Diariamente se determinó la densidad de rotíferos mediante conteos con una cámara Sedgwick-Rafter de 1 mL y un microscopio compuesto (Leica modelo CME). Además, se contaron los rotíferos con huevos para calcular el porcentaje de fertilidad diario de la población. La alimentación fue a saciedad, con la aplicación de  $6 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$  por día, por cada 100 rotíferos  $\text{mL}^{-1}$  (Hino *et al.*, 1997). La ración de alimentación diaria se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$RDA = \frac{TO \times V}{DC} \quad (4)$$

donde *RDA* es la ración diaria de alimento (mL del concentrado); *TO* es la tasa óptima para 100 rotíferos  $\text{mL}^{-1}$  ( $6 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ); *V* es el volumen del cultivo (15 L); *DC* es la densidad celular del concentrado microalgal.

### Análisis estadísticos

Para comparar las tasas de floculación obtenidas en los tres tratamientos de hidróxido de sodio en cada tiempo de exposición, los porcentajes del volumen de floculación se transformaron mediante la función raíz arcoseno (Steel & Torrie, 1980). Posteriormente, se probó la homogeneidad de varianzas y normalidad mediante las técnicas de Levine y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Debido a que los datos no fueron homocedásticos, se aplicó la prueba por rangos de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn (Zar, 2010). Los análisis estadísticos y las funciones de crecimiento se realizaron con el programa SigmaPlot v11.

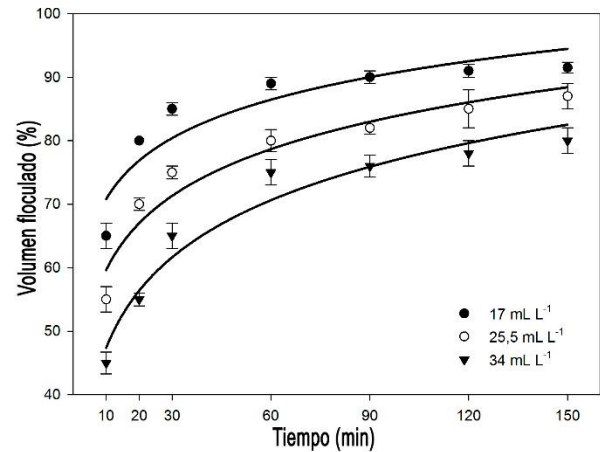
## RESULTADOS

### Evaluación del efecto de NaOH como floculante

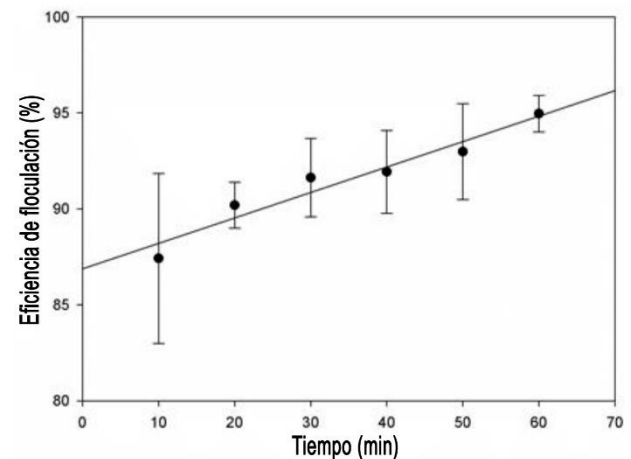
Los tratamientos de 17 y 34 mL de NaOH 0,5N presentaron diferencias significativas entre sí en las tasas de floculación desde los primeros 10 min posteriores a la aplicación del floculante (Fig. 1). No obstante, ambos tratamientos no presentaron diferencias significativas con el de 25,5 mL de NaOH 0,5N. El pH incrementó de 7,6 (en los tres tratamientos) a  $9,9 \pm 0,1$ ;  $9,8 \pm 0,2$  y  $9,6 \pm 0,2$ ; para los tratamientos de 17; 25,5 y 34 mL NaOH 0,5N, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Todos los tratamientos presentaron alta eficiencia de floculación (80 a 90%) al cumplirse 2,5 h de ser aplicado el floculante. En todos los casos, los porcentajes de floculación se ajustaron al modelo logarítmico (17 mL NaOH 0,5N:  $y = 8,7362 \ln(x) + 50,688$ ,  $r^2 = 0,8$ ; 25,5 mL NaOH 0,5N:  $y = 10,631 \ln(x) + 35,143$ ,  $r^2 = 0,9$ ; 34 mL NaOH 0,5N:  $y = 12,983 \ln(x) + 17,468$ ,  $r^2 = 0,9$ ). Las densidades finales de los flóculos fueron  $582,6 \pm 44,1$ ;  $387,3 \pm 68,3$  y  $220,8 \pm 13,8 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , para los tratamientos de 17; 25,5 y 34 mL de NaOH 0,5N, respectivamente. Sin embargo, durante los primeros 60 min se acumuló más del 70% de la biomasa floculada para los tres tratamientos. No obstante, en el tratamiento de 17 mL de NaOH 0,5N se registró la mayor eficiencia de floculación durante el periodo de observación (91  $\pm$  1%).

### Eficiencia de floculación del tratamiento de 17 mL de NaOH 0,5N

La eficiencia de floculación presentó una tendencia lineal con respecto al tiempo ( $y = 1,3256x + 86,873$ ,  $r^2$



**Figura 1.** Tasa de floculación (promedio  $\pm$  DE) de *Nannochloropsis* sp. por efecto de tres tratamientos de NaOH 0,5N en diferentes tiempos de exposición.

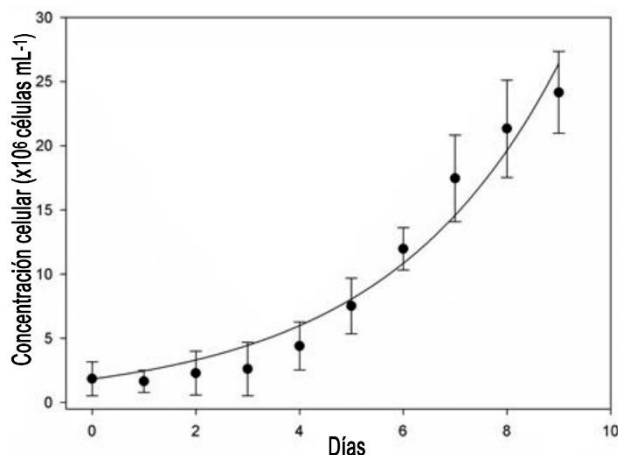


**Figura 2.** Eficiencia de floculación con el tratamiento 17 mL de NaOH 0,5N para cada litro de cosecha de *Nannochloropsis* sp. a alta densidad (promedio  $\pm$  DE;  $n = 3$ ).

= 0,9) (Fig. 2). En los primeros 10 min floculó el 87,4% (densidad del flóculo:  $235,5 \pm 9,29 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) y a los 60 min se obtuvo el 94,9% ( $528,1 \pm 19,17 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ). Después de los primeros 10 min posteriores a la aplicación del floculante, se incrementó el pH hasta 9,7 y la temperatura a 23,3°C. Durante los 50 min siguientes, las células continuaron floculando, aunque a un ritmo menor de  $1,5 \pm 0,9\%$  cada 10 min; asimismo, se presentaron cambios menores de pH ( $0,01 \pm 0,02$ ) y temperatura ( $0,10 \pm 0,13^\circ\text{C}$ ). El peso seco de la fracción floculada a 24 h después del tratamiento fue de 11,94 g  $\text{L}^{-1}$ , que corresponde a la densidad de  $1166,1 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ .

### Viabilidad microalgal del sobrenadante

Los cultivos iniciados con un inóculo obtenido del sobrenadante fueron viables y presentaron un crecimen-



**Figura 3.** Crecimiento poblacional de *Nannochloropsis* sp. en cultivos iniciados con inóculo obtenido del sobrenadante (promedio  $\pm$  DE; n = 3)

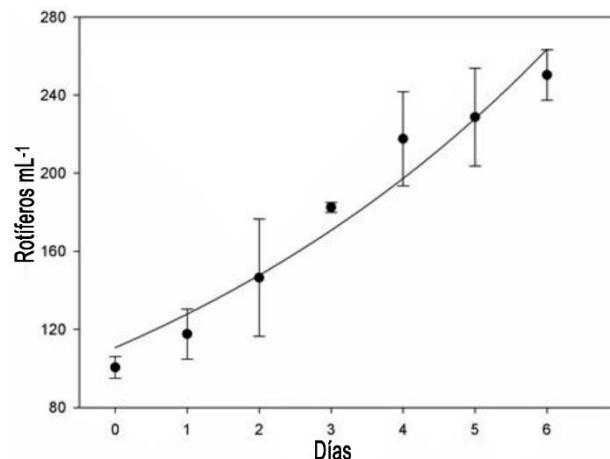
to exponencial en su concentración celular ( $y = 1,2938 e^{0,342x}$ ,  $r^2 = 0,9$ ). Al finalizar los 9 días de cultivo se alcanzó una densidad de  $24,15 \pm 3,19 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 3).

### Crecimiento poblacional de rotíferos

El concentrado de *Nannochloropsis* sp. tuvo una densidad de  $355,7 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> y un peso seco de  $2,03$  g L<sup>-1</sup>. El concentrado no presentó grumos después de la neutralización y disgregación. Los rotíferos alimentados con la biomasa concentrada por floculación duplicaron la población inicial al cuarto día de cultivo. Al sexto día, se alcanzó una densidad de  $250,2 \pm 12,9$  rotíferos mL<sup>-1</sup>. La fertilidad alcanzó valores máximos cercanos al 30% en el primer día y un promedio de  $13,5 \pm 5,8\%$  durante los seis días de cultivo. El crecimiento poblacional del cultivo de rotíferos fue exponencial ( $y = 104,7 e^{0,1595x}$ ,  $r^2 = 0,9$ ) (Fig. 4).

## DISCUSIÓN

En general, los ensayos para evaluar la floculación de microalgas se realizan con bajas densidades celulares (e.g., con *Nannochloropsis* sp.: Knuckey *et al.*, 2006 [ $10\text{-}20 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>]; Nava-Gómez, 2014 [ $39,66 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>]; Low y Toledo, 2015 [ $4,55 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>]). En el presente trabajo se utilizaron cosechas con  $55,1$  y  $52,3 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> (experimentos 1 y 2, respectivamente), que son concentraciones habituales de *Nannochloropsis* sp. en producciones comerciales. Los resultados del primer experimento muestran que a mayor cantidad de NaOH 0,5N, menor fue el efecto floculante en una cosecha densa de *Nannochloropsis* sp. De las tres cantidades de NaOH probadas (34; 25,5



**Figura 4.** Crecimiento poblacional de *B. rotundiformis* alimentado con biomasa concentrada de *Nannochloropsis* sp. obtenida mediante floculación inducida por NaOH 0,5N (promedio  $\pm$  DE; n = 3).

y 17 mL NaOH 0,5N), 17 mL NaOH presentó el mayor porcentaje de floculación (90%). Por lo tanto, para una cosecha densa de *Nannochloropsis* sp., 17 mL de NaOH 0,5N es suficiente para lograr un punto isoeléctrico (pH 9,9) en menor tiempo (60 min).

Esto permite confirmar que el efecto del floculante está en función de la densidad celular, como fue establecido por Schlesinger *et al.* (2012). En todos los casos, el proceso de floculación se efectuó a pH menor de 10. Lo anterior contrasta con lo establecido por Folkman & Wachs (1973), quienes señalaron que la floculación de microalgas por agentes alcalinos se inicia a valores de pH  $>10$  y que sólo se completa a pH 11. Por otra parte, Nava-Gómez (2014) logró altos porcentajes de floculación ( $>90\%$ ) de *Nannochloropsis* sp. con NaOH 0,5N, a pH entre 9,74 y 9,94; aunque no se especificó la cantidad de NaOH utilizada. De la misma forma, Vandamme *et al.* (2012) indujeron floculación de *Chlorella vulgaris* con  $22$  mg L<sup>-1</sup> de NaOH y un pH = 10,5.

Los resultados del segundo experimento, muestran que la aplicación de 17 mL de NaOH 0,5N incrementó el pH a 9,7 en una cosecha densa de *Nannochloropsis* sp. y generó una floculación del 94,9%. Este resultado se debió a una disminución en el potencial zeta por aumento del pH, lo que produce la neutralización de la carga superficial de las células y por consecuencia su floculación (Wu *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2013). Resultados similares fueron reportados por Horiuchi *et al.* (2003) con *Dunaliella tertiolecta*. Estos autores obtuvieron una rápida floculación al adicionar NaOH al medio de cultivo, entre valores de pH 8,6 y 10,5 e indicaron una recuperación de la biomasa celular mayor al 90%. También, Besson & Guiraud (2013) señalan que inducir un incremento de pH por adición de NaOH

en el cultivo de *Dunaliella salina* permite obtener alta eficiencia de recuperación (>90%). Mientras que, Ghidini *et al.* (2009) sugieren que el incremento de pH en el medio de cultivo de *N. oculata* y *Phaeodactylum tricorutum* es un método adecuado para recuperar la biomasa celular en suspensión.

Los resultados de la presente investigación sugieren que el tiempo de exposición al agente floculante afecta la eficiencia de floculación. El tiempo requerido para una alta eficiencia de floculación de *Nannochloropsis* sp. con 17 mL de NaOH 0,5N fue tres veces menor que el tiempo reportado por Surendhiran & Vijay (2013) para alcanzar la máxima floculación (93,80%) de *N. oculata* con FeCl<sub>3</sub> como floculante. En resumen, los resultados de los dos experimentos de floculación permiten demostrar que el NaOH usado como floculante único, puede ser un agente de floculación eficaz de la biomasa de *Nannochloropsis* sp., como lo propone Schlesinger *et al.* (2012).

Por otra parte, se registró un crecimiento exponencial en la concentración de los cultivos de microalgas inoculados con en el sobrenadante obtenido como subproducto de floculación de *Nannochloropsis* sp. Lo anterior fue también señalado por Wu *et al.* (2012) quienes propusieron que el uso del sobrenadante puede contribuir a la reducción de los costos de producción de microalgas para biodiesel. Por su parte, Besson & Guiraud (2013) plantearon aprovechar el sobrenadante como inóculo para iniciar nuevos cultivos. No obstante, esta medida no siempre es posible. Brown & Robert (2002) mencionan que los cambios de pH por efecto de floculación pueden provocar estrés químico en las células de microalgas volviéndose perjudicial para algunas especies. Por ejemplo, Surendhiran & Vijay (2013) observaron lisis en *N. oculata* al aplicar sulfato de aluminio a 0,4 g L<sup>-1</sup> como floculante, en incubación por 480 min. Igualmente, Blanchemain & Grizeau (1999) notaron un cambio de marrón a verde en la biomasa de *Skeletonema costatum* después de 1 h de incubación a pH 10,2, ajustado con HCl o NaOH (0,5 M). Esto probablemente está relacionado con el tipo de floculante, tiempo de exposición y características celulares de cada especie de microalga.

Con respecto al uso como alimento para rotíferos del concentrado de *Nannochloropsis* sp. obtenido por floculación, se logró un cultivo de *B. rotundiformis* que alcanzó una densidad de 250,2 ± 12,9 rotíferos mL<sup>-1</sup> al sexto día. La fertilidad alcanzó valores máximos cercanos al 30% en el primer día, con un promedio de 13,5 ± 5,8%. El concentrado de *Nannochloropsis* sp. fue conservado adecuadamente por tres semanas a temperatura de 2,5 ± 1,5°C antes de utilizarse como alimento para rotíferos. Esto confirma lo mencionado

por Low & Toledo (2015), quienes concluyeron que los concentrados de *N. oculata* almacenados entre 0 y 5°C durante 16 semanas, permanecen viables para su aplicación como alimento, “agua verde” y otros usos en laboratorios acuícolas de larvas de moluscos y peces.

La viabilidad como alimento de los concentrados microalgales, sujetos a procesos de floculación y conservación a bajas temperaturas, es atribuido a que no se modifica su composición bioquímica (Heasman *et al.*, 2000; Guevara *et al.*, 2011). Sin embargo, de acuerdo con Brown & Robert (2002), esto parece depender de la especie, ya que en cinco especies de microalgas (ninguna *Nannochloropsis* sp.) se encontró aproximadamente la mitad del porcentaje de carbohidratos en comparación con la microalga fresca. La disminución de carbohidratos ocurrió rápidamente después de almacenar los concentrados en oscuridad. Brown & Robert (2002) atribuyen esta disminución a la respiración en fase oscura de las células. Sin embargo, en las aplicaciones acuícolas la importancia de la reducción de los carbohidratos es limitada debido a que estos compuestos no revisten mayor interés nutricional para la alimentación de rotíferos. La información sobre la composición bioquímica de los concentrados de *Nannochloropsis* sp. por efecto de floculación para fines acuícolas es escasa (Low & Toledo, 2015), en comparación con lo realizado para obtención de biodiesel (Malakootian *et al.*, 2015).

Respecto al cultivo de rotíferos con concentrados microalgales, un concentrado de *Nannochloropsis* sp. cultivado con medio f/2 fue comparado por Nava-Gómez (2014) con concentrados de la misma cepa cultivados con fertilizantes agrícolas. Este autor obtuvo la mayor densidad (226 rotíferos mL<sup>-1</sup>) e índice de fertilidad (1,15 ± 0,18) de *Brachionus plicatilis* al utilizar el concentrado de *Nannochloropsis* sp. cultivada con medio f/2. No obstante, la tasa de alimentación suministrada por Nava-Gómez (2014) fue de 150x10<sup>3</sup> células por rotífero por día, lo cual es más del doble de la ración proporcionada en la presente investigación con la misma microalga (60x10<sup>3</sup> rotífero día<sup>-1</sup>). Por otra parte, Guevara *et al.* (2011) no encontraron diferencias entre el crecimiento de cultivos de rotíferos (*B. plicatilis*) con pasta de *Rhodomonas salina* (320 rotíferos mL<sup>-1</sup>) generadas por centrifugación o floculación con quitosano.

Otras ventajas, para las aplicaciones acuícolas de los concentrados obtenidos por este método es que el alto pH de la floculación alcalina, minimiza la carga bacteriana de la biomasa de microalgas, así como la del agua del proceso (Huo *et al.*, 2014). Además, al descartar el agua del proceso se minimiza la carga de compuestos y materia orgánica que afectan los cultivos de rotíferos (Yoshimura *et al.*, 1997). También, el uso

de CO<sub>2</sub> para neutralizar el efecto en el pH por la adición de NaOH evita la aplicación de ácidos en el concentrado microalgal para el mismo fin como se señala en otros trabajos (Brown & Robert, 2002; Knuckey *et al.*, 2006; Guevara *et al.*, 2011).

### CONCLUSIONES

Las cantidades probadas de NaOH 0,5N (17; 25,5 y 34 mL) presentaron porcentajes de floculación mayores al 80%. Sin embargo, con 17 mL de NaOH 0,5N aplicados en cosechas densas de *Nannochloropsis* sp., se puede lograr alta eficiencia en la recuperación de la biomasa celular (94,9%) a bajo pH (9,7) y en un lapso corto (<60 min). La viabilidad de las microalgas en el sobrenadante y la utilidad del concentrado para la alimentación de rotíferos, confirman que como agente floculante único, el NaOH 0,5N es conveniente para producir concentrados de *Nannochloropsis* sp.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte técnico brindado por la Planta de Peces Marinos CIAD-Unidad Mazatlán para lograr el objetivo de la presente investigación.

### REFERENCIAS

- Apt, K.E. & P.W. Behrens. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.*, 35(2): 215-226.
- Blanchemain, A. & D. Grizeau. 1999. Increased production of eicosapentaenoic acid by *Skeletonema costatum* cells after decantation at low temperature. *Biotechnol. Tech.*, 13(7): 497-501.
- Bratby, J. 2006. Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment. IW Publishing, London, pp. 50-68.
- Besson, A. & P. Guiraud. 2013. High-pH-induced flocculation-flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*. *Bioresour. Technol.*, 147: 464-470.
- Boussiba, S., A. Vonshak, Z. Cohen, Y. Avissar & A. Richmond. 1987. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*, 12(1): 37-47.
- Brown, M. & R. Robert. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207(3-4): 289-309.
- Coutteau, P. & P. Sorgeloos. 1992. The requirement for live algae and their replacement by artificial diets in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.*, 11(2): 467-476.
- Dhert, P.G., G. Rombaut, P. Suantika & P. Sorgeloos. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200(1-2): 129-146.
- Fawley, K.P. & M.W. Fawley. 2007. Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protista*, 158(3): 325-336.
- Folkman, Y. & A.M. Wachs. 1973. Removal of algae from stabilization pond effluent by lime treatment. *Water Res.*, 7(3): 419-435.
- Guevara, M., L. Bastardo, R. Cortez, B. Arredondo-Vega, L. Romero & P. Gómez. 2011. Pastas de *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotífera) *Rev. Biol. Trop.*, 59(4): 1503-1515.
- Ghidini, L.F.C., J.V.C. Vargas, L.F.L. Luz Jr., A.B. Mariano & V. Locatelli Jr. 2009. Change of culture broth pH for microalgae separation from the growth solution. 20<sup>th</sup> International Congress of Mechanical Engineering, Proceedings of COBEM, 15-20 November 2009, Gramado, RS, Brazil, 5 pp.
- Guillard, R.R.L. & J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.*, 8(2): 229-239.
- Guillard, R.R.L. & M. Sieracki. 2005. Counting cells in cultures with the light microscope. In: R. Andersen (ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier, London, 578 pp.
- Hadjoudja, S., V. Deluchat & M. Baudu. 2010. Cell surface characterization of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *J. Colloid. Interface Sci.*, 342(2): 293-299.
- Hagiwara, A., W.G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani & A.B. Araujo. 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture*, 200(1-2): 111-127.
- Harith, Z., Y. Fatimah, M. Mohd, D. Mohamed & A. Arbakariya. 2009. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans* cells. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(21): 5971-5978.
- Heasman, M., J. Diemar, W.O' Connor, T. Sushames, L. Foulkes & J.A. Nell. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs a summary. *Aquacult. Res.*, 31(8-9): 637-659.
- Hemaiswarja, S., R. Raja, R.R. Kumar, V. Ganesan & C. Anbazhagan. 2011. Microalgae: a sustainable feed

- source for aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 1737-1746.
- Henderson, R.K., S.A. Parsons & B. Jefferson. 2008. Successful removal of algae through control of the zeta potential. *Separ. Sci. Technol.*, 43(7): 1653-1666.
- Helm, M.M., N. Bourne & A. Lovatelli. 2004. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO Fish. Tech. Pap., 471: 200 pp.
- Hino, A., S. Aoki & M. Ushiro. 1997. Nitrogen-flow in the rotifer *Brachionus rotundiformis* and its significance in mass cultures. *Hydrobiologia*, 358(1): 77-82.
- Hirata, H. 1980. Culture methods of the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. Min. Rev. Data File Fish. Res. Kagoshima Univ., 1: 27-46.
- Horiuchi, J., I. Ohba, K. Tada, M. Kobayashi, T. Kanno & M. Kishimoto. 2003. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella* with pH control. *J. Biosci. Bioeng.*, 95(4): 412-415.
- Huo, S., Z. Wang, S. Zhu, F. Cui, B. Zou, W. You, Z. Yuan & R. Dong. 2014. Optimization of alkaline flocculation for harvesting of *Scenedesmus quadricauda* n°507 and *Chaetoceros muelleri* n°862. *Energies*, 7(9): 6186-6195.
- Knuckey, R., M. Brown, R. Robert & D. Frampton. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacult. Eng.*, 35(3): 300-313.
- Lee, J.S., S. Kim, J. Kim, G. Kwon, B. Yoon & H. Oh. 1998. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27(1): 14-18.
- Low, C. & M.I. Toledo. 2015. Assessment of the shelf-life of *Nannochloropsis oculata* flocculates stored at different temperatures. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(2): 315-321.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147(1): 245-255.
- Lubzens, E., O. Zmora & Y. Barr. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia*, 446/447: 337-353.
- Malakootian, M., B. Hatami, S. Dowlatshahi & A. Rajabizadeh. 2015. Optimization of culture media for lipid production by *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production. *Environ. Health Eng. Manage.*, 2(3): 141-147.
- Molina-Grima, E., E.H. Belarbi, F.G. Ación-Fernández, A. Robles-Medina & Y. Chisti. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.*, 20(7-8): 491-515.
- Nava-Gómez, B. 2014. Cultivo de *Nannochloropsis* sp. con fertilizantes agrícolas y evaluación de floculados como alimento para *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, 33 pp.
- Odum, E. & G. Barrett. 2006. Fundamentos de ecología. Editora Thompson, Santa Fe, 598 pp.
- Román-Reyes, J.C., D.O. Castañeda-Rodríguez, H. Castillo-Ureta, R. Bojórquez-Domínguez, G.A & Rodríguez-Montes de Oca. 2014. Dinámica poblacional del rotífero *Brachionus ibericus* aislado de estanques para camarón, alimentado con diferentes dietas. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(5): 1159-1168.
- Sales, R. & P.A. Abreu. 2015. Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175(4): 2012-2019.
- Schlesinger, A., D. Eisenstadt, A. Bar-Gil, H. Carmely, S. Einbinder & J. Gressel. 2012. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnol. Adv.*, 30(5): 1023-1030.
- Shen, Y., Y. Cui & W. Yuan. 2013. Flocculation optimization of microalga *Nannochloropsis oculata*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 169(7): 2049-2063.
- Singh, R.P., T. Tripathy, G.P. Karmakar, S.K. Rath, N.C. Karmakar, S.R. Pandey, K. Kannan, S.K. Jain, & N.T. Lan. 2000. Novel biodegradable flocculants based on polysaccharides. *Curr. Sci.*, 78(7): 798-803.
- Skiftesvik, A.B., H.I. Browman & J.F. St-Pierre. 2003. Life in green water: the effect of microalgae on the behaviour of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. In: H.I. Browman & A.B. Skiftesvik (eds.). *Big fish bang*. Institute of Marine Research, Bergen, pp. 97-103.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed volume and optical density. In: J.R. Stein (ed.). *Handbook of physiological methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, Cambridge, 448 pp.
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo, 633 pp.
- Surendhiran, D. & M. Vijay. 2013. Study on flocculation efficiency for harvesting *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 5(4): 1761-1769.
- Tonon, T., D. Harvey, T.R. Larson & I.A. Graham. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61(1): 15-24.
- Vandamme, D., I. Foubert, B. Meesschaert & K. Muylaert. 2010. Flocculation of microalgae using cationic starch. *J. Appl. Phycol.*, 22(4): 525-530.
- Vandamme, D., I. Foubert, I. Fraeye & K. Muylaert. 2012. Influence of organic matter generated by *Chlorella vulgaris* on five different modes of flocculation. *Bioresour. Technol.*, 124: 508-511.



- Vandamme, D., S. Pontes, K. Goiris, I. Foubert, L. Pinoy & K. Muylaert. 2011. Evaluation of electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. *Biotechnol. Bioeng.*, 108(10): 2320-2329.
- Wiley, P.E., K.J. Brenneman & A.E. Jacobson. 2009. Improved algal harvesting using suspended air flotation. *Water Environ. Res.*, 81(7): 702-708.
- Wu, Z., Y. Zhu, W. Huang, C. Zhang, T. Li, Y. Zhang & A. Li. 2012. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresour. Technol.*, 110: 496-502.
- Yoshimura, K., K. Usuki, T. Yoshimatsu, C. Kitajima & A. Hagiwara. 1997. Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *Hydrobiologia*, 358: 139-144.
- Zar, J.H. 2010. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 944 pp.

*Received: 24 December 2015; Accepted: 2 May 2016*