



INFORME TECNICO

Producción artificial de semilla y cultivo de engorde de moluscos bivalvos



**Estación Acuícola
de Producción de Moluscos**

Puerto El Triunfo, Usulután

Diciembre 2009



Informe Técnico Producción Artificial de Semilla y Cultivo de Engorde de Moluscos Bivalvos

Elaborado por:

<i>Hebert Ely Vásquez</i>	Biólogo Proyecto Moluscos de CENDEPESCA
<i>Saúl Patricio Pacheco Reyes</i>	Biólogo Proyecto Moluscos de CENDEPESCA
<i>Iris Mabel Pérez García</i>	Bióloga Proyecto Moluscos de CENDEPESCA
<i>Nadia Elizabeth Cornejo Hernández</i>	Bióloga Proyecto Moluscos de CENDEPESCA
<i>Mario Francisco Córdova Navas</i>	Biólogo Proyecto Moluscos de CENDEPESCA
<i>Kiyotaka Kan</i>	Experto JICA en Jefe de Proyecto

Durante la Gestión de:

<i>Dr. Manuel Ramón Sevilla Avilés</i>	Ministro de Agricultura y Ganadería
<i>Lic. Hugo Alexander Flores Hidalgo</i>	Viceministro de Agricultura y Ganadería / Director del Proyecto
<i>Lic. Sonia María Salaverría</i>	Director General de CENDEPESCA / Gerente del Proyecto
<i>Lic. Reyna Isabel Pacheco</i>	Enlace de Cooperación Externa, CENDEPESCA / Coordinadora del Proyecto

Diciembre, 2009

Publicado por el Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA), dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), San Salvador, República de El Salvador Centro América y la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) a través del **Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador**, Oficina Regional CENDEPESCA Zona 3, Puerto El Triunfo, Departamento de Usulután, El Salvador.

Reservados todos los derechos. Se autoriza la reproducción y difusión de material contenido en este producto informativo para fines educativo u otros fines no comerciales sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor, siempre que se especifique claramente la fuente.

Se prohíbe la reproducción del material contenido en este producto informativo para reventa u otros fines comerciales sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor.

Las peticiones para obtener tal autorización deberán dirigirse a la Dirección General de CENDEPESCA / MAG.

Presentación

En El Salvador, hay buena aceptación del consumo de moluscos, comparado con otros países vecinos, como el curil, casco de burro, ostra de piedra.

Sin embargo, hubo una gran migración hacia la costa, durante el conflicto interno de los años 80s y la primera actividad productiva fue la extracción de moluscos; luego con los años empezamos a ver rápidamente, la disminución de los recursos.

Bajo esta situación, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), a través del Centro de Desarrollo de Pesca y Acuicultura (CENDEPESCA), ha implementado el Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador desde enero de 2005 con una duración de 3 años y 2 años de tiempo de prórroga hasta enero de 2010, con el apoyo del gobierno japonés, a través de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA).

Este Proyecto fue ejecutado en la Bahía de Jiquilisco, Departamento de Usulután y también en la zona costera del Departamento de La Unión, donde muchos ribereños se dedican a la pesca artesanal, principalmente en la recolección de conchas y ostras y el nivel de ingreso económico de las familias es más bajo que en otros lugares del país.

El objetivo principal del Proyecto, ha sido el de “Proponer el modelo de mejoramiento de la calidad de vida por medio de las actividades de la acuicultura de moluscos principalmente, basadas en la conciencia de manejo de los recursos naturales”.

El equipo técnico de *Anadara spp.* y ostra japonesa del Proyecto, realizó varios ensayos para establecer: la tecnología de producción artificial de semilla, la técnica del cultivo intermedio en los laboratorio húmedo de La Pirraya, luego nuevo laboratorio inaugurado el mayo de 2009 en el Puerto El Triunfo. También realizaron varios ensayos de cultivo para engorde en las áreas naturales marinos de Bahía de Jiquilisco y la zona costera principalmente las islas del Golfo de Fonseca.

Por ello como resultado de dichos ensayos, se ha obtenido el Informe Técnico Producción Artificial de Semilla y Cultivo de Moluscos Bivalvos.

Por lo tanto, en esta oportunidad, la Dirección General de CENDEPESCA/ MAG, se complace en presentar dicha información al sector pesquero, esperando que la misma, sirva de orientación a los productores y al mismo tiempo despierte el interés de los técnicos gubernamentales y privadas para innovar esta nueva tecnología.

Lic. Sonia María Salaverría
Directora General de
Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura
CENDEPESCA- MAG

Contenido

1. Introducción	6
2. Infraestructura	7
2.1 Sistema de abastecimiento de agua de mar.....	8
2.2 Sistema de abastecimiento de agua dulce.....	11
2.3 Sistema de aireación	11
2.4 Sistemas e instalaciones complementarias.....	12
3. Cultivo de microalgas	15
3.1 Importancia del cultivo de microalga.....	16
3.2 Materiales y equipos	16
3.3 Preparación de nutrientes.....	18
3.4 Inoculación y método de conteo.....	19
3.5 Cepa-mantenimiento	20
3.6 Cultivo inicial.....	22
3.7 Pre-masivo	22
3.8 Masivo.....	23
4.4 Microalga nativa	24
4. Producción artificial de semilla y cultivo de engorde de ostra japonesa (<i>Crassostrea gigas</i>).....	25
4.1 Especie de estudio <i>Crassostrea gigas</i>	27
4.2 Acondicionamiento de reproductores	27
4.3 Inducción al desove	29
4.4 Fertilización	30
4.5 Cultivo larval.....	31
4.6 Fijación de larvas	33
4.7 Cultivo intermedio	36
4.8 Cultivo de engorde	38
4.8.1 Sistemas Sumergidos	39
4.8.2 Sistema Intermareal.....	42

4.8.3	Materiales para el cultivo.....	43
4.8.4	Ensayos de cultivo de ostra japonesa.....	44
4.8.5	Manejo y planificación del cultivo.....	48
4.9	MONITOREO DE LARVAS DE CIRRIPEDIOS.....	49
5.	Producción artificial de semilla y cultivo de engorde del curil (<i>Anadara tuberculosa</i>)	53
5.1	Especie de estudio <i>Anadara tuberculosa</i>	55
5.2	Acondicionamiento de reproductores.....	56
5.2.1	Método de acondicionamiento:.....	57
5.3	Inducción al desove.....	58
5.3.1	Método de inducción.....	58
5.3.2	Selección de óvulos y espermatozoides.....	60
5.3.3	Fertilización de óvulos.....	60
5.3.4	Sistema de selección de larva trocófora.....	61
5.4	Cultivo larval.....	62
5.4.1	Asentamiento.....	64
5.5	Cultivo post-larval.....	65
5.6	Cultivo intermedio.....	67
5.7	Cultivo de engorde.....	68
5.7.1	Selección del sitio de cultivo.....	68
5.7.2	Materiales.....	69
5.7.3	Manejo del cultivo de engorde.....	69
5.7.4	Ensayo de crecimiento en las comunidades de bahía de Jiquilisco.....	70
6.	Casco de burro (<i>Anadara grandis</i>)	73
ANEXOS		75

I. Introducción

El Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA), dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) ejecuta la fase de prórroga del Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en El Salvador, con el apoyo de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA); la cual desde enero de 2005 hasta enero de 2010 invierte aproximadamente 407 millones de yenes, equivalentes a 4.2 millones de dólares. La cooperación de Japón en esta área se ha iniciado oficialmente desde el año 2001 con la primera fase del Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en los Estuarios de El Salvador.

El objetivo del Proyecto es proponer un modelo de mejoramiento de la calidad de vida de los pescadores artesanales por medio de la acuicultura de moluscos principalmente, basadas en el uso sostenible de los recursos naturales, para alcanzar este objetivo se realiza como actividad fundamental la producción artificial de semillas de curil o concha (*Anadara tuberculosa*), casco de burro (*Anadara grandis*) y ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y además se realizan ensayos de cultivo de estas especies con grupos modelo formados por pescadores artesanales de la Bahía de Jiquilisco y la zona costera del departamento de la Unión incluyendo al Golfo de Fonseca. Además en este proyecto se han instalado arrecifes artificiales que favorecen la reproducción de ostra de piedra y también constituyen el hábitat de peces y crustáceos.

Hasta abril de 2009 se habían producido semillas de moluscos utilizando el laboratorio húmedo ubicado en la Isla La Pirrayita en la Bahía de Jiquilisco. En mayo de este mismo año se terminó la construcción de un nuevo laboratorio ubicado en Puerto El Triunfo. Este nuevo laboratorio tiene mayor capacidad de producción, mejores condiciones de trabajo y equipamiento. La construcción de esta infraestructura se realizó con fondos que coadministra el Gobierno de El Salvador y el Gobierno del Japón. El origen de estos fondos es el Programa de Fomento a la Producción de Alimentos auspiciado por el Gobierno del Japón con el objetivo que El Salvador pueda invertir en actividades de producción de alimentos. El monto total de la obra es de 300,000 US\$.

El presente documento además de reportar los resultados obtenidos durante el desarrollo de las actividades de investigación, tiene como objetivo convertirse en una guía sencilla para la producción de moluscos en la estación acuícola de Puerto El Triunfo, Usulután.

2. Infraestructura

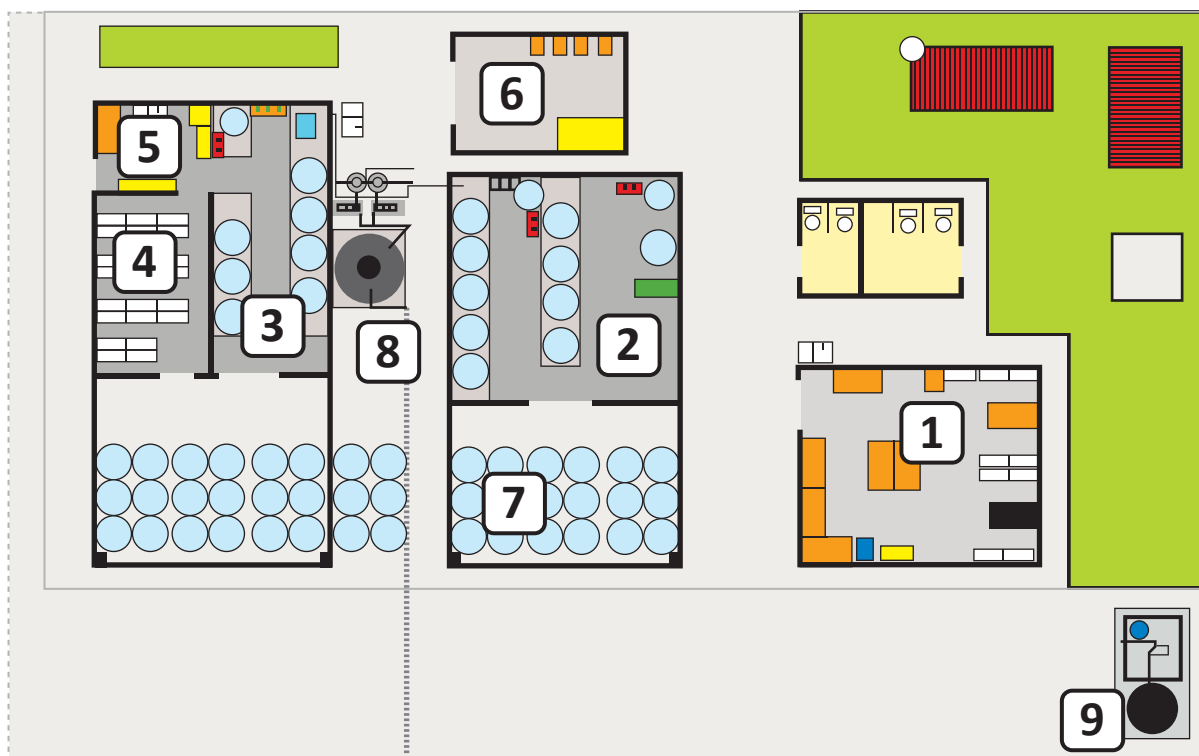


Fig. 1 Plano de estación acuícola de moluscos.

	Área Total	1040 m ²	
1	Laboratorio seco	47.3 m ²	2 Microscopios, 2 Lupas, 1 Proyector, 1 Autoclave
2	Sala de producción de Anadara	51.6 m ²	4 Esterilizadores de Ultravioleta 40W, 3 Filtros, 3 Tanques de FRP, 14 Tanques de 500 L
3	Sala de producción de Ostra	34.4 m ²	2 Esterilizadores de Ultravioleta 40W, 3 Filtros, 1 Tanque de FRP, 9 Tanques de 500 L
4	Sala de producción de microalgas	19.8 m ²	22 Estantes (200x90 x30cm), 1 Incubadora
5	Laboratorio de microalgas	9.5 m ²	1 Microscopio, 1 Lupa, 1 Refrigerador
6	Cuarto de Maquinas	21.2 m ²	1 Generador de emergencia 20KVA, 4 Sopladores
7	Área de producción de microalgas nativas	106.3 m ²	42 Tanques de 500 L
8	Área de Filtros de agua del mar	24.3 m ²	1 Tanque de 5.000 L, 2 Bombas de 3/4 HP, 2 Filtros de arena
9	Tanque de agua dulce	9.0 m ²	1 Tanque 2.500 L, Bomba 3/4 HP, 1 Tanque de presión

2.1 Sistema de abastecimiento de agua de mar

El agua utilizada en la estación Acuícola de Moluscos de Puerto El Triunfo es bombeada desde el canal principal de la Bahía de Jiquilisco. La toma de agua se encuentra ubicada en una balsa a unos 90 m de distancia del muelle del MAG. La profundidad de la toma de agua es de 4 m (fig. 2).

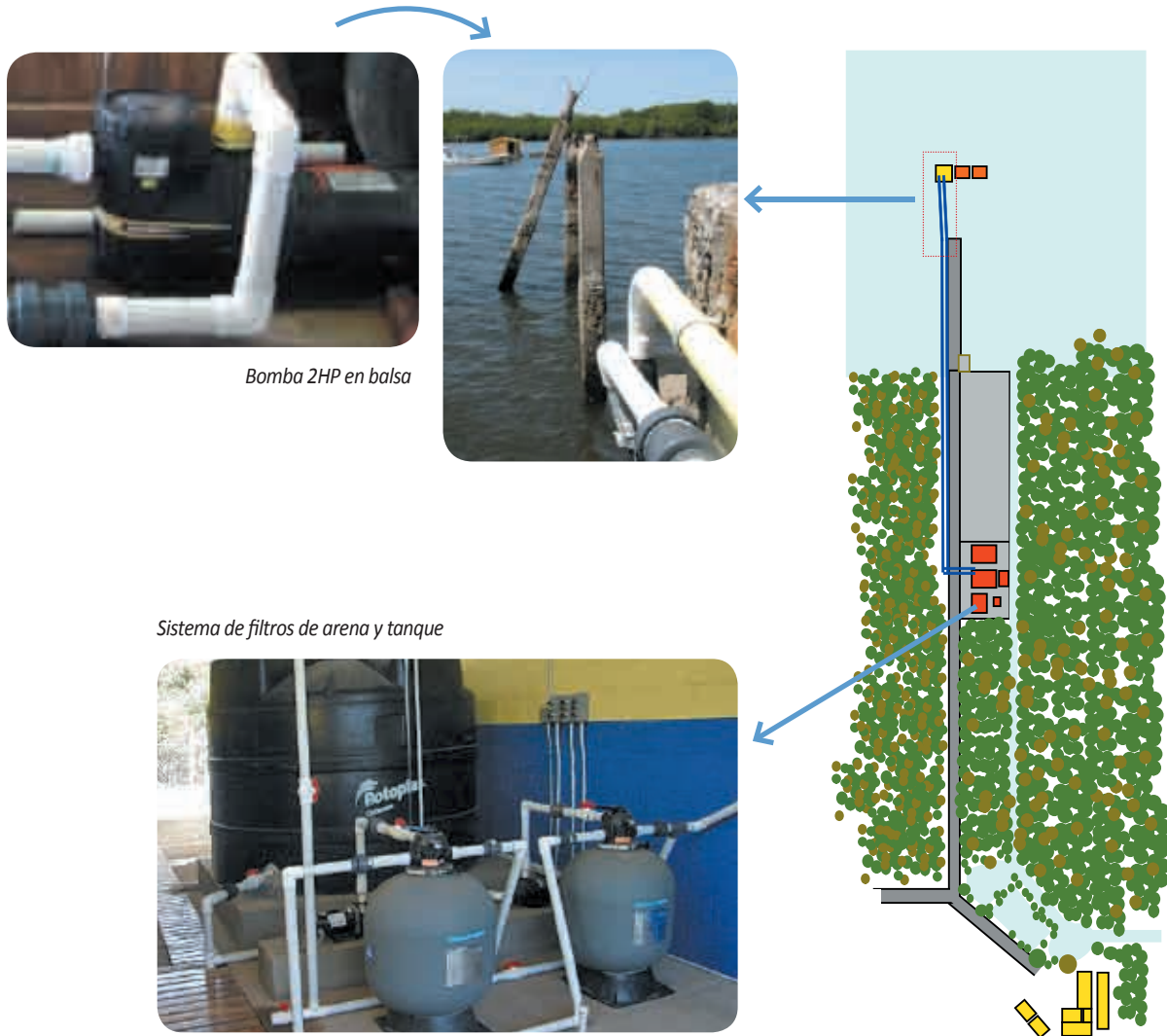


Fig. 2 Toma de agua de mar

Sistema de Filtros y bombas

El agua de mar es almacenada en un tanque de 5000 L, del cual es extraída mediante bombas de $\frac{3}{4}$ HP y enviada a los filtros de arena los que constituyen el primer sistema de filtración. Posteriormente el agua se dirige hacia el interior de la estación acuícola (fig. 3).



a)



b)



c)



d)

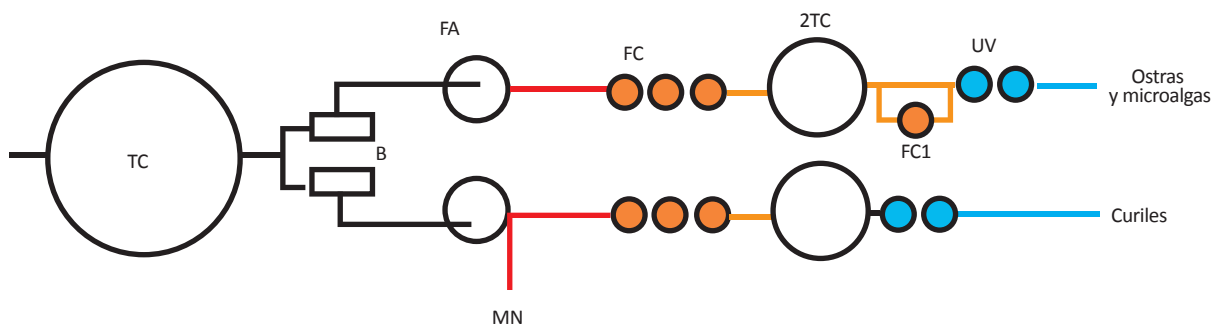


Fig. 3 Sistema de tratamiento del agua de mar. a) Tanque de Almacenamiento b) filtros de arena, c) bomba de $\frac{3}{4}$ HP, d) Control de apagado, manual y automático de las bombas, e) diagrama de las etapas de filtrado. (TC) Tanque de captación, (B) bombas, (MN) agua para cultivo en tanques de microalga nativa, (FC) filtros de cartucho de 30μ , 10μ y 5μ . (2TC) tanque de captación, (FC1) filtro de 1μ en bypass, (UV) lámpara de luz ultravioleta.

Dentro de la Estación Acuícola se realiza el segundo sistema de filtrado al agua de mar. Este sistema está compuesto por tres filtros de cartucho de 30 μm , 10 μm y 5 μm . Estos filtros son lavados diariamente con agua limpia para eliminar las partículas retenidas.

Después del microfiltrado el agua se almacena en un tanque de 400 L que se encuentra elevado a una altura de 1.5 m del nivel del piso para facilitar el llenado de los tanques de cultivo de larvas. (fig. 4)

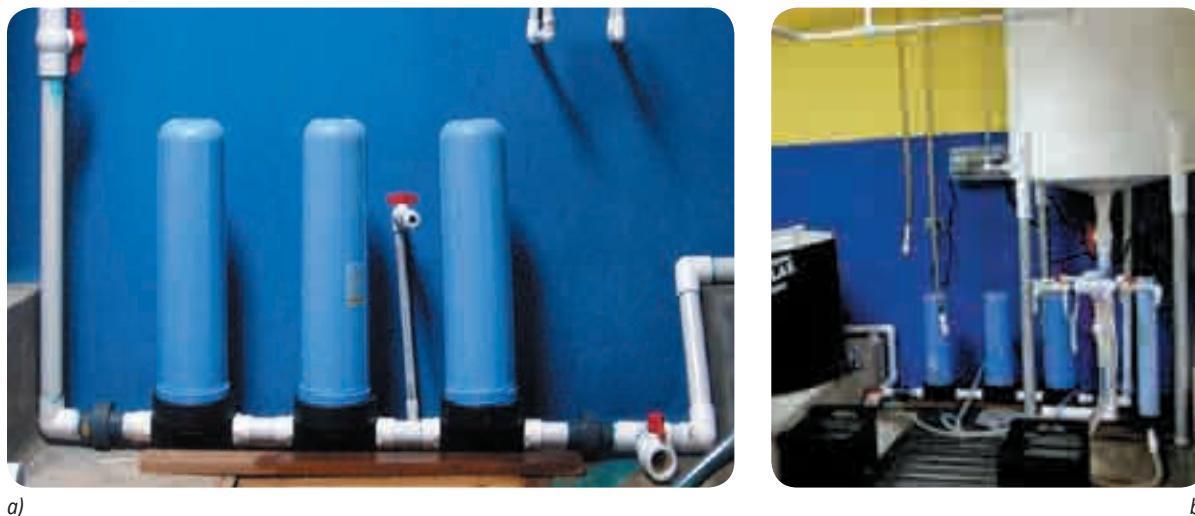


Fig. 4. a) Cartuchos de filtros de hilo, b) tanque de 400 L

Esterilización del Agua de Mar:

La esterilización del agua de mar se realiza utilizando dos lámparas de luz ultravioleta de 40 Watts marca LifeGuard, colocada de forma paralela con controles independientes. (fig.5)

El flujo del agua calculado es de 18 L/min aproximadamente. El agua esterilizada se usa en el cultivo de las microalgas y el cultivo de larvas.

Todas las tuberías y mangueras utilizadas en el bombeo y distribución del agua de mar son de PVC y plástico. Las válvulas y desagües son también de PVC y las bombas no tienen implepe metálico. El diámetro de las tuberías varía de acuerdo a la necesidad.



Fig. 5 Lámparas UV de 40W

Tratamiento de los efluentes

El agua utilizada en la producción de semillas de moluscos es colectada en tanques de asentamiento y posteriormente filtrada en un pozo resumidero para luego ser depositada en la Bahía. Este sistema está diseñado de acuerdo a las normas del Ministerio del Medio Ambiente (fig. 6).

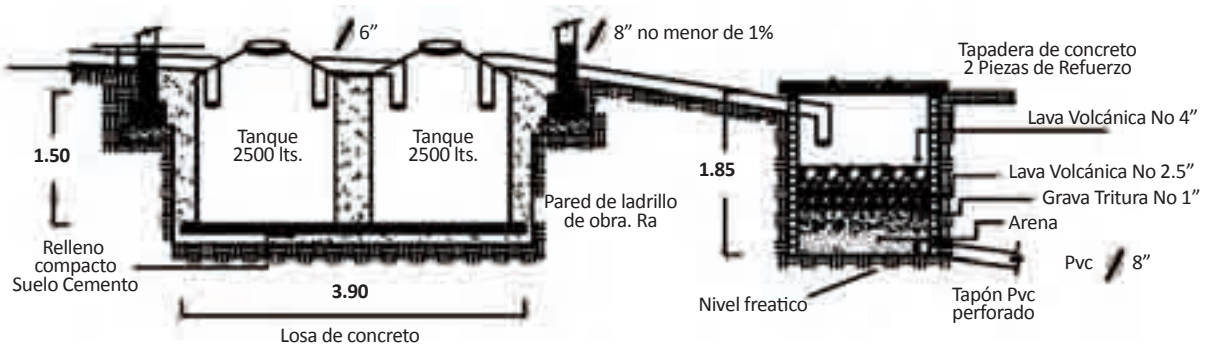


Fig. 6 Sistema de tratamiento de efluentes.

2.2 Sistema de abastecimiento de agua dulce

El agua dulce de la estación se obtiene desde un pozo artesanal que se encuentra ubicado a unos 500 m de distancia. Para la distribución dentro de la estación se utiliza una bomba de $\frac{3}{4}$ HP y un tanque de presión. (fig. 7)



Fig. 7 Sistema de bombeo de agua dulce.

2.3 Sistema de aireación

El sistema de aireación es alimentado por 4 sopladores de 1 HP que se encuentran instalados dentro de la caseta de maquinas de la Estación Acuícola. Cada uno de los sopladores puede funcionar independiente.

Las tuberías del sistema de aireación son de PVC de 2" y se puede reducir de acuerdo a las necesidades en cada ambiente. Las tuberías para la aireación de los tanques de cultivo de larvas en las salas de cultivo se encuentran fijadas en el techo del laboratorio (fig. 8)



Fig. 8 Sopladores y tuberías de aireación.

2.4 Sistemas e instalaciones complementarias

Generador de emergencia

Durante la ocurrencia de cortes eléctricos el laboratorio puede mantenerse funcionando por un generador de emergencia de 20 KVA de potencia. Los equipos que están conectados a este sistema de emergencia son las lámparas y el aire acondicionado en la sala de producción de microalgas, los sopladores, el chiller, algunas lámparas de emergencia en todos los ambientes y una refrigeradora (fig. 9)



Fig. 9 Generador de emergencia 20 KVA

Laboratorio seco y Bodega

En el laboratorio seco se encuentran los microscopios y otros equipos que no pueden estar en los ambientes húmedos de la estación. Esta área es de observación de muestras y además se utiliza como área de trabajo. La bodega de la estación acuícola se encuentra ubicada en las oficinas administrativas del CENDEPESCA Puerto El Triunfo (fig. 10).



Fig. 10 Laboratorio seco y bodega





3. Cultivo de microalgas



3.1 Importancia del cultivo de microalga

El cultivo de microalga juega un papel importante en todo laboratorio acuícola, ya que es la que proporciona el alimento para cada etapa de desarrollo de los cultivos, desde larva hasta semilla para engorde. Para llevar una dieta variaría y proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo de nuestra producción de semilla de moluscos se cultivan 4 tipos de microalga. (Tabla 1)

Tabla 1. Microalgas cultivadas en estación acuícola

Especie	Tamaño de célula	Especie a Alimentar	Fase de alimentación para cultivos	Esquema
<i>Chaetoceros gracilis</i>	7 - 8 Micras	Ostra Curil Casco de burro	Larva post larva Semilla Reproductor	
<i>Isochrysis galbana (T-iso)</i>	5 - 7 Micras	Ostra Curil Casco de burro	Larva post larva Semilla Reproductor	
<i>Tetraselmis sp</i>	8 - 20 Micras	Ostra	Reproductor	
<i>Nannochloropsis sp.</i>	3 - 5 Micras	Curil Casco de burro	Larva post larva Semilla Reproductor	

La limpieza, manejo de densidades, agua, cristalería, etc., son algunos de los elementos de los cuales son imprescindibles para el manejo de los cultivos dentro del laboratorio.

3.2 Materiales y equipos

Cristalería

- Balones de 2 L, 1 L
- Erlenmeyer de 100 ml, 50 ml.
- Matraz de 100 ml y 50 ml
- Beaker 50 ml hasta de 1 L
- Pipetas
- Capilares

La limpieza de cristalería se realiza dentro del laboratorio, utilizando agua dulce, arena y ácido muriático al 5%. Balones, matraces, beaker, pipetas, capilares, etcétera; son de uso diario, por lo que la limpieza de estos materiales se realiza de manera constante para evitar cualquier contaminación al momento de inocular o preparar nutrientes. (fig. 1)

Como mínimo se debe de realizar un enjuague de 10 veces, tanto de la parte interna y externa de cada cristalería, en casos severos de suciedad se utiliza arena y ácido muriático al 5%, luego se neutraliza con agua dulce y son colocados en una parrilla para su secado al aire, posteriormente son guardados dentro de un estante de vidrio.



Fig. 1 limpieza de cristalería utilizando agua dulce y arena

Botellas, Tanques y otros

- Botellas de 18 L
- Tanques plásticos de 500 L
- Tanques de Policarbonato de 100 L
- Mangueras para aire
- Tapones para botellas
- Piedras de Aireación

La limpieza de botellas de 18 L se realiza con agua dulce y arena hasta remover la suciedad de la parte interna. El exterior también se lava con agua dulce. (fig. 2)

Una vez limpia se colocan en estantes para escurrir y secar a temperatura ambiente, luego son guardadas dentro del cuarto de microalga en un lugar seco y limpio para su posterior uso.



Fig. 2 limpieza de botellas de 18 litros

Para el caso de los tanques plásticos de 500 L se limpian manualmente, utilizando agua dulce y cepillo de cerdas plásticas. (fig. 3)

La limpieza se realiza tanto en la parte interna como externa del tanque después de cada cosecha, para evitar que la suciedad se adhiera a las paredes del tanque. Una vez limpios se dejan secar a temperatura ambiente con exposición directa al sol por un periodo de un día como mínimo, para eliminar bacterias y otros contaminantes. Antes de su uso se enjuagan con agua salada.



Fig. 3 limpieza manual de tanques de 500 L

Los tanques de policarbonato de 100 L, tapones plásticos, mangueras para aire y piedras de aireación son limpiados utilizando cepillo plástico y abundante agua dulce para eliminar la suciedad.

Para la limpieza de la cristalería, botellas y demás equipos no se debe de utilizar en ningún momento jabón u otro tipo de detergente debido a residuos que pueden afectar a los cultivos.

3.3 Preparación de nutrientes

En la estación acuícola de Puerto El Triunfo, se utiliza en laboratorio los siguientes nutrientes: Solución 1 (Parte A + Parte B) para el cultivo de *Isochrysis galbana* (T-iso) *Nannochloropsis sp.* (nano) y para *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis sp.* Solución 1 + Parte C (Metasilicato de Sodio) ambos nutrientes, según composición de F2 de Guillard. (Tabla 2; fig. 4 y 5)

Tabla 2. F2 de Guillard.

Solución	Reactivo	Cantidad (g)
I (N/P)	NaNO_3	75g
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
	Agua destilada	total 1000ml
II (Si)	$\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	15g
	Agua destilada	total 1000ml
III (metal)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0098g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.063g
	Na_2EDTA	4.36g
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15g
	Agua destilada	total 1000ml
IV (Vitamina)	Biotina	0.005g
	B_{12}	0.005g
	Tiamina (B_1)	0.1g
	Agua destilada	Total 1000ml



Fig. 4 Kit de Solución 1 parte A más parte B



Fig. 5. Parte C Metal Silicato de Sodio

Fertilizante Hidrosoluble 20-20-20

La preparación del Fertilizante Hidrosoluble formula 20-20-20 se utiliza agua destilada para facilitar la disolución en los tanques de 500 L, evitando el sedimento del fertilizante, realizándose de la siguiente manera (fig.6)

1. Colocar 1 L de Agua destilada en un beaker.
2. Disolver 100 g de fertilizante por cada 1600 ml de Agua destilada.
3. Rotular el recipiente con nombre, fecha y volumen.
4. Conservarlo en el refrigerador



Fig. 6. fertilizante utilizado para el cultivo de microalga nativa

3.4 Inoculación y método de conteo

Hematocitometro o Cámara de Neubauer

Es un instrumento fundamental en todo cultivo celular; ya que mediante este instrumento se puede realizar conteos de células en un medio de cultivo líquido. (fig. 7)

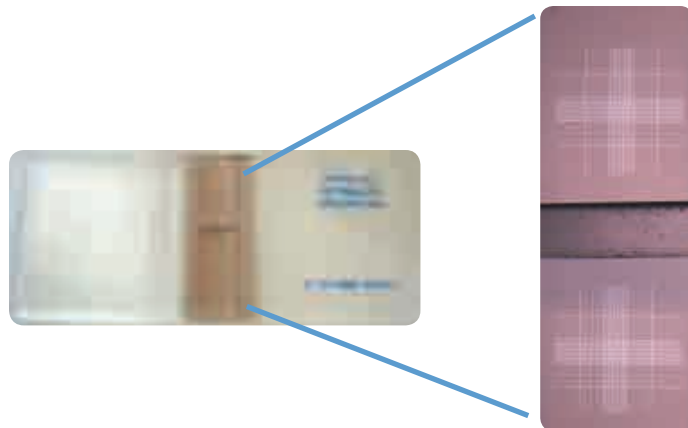


Fig. 7. Hematocitometro

Conteo de células utilizando el Hematocitometro

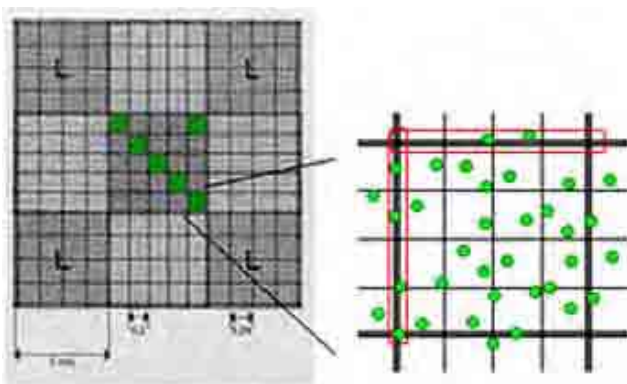


Fig. 8 Método de conteo utilizando el hematocitometro.

a) Colocar el cubre objeto sobre la cámara de conteo de hematocitometro y presionar deslizar hasta formar los anillos de newton.

b) Colocar una gota de muestra entre el cubre objeto y la cámara de conteo, utilizando una micropipeta.

- c) Contar todas las células dentro de cada uno de los 6 cuadrantes, excluyendo las células de lado izquierdo y superior de cada cuadrante (fig. 8).
- d) Eliminar los valores máximos y mínimos de los seis cuadrantes y calcular el promedio de células.
- e) Con el promedio calcular densidad de células a partir de la siguiente fórmula:

Densidad de Células/ml

Promedio de conteo x 25 x 10,000 (constante para convertir a 1ml)

3.5 Cepa-mantenimiento

Es necesario el almacenamiento de cada especie de microalga de manera aislada para obtener resultados eficientes durante las replicación, el mantenimiento de cepa se da a partir del aislamiento de la microalga causada por contaminación (fig. 9).

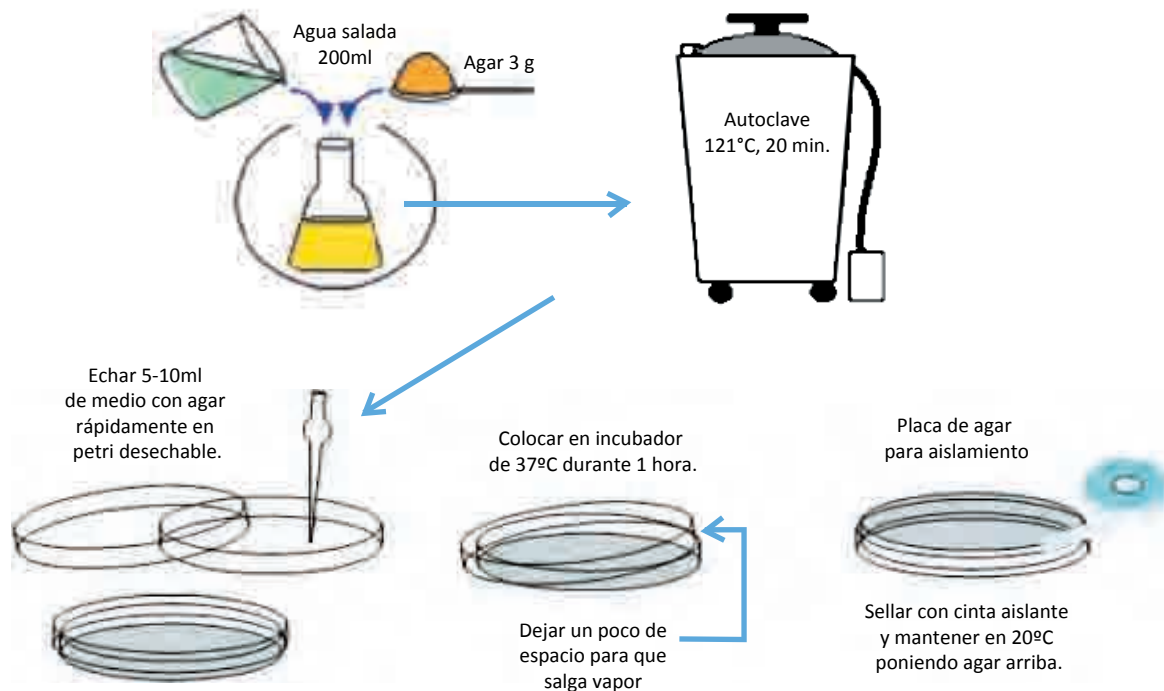


Fig. 9 Preparación de Placa de agar

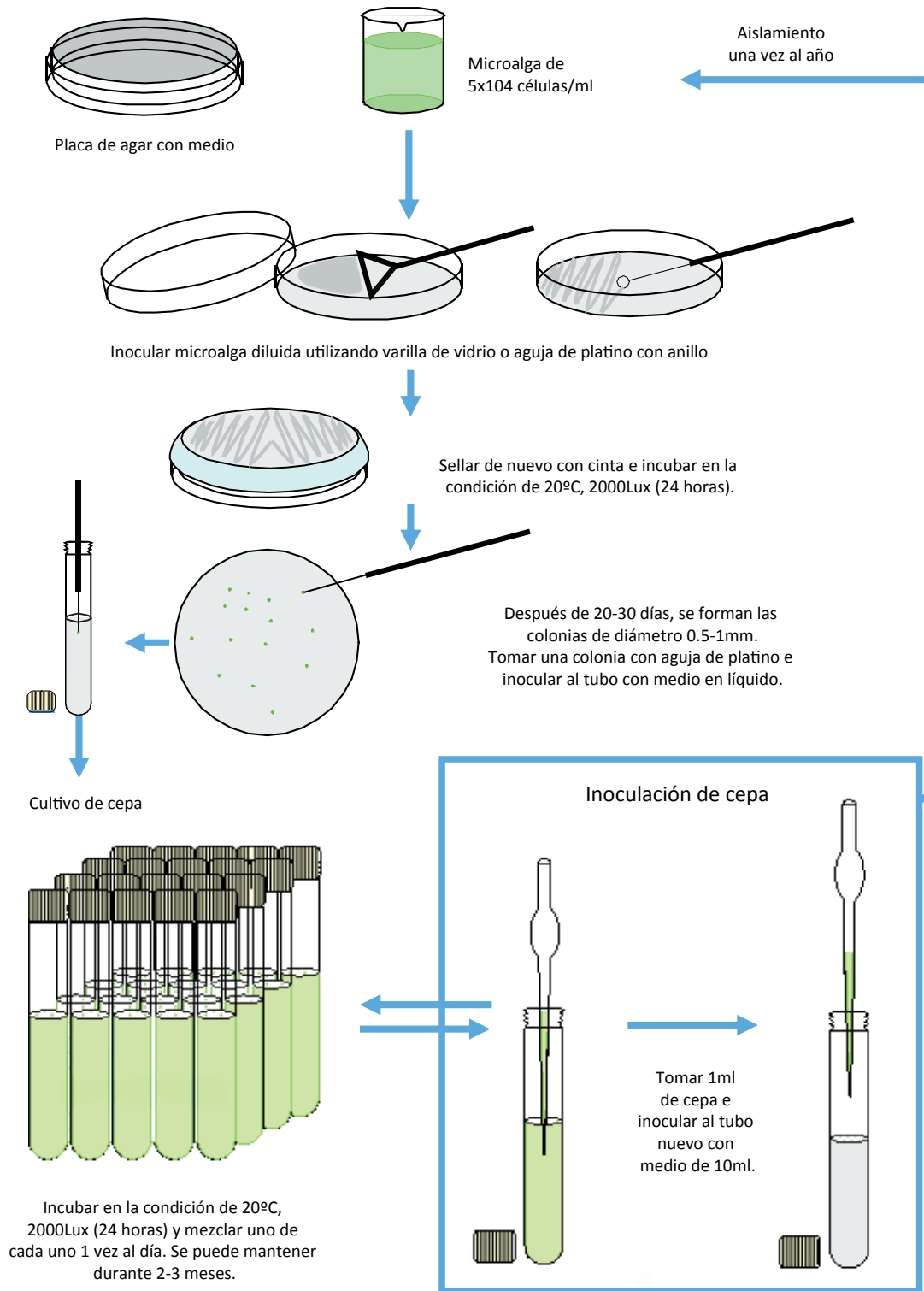


Fig. 10 Aislamiento de microalga (*Nannochloropsis* o *Chaetoceros*)

3.6 Cultivo inicial

Replicación a cultivo de matraz de 50 ml

- Pasteurizar 2000 ml de agua de mar a 80° C por 15 minutos.
- Enfría a temperatura ambiente y agregar los nutrientes 0.4 ml de Solución 1 para el caso de *Isochrysis galbana* (T-iso) *Nannochloropsis* sp. (nano) y para *Chaetoseros gracilis* y *Tetraselmis* sp. 0.4 ml Solución 1 + 0.4ml de Silicato; por cada 1000 ml de agua de mar pasteurizada.
- De esta solución verterlos en cada uno de los frascos (50 ml) a un volumen de 40 ml.
- Pasteurizar nuevamente los frascos á 80° C por 15 minutos y luego enfriar a temperatura ambiente.
- Inocular a 75,000 células/ml desde cepa de microalga. (fig. 11)
- Mantener a 24°C y sin aireación con un fotoperiodo de 12 h.



Fig. 11 Método de replicación de cepa a frasco de 50 ml

3.7 Pre-masivo

Replicación a Cultivo Pre – Masivo en 1000 ml y 2000 ml

- Pasteurizar a 80° C por 15 minutos; balones de 1000 ml ó 2000 ml con agua de mar previamente filtrada y purificada.
- Enfriar los balones a temperatura ambiente.
- Agregar los nutrientes 0.4 ml de Solución 1 para el caso de *Isochrysis galbana* (T-iso) *Nannochloropsis* sp (nano) y para *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis* sp. 0.4 ml Solución 1 + 0.4ml de Silicato; por cada 1000 ml de agua pasteurizada.
- Inocular con 75,000 cel/ml desde cultivo inicial.

- e) Colocar capilar y manguera para aireación
- f) Rotular cada balón con nombre de la especie y fecha de inoculación, para ser utilizada en cultivo Masivo. (fig. 12)

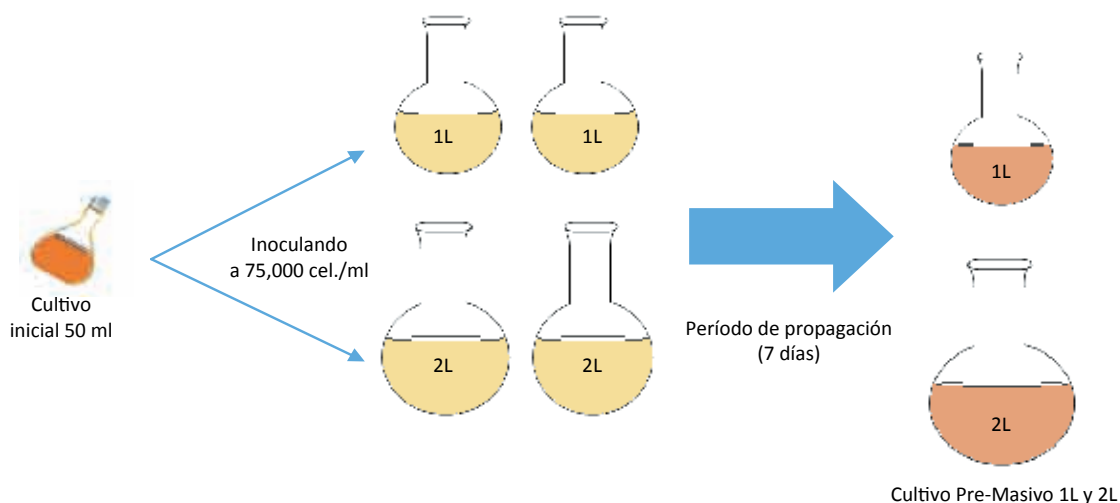


Fig. 12 Inoculación de cultivo inicial a pre-masivo.

3.8 Masivo

Replicación en 18 L y 100 L

- a) Utilizar agua de mar filtrada y purificada para el llenado de las botellas y tanques de 100L.
- b) Observar la microalga del cultivo pre – masivo al microscopio para ver su condición y determinar la densidad.
- c) Inocular a 75,000 células/ml
- d) Agregar los nutrientes respectivos según la especie a cultivar 7.4 ml Solución 1 para *Isochrysis galbana* (T-iso) y *Nannochloropsis* (nano); y para *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis* sp. 7.4 ml Solución 1 + 7.4 ml de Silicato en ambos caso para cultivo en botellas; y para el cultivo en tanques de 100 L 40 ml de solución 1 + 40 ml de silicato para *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis* sp. (fig. 13)
- e) Colocar capilar y manguera para aireación.
- f) Rotular cada botella y tanque con el nombre de la especie y fecha de inoculación.

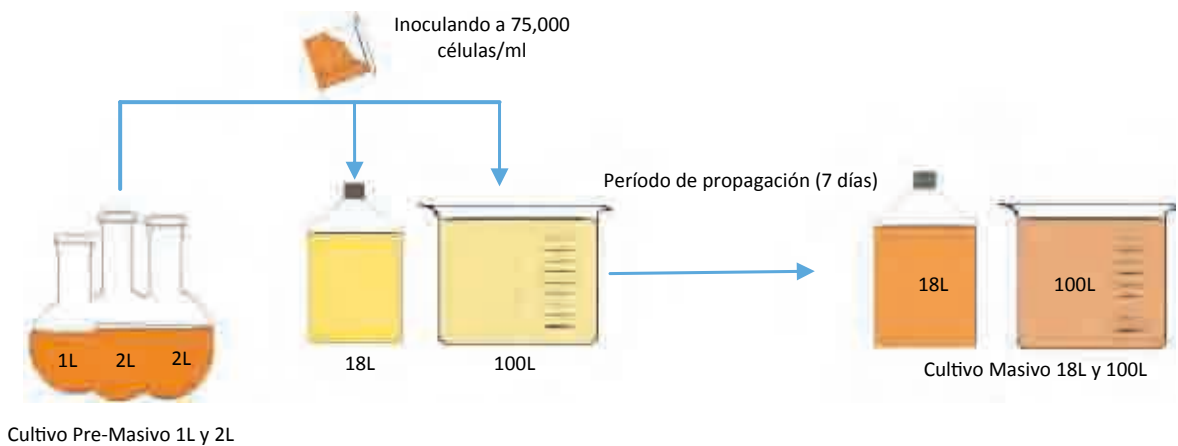


Fig. 13 Inoculación de cultivo pre-masivo a cultivo masivo.

4.4 Microalga nativa

Replicación en 500 L

- Llenar los tanques de 500 L con agua de mar filtrada en malla de 50 μm .
- Colocar 80 ml de fertilizante hidrosoluble previamente preparado a cada tanque a utilizar. (fig. 14)
- Colocar manguera con piedra de aireación.

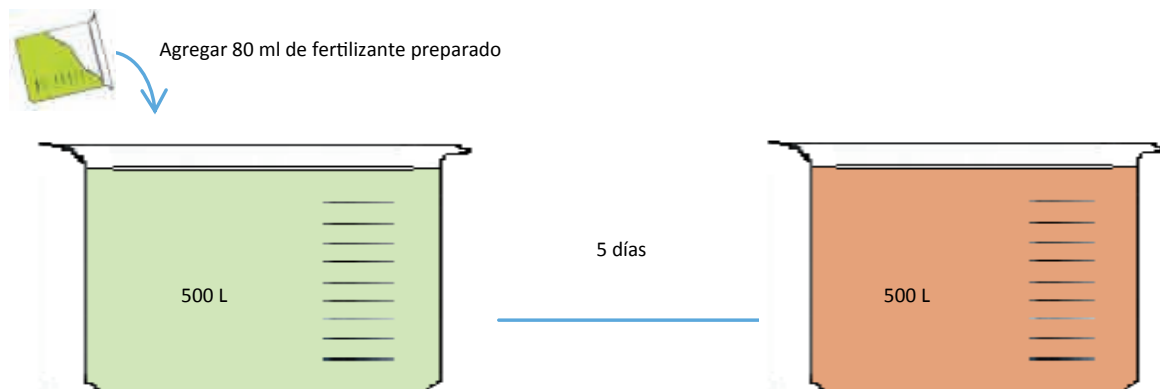


Fig. 14 Fertilización de tanques para cultivo de microalga nativa.

