

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ



INFORME

ISSN 0378-7702

Volumen 45, Número 2



Abril - Junio 2018
Callao, Perú



MANUAL PARA OBTENCIÓN DE CEPAS DE MICROALGAS

MANUAL FOR OBTAINING MICROALGAE STRAINS

Liz Cecil Tenorio García-Blásquez¹

Hanna Elizabeth Hernández Acevedo

Marco Antonio Aguirre Obregón

RESUMEN

TENORIO L, HERNÁNDEZ H, AGUIRRE M. 2018. *Manual para obtención de cepas de microalgas*. *Inf Inst Mar Perú*. 45(2): 277-291.--Este manual es un producto del Programa Presupuestal PpR 0094: Ordenamiento y Desarrollo de la Acuicultura con el fin de difundir las metodologías de laboratorio utilizadas para la obtención de cepas de microalgas en el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Instituto del Mar del Perú. Se explican y detallan los procedimientos para preparar medios de cultivo y obtener cepas de microalgas marinas y de agua dulce. El manual también presenta aspectos generales de la biología de las microalgas, importancia y usos actuales.

PALABRAS CLAVE: acuicultura; cepas; cultivo axénico; microalgas.

ABSTRACT

TENORIO L, HERNÁNDEZ H, AGUIRRE M. 2018. *Manual for obtaining microalgae strains*. *Inf Inst Mar Peru*. 45(2): 277-291.- This manual is a product of the Budget Program PpR 0094: Aquaculture Management and Development in order to disseminate the laboratory methodologies used to obtain microalgae strains in the Germplasm Bank of Aquatic Organisms of the Peruvian Marine Research Institute. The procedures for preparing cultivation media and obtaining strains of marine and freshwater microalgae are explained and detailed. The manual also presents general aspects of microalgae biology, its importance and current uses.

KEYWORDS: aquaculture; strains; axenic cultivation; microalgae

INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con alrededor de 12000 cuerpos de agua entre lagos, lagunas y cochas (ANA 2011) además con un litoral marino de 3080 km de alta productividad primaria. Los cuerpos de aguas continentales se distribuyen entre 0 y 5000 m de altitud, proporcionando hábitat de diversas condiciones medioambientales para las microalgas. Muchos de los cuerpos de agua continentales muestran características oligotróficas y aún no exhiben un impacto antrópico significativo, mientras que otros presentan características eutróficas debido principalmente al impacto humano (acuicultura, turismo, desechos urbanos), los cuales modifican el ambiente y como consecuencia son principales causas de pérdida de biodiversidad afectando también a las microalgas.

Las microalgas se utilizan para distintos fines, como: *producción de proteínas o piensos, productos fertilizantes, metano y acuicultura* (COLL 1991); también se utilizan en *producción de productos farmacéuticos, suplementos dietéticos, pigmentos y biocombustibles y como alimento en la acuicultura* (CRESWELL 2010). Esto ocurre porque las microalgas tienen muchas ventajas y potencialidades, como por ejemplo rápido crecimiento, el cual puede escalonarse para llegar a grandes volúmenes.

Su capacidad natural de fijar grandes cantidades de dióxido de carbono y de almacenar aceites que pudieran ser utilizados como fuente de biocombustibles, contribuyendo en la reducción del uso de combustibles fósiles (VARELA 1988) señalan a las microalgas como una de las soluciones ecológicas más importantes en el mundo (SCOTT *et al.* 2010).

En la acuicultura, las microalgas son utilizadas como alimento para el crecimiento y desarrollo de diversas etapas larvales de otros organismos acuáticos cultivados (ABALDE *et al.* 1995). Las microalgas utilizadas para acuicultura deben tener características específicas como no presentar toxinas dañinas para los organismos a alimentar, tamaño adecuado, pared celular digerible y una composición bioquímica adecuada para la óptima nutrición de los organismos cultivables. Existen otras características ligadas a la fisiología de la especie como resistencia a la foto-inhibición, fotoperiodos, sensibilidad a concentraciones de oxígeno y el estrés osmótico.

La selección de la microalga a cultivar es posible mediante la obtención de un cultivo unialgal (monoespecífico) logrado a partir del aislamiento de una unidad algal en condiciones de higiene.

¹ Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, Instituto del Mar del Perú. ltenorio@imarpe.gob.pe

La obtención de este cultivo se logra desde el muestreo, donde se encuentra la microalga a trabajar, hasta la propagación a mayores volúmenes y alcanzar un cultivo axénico. El trabajo en laboratorio comprende procesos microbiológicos de aislamiento celular, cultivo en asepsia y mantenimiento de las microalgas en condiciones simuladas del medio natural. Este manual presenta las pautas y pasos a seguir para la obtención de cepas microalgales.

GENERALIDADES

Las microalgas pueden ser unicelulares, filamentosas, formar colonias cenobiales y también existen formas coloniales macroscópicas. Como toda célula eucariota vegetal, las microalgas presentan información genética en un núcleo, uno o más cloroplastos y pared celular. La clorofila y otros pigmentos como carotenos se encuentran dentro de los cloroplastos.

Estos organismos son importantes productores primarios de biomoléculas mediante la fotosíntesis, utilizan energía luminosa y la transforman en energía química. Algunos son fotoautótrofos obligados (GLADUE 1991) no obstante otros son solamente heterótrofos y no requieren energía luminosa ya que asimilan la energía a partir de compuestos orgánicos disueltos. Otras especies son mixotróficas y utilizan energía luminosa para dividirse y depredan otras microalgas, como el caso de algunos dinoflagelados (HOFF y SNELL 2001). Generalmente las microalgas flageladas pueden dividirse en lapsos de 24 horas, las diatomeas se dividen de 2 a 3 veces al día y las clorofitas entre 4 a 5 días (LAVENS y SORGELOOS 1996).

En su mayoría son organismos acuáticos, sin embargo existen formas que habitan en sedimentos, suelo, epifitos y forman simbiosis como en los líquenes. Las microalgas se encuentran tanto en ambientes marinos como en agua dulce y muchas de ellas pueden adaptarse a ambos hábitats. Se encuentran ampliamente distribuidas por todos los cuerpos de agua en el planeta; existen muy pocas especies de microalgas a las que se les considera endémicas.

En el mar las microalgas son parte del plancton, algunas son bentónicas y otras se encuentran en toda la columna de agua. Muchas microalgas viven en ambientes extremos como nieve o hielo,

suelo y hasta roca volcánica adaptándose a la poca incidencia de luz, escasos nutrientes, efectos de corrientes, sedimentación y depredadores.

CONDICIONES DE CULTIVO

Las condiciones de laboratorio influyen en el crecimiento y mantenimiento fisiológico de las microalgas. Por lo tanto, es importante conocer las condiciones óptimas de cada especie de microalga, así como sus rangos de tolerancia según las fluctuaciones de los parámetros. Los factores químicos esenciales en el cultivo de microalgas para su óptimo crecimiento son el suministro de nutrientes y microelementos a concentraciones adecuadas y en cuanto a factores físicos se menciona la calidad y cantidad de luz, temperatura, salinidad, pH y fotoperiodo (CAÑIZARES *et al.* 1994).

Los requerimientos de las microalgas en cultivo dependerán de la especie y se manejan los siguientes factores, ver Tabla 1.

El crecimiento y mantenimiento de las células en un cultivo microalgal depende de la asimilación de unos 15 a 20 compuestos nutricionales y minerales que se encuentran en el medio.

Los nutrientes se clasifican en dos grupos. Los macronutrientes, que son elementos utilizados en la formación y mantenimiento de las células, conformados por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio y los micronutrientes que son utilizados en menor concentración como catalizadores en funciones reguladoras osmóticas, representados por hierro, manganeso, zinc, molibdeno, vanadio, bario, cloro, cobalto, calcio, sílice y sodio (GUILLARD 1975).

Tabla 1.- Los requerimientos de las microalgas en cultivo

Factores físicos	Temperatura: 15 a 22 °C
	Fotoperiodo: 12:12 (luz: oscuridad)
	Intensidad lumínica: 60-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$
Factores químicos	Salinidad: 0-37‰
	pH: 7 a 9
	Nutrientes: C, O, H, N, P, S, Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, B, Br, Si, Cu, Co, Cl, Sr, Rpb
	Vitaminas: B12, tiamina, biotina

Algunos factores pueden afectar la disponibilidad de los nutrientes, por ejemplo en medios alcalinos los metales precipitan, por lo que agentes quelantes como EDTA (ácido etil diamino tetracético) coadyuvan a la disponibilidad de estos metales para las células (KAPLAN *et al.* 1986).

También, es necesario añadir al medio de cultivo vitaminas esenciales para el metabolismo de las microalgas. Las vitaminas representadas por tiamina (B_1), cianocobalamina (B_{12}) y biotina (B_7) son consideradas esenciales para la mayoría de microalgas, se estima que toda microalga planctónica requiere cianocobalamina para su óptimo crecimiento (SPOTTE 1979).

La mayoría de las microalgas son fotoautótrofas, realizan la fotosíntesis para transformar la energía luminosa en energía metabólica. El periodo de exposición a la luz influye en los procesos de reproducción y crecimiento de las células (RICHMOND 1986), por ejemplo en diatomeas la reproducción asexual por fisión binaria ocurre en periodos de luz y la formación de esporas en periodos de oscuridad. La calidad y cantidad de luz no solo influye en el crecimiento de las microalgas sino también en la composición de macromoléculas, tasas de respiración y actividad de enzimas carboxílicas (VOSKRESENSKAYA 1972). Por ejemplo, la luz roja aumenta las reservas de carbohidratos y la luz azul estimula fotoreceptores que desvían los productos de la fotosíntesis hacia la ruta de síntesis de proteína (RIVKIN 1989).

Por otro lado, debe tomarse en cuenta algunos aspectos en el manejo del factor luz, así como también la irradiación, la distribución espectral y el fotoperiodo. La irradiancia para muchas algas en cultivo de mantenimiento es de 10 - 30 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{seg}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (1 - 2% de luz solar completa) (GUILLARD y MORTON 2003).

La respuesta a altos valores de intensidad lumínica, generando mayor proporción de pigmentos y lípidos está relacionada a la protección de la célula (SANCHEZ-SAAVEDRA y VOLTOLINA 2002). En cultivos donde existe muy poca concentración de células se debe mantener la luz constante y no tan intensa ya que las microalgas pueden decaer en su crecimiento poblacional por foto-inhibición al dañar el fotosistema II.

Los cultivos donde existe mayor densidad de células son capaces de utilizar la luz incidente con mayor eficacia ya que las células más cercanas a la fuente de luz dan sombra a las más alejadas, este proceso se conoce como auto-sombreado (CONTRERAS-FLORES *et al.* 2003).

La temperatura adecuada en el ámbito de cultivo debe ser cercana a la temperatura del medio natural de donde fue extraída la microalga, al menos hasta que se adapte a la temperatura programada en el laboratorio.

Es importante reconocer si las fuentes de luz en el laboratorio pueden influir en la temperatura ya programada.

La temperatura es importante en la disociación de moléculas de carbono para que puedan estar a disponibilidad de las células al momento de realizar la fotosíntesis y también es directamente proporcional a la tasa de respiración celular (KOMMAREDDY y ANDERSON 2003).

Las especies tropicales presentan un rango de tolerancia de 16 a 27 °C; en valores menores de este intervalo el crecimiento disminuye mientras que a temperaturas mayores el cultivo sufriría un colapso (HOFF y SNELL 2001). Se conoce que los cambios de temperatura crean modificaciones en las rutas metabólicas como los observados en la biosíntesis de carotenoides donde se ha encontrado el aumento de astaxantina y luteína (DEL CAMPO *et al.* 2004) y también se asocia a cambios morfológicos en algunos clorófitos de agua dulce (MARTIN 2010).

La salinidad óptima para el cultivo de una microalga depende de la especie y población de donde fue extraída. Generalmente, este parámetro no es muy controlado en cultivos marinos ya que se trabaja con la misma salinidad del océano (35 ppm). Sin embargo, esto puede variar con microalgas que provienen de estuarios y ambientes salobres.

El pH es otro factor importante en los cultivos. Si existieran variaciones respecto del valor óptimo del pH de un cultivo, el crecimiento celular y los procesos metabólicos disminuyen (BOROWITZKA y BOROWITZKA 1988). El pH está

influenciado por la productividad algal, respiración celular, alcalinidad del medio, composición iónica del medio de cultivo, actividad microbiana y concentración de CO₂. En ciertos niveles alcalinos de pH, se compromete la disponibilidad de CO₂ llegando a ser un limitante para el crecimiento y fotosíntesis.

Muchos autores coinciden en que el rango óptimo para microalgas en general es de 7 a 9 (DEL RÍO *et al.* 2007, MARTIN 2010).

AISLAMIENTO Y CULTIVO EN CEPAS (UNIALGAL)

El agua de mar es un medio complejo que contiene más de 50 elementos conocidos, gran cantidad de compuestos orgánicos y que además son cambiantes a lo largo del año.

Por esta razón, en cultivos de microalgas marinas, el agua de mar utilizada debe ser previamente esterilizada y enriquecida para mantener balance de nutrientes y garantizar la asepsia del cultivo. Este equilibrio de nutrientes consiste en adicionar los principales nutrientes inorgánicos como NO₃⁻, PO₄³⁻, silicatos, metales trazas, quelados y vitaminas (BERGES *et al.* 2001).

Las microalgas crecen bajo condiciones naturales en comunidades; sin embargo, cuando se desea realizar un estudio de una especie en particular, se parte de aislar una célula para cultivarla y lograr su proliferación sin la interferencia de otros organismos. El aislamiento y reproducción por fisión binaria a partir de una célula asegura la misma información genética en todas las células del cultivo (GONZÁLEZ *et al.* 1995) aunque durante este proceso pueden ocurrir mutaciones derivadas de condiciones ambientales (PRATT 1944).

Un cultivo unialgal es sostenible en el tiempo, siempre y cuando existan las condiciones de asepsia, sin contaminantes como protozoarios, otras microalgas, hongos y materia orgánica no disuelta. No obstante, muchas veces la presencia de bacterias asociadas contribuye al crecimiento y mantenimiento de un cultivo microalgal, porque se sabe que algunas bacterias producen vitamina B₁₂ (cianocobalamina) utilizada en procesos metabólicos de las microalgas (HOFF y SNELL 2001). El mantenimiento de los cultivos unialgales en laboratorio depende de

factores físicos esenciales como iluminación, temperatura y fotoperiodo.

Una vez obtenido el inóculo o cepa, se puede escalar a mayores volúmenes para su mantenimiento bajo las mismas condiciones. Es importante mantener cultivos en menores volúmenes a manera de stocks o cultivos de respaldo ante la posible ocurrencia de muerte celular repentina o contaminación, los que deben ser mantenidos realizando recambios de nutrientes según lo requiera la microalga.

Al aumentar el volumen de los cultivos, para prevenir contaminación por bacterias, se debe trabajar en condiciones de asepsia utilizando materiales estériles y con ayuda de un mechero. Otra manera de evitar contaminación es realizar el procedimiento de transferencia bajo una campana de flujo laminar, pasando el aire por filtros. También es recomendable utilizar lámparas germicidas de UV antes de realizar el trabajo.

El cultivo de cepas no requiere aireación, por el volumen de siembra o mantenimiento y para evitar posible contaminación.

El propósito de realizar recambios de nutrientes y escalonamiento en volúmenes es mantener una población fisiológica, morfológica, y genéticamente saludable.

Existen factores que se deben tener en cuenta en el mantenimiento de subcultivos de una microalga, como la edad que se relaciona con la presencia de diferentes estadios de ciclo de vida, por ejemplo es importante tener dos cultivos de la misma especie pero uno con células flagelares y otro con células en estado vegetativo.

También se encuentran limitaciones con las variaciones en las condiciones de laboratorio que pueden conducir a pérdidas de características morfológicas y fisiológicas de las células. Algunos ejemplos de estas modificaciones morfológicas se dan en las diatomeas cuando se produce la reducción del tamaño de las frústulas (JAWORSKI *et al.* 1988) y modificaciones fisiológicas como la pérdida de composición pigmentaria (WARREN *et al.* 2002).

El modelo de crecimiento de una población en cultivo permite explicar su dinámica y tomar medidas sobre su manejo, en general se reconocen 4 etapas de crecimiento (Fig. 1).

La primera es la fase de adaptación, cuando el cultivo comienza su crecimiento, muchas veces esta etapa presenta una caída leve por la adaptación de la microalga a un nuevo medio.

La segunda es la fase exponencial cuando las células ya están adaptadas al medio de cultivo y empieza una división celular más rápida acercándose a una forma de crecimiento exponencial.

La tercera es la fase estacionaria donde ya no se observa incremento del número de células y la población alcanza un equilibrio, es decir que existe balance entre tasa de natalidad y mortalidad de células.

La cuarta y última fase es el declive o muerte cuando el cultivo empieza a decaer en número de células.

El tiempo que duran las fases depende de la especie de la microalga, las condiciones de cultivo dadas y el suministro de nutrientes o dióxido de carbono (FOGG y THAKE 1987).

Para un cultivo es necesario determinar la curva de crecimiento teniendo en cuenta la cantidad de células por mililitro del cultivo. Los conteos se realizan mediante el uso cámaras de conteo (Neubauer, Segwich y Rafter), por contadores de partículas de membrana o por espectrofotometría.

TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL DE LABORATORIO Y MEDIOS DE CULTIVO

Preparación del material de vidrio

El material de vidrio está conformado por tubos de ensayo, matraces de vidrio (50, 100, 125, 250, 500 y 1000 mL), botellas de vidrio de 1 y 2 L, placas Petri y pipetas.

Lavado: diluir detergente neutro (Extran) con agua potable y con ayuda de escobillas o esponjas lavar el material de vidrio, enjuagar con agua potable hasta eliminar los residuos del detergente, sumergir el material de vidrio

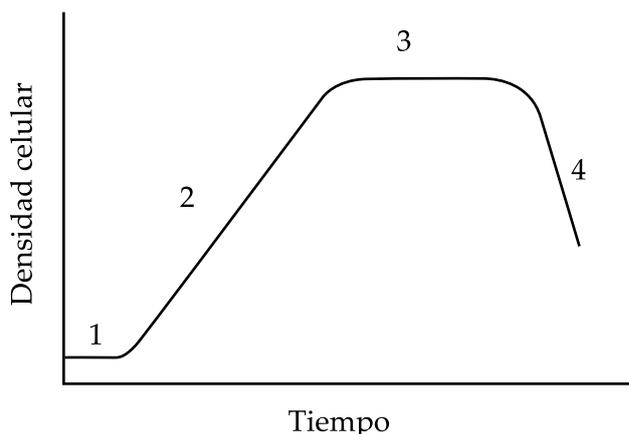


Figura 1.- Curva e crecimiento estándar. 1 Fase de adaptación, 2 Fase exponencial, 3 Fase estacionaria, 4 Fase de declive. Fuente: FOGG y THAKE, 1987

en un balde con la solución de HCl al 5%; ya sea vertical u horizontalmente, dejar actuar la solución ácida (por varias horas, si es necesario), retirar el material de vidrio del HCl y enjuagar 10 veces con agua potable hasta tener la seguridad de haber eliminado el total de la solución ácida, realizar el último enjuague con agua desionizada.

Las pipetas y tubos de ensayo se colocan en el lavador ultrasonido por 30 minutos a 60 °C y se sigue el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Colocar el material limpio en una estufa a 75 °C para el secado. Cuando esté seco, cubrir la boca del matraz con papel aluminio y luego con papel kraft, sujetando con pabilo (Fig. 2), esterilizar en autoclave a 15 lb de presión a 120 °C durante 15 minutos (Fig. 3) en la opción de secado esterilizado, en caso que el material se encuentre húmedo secar en estufa a 80 °C.

Preparación del material de plástico

El material de plástico está conformado por tubos plásticos, puntas, frascos, mangueras.

Diluir detergente neutro (Extran) con agua potable y con ayuda de escobillas o esponjas, lavar todo el material. Enjuagar con agua potable hasta eliminar los residuos del detergente. El último enjuague realizarlo con agua desionizada.

Coloque el material limpio en estufa eléctrica a 75 °C para secar. En caso que el material sea resistente a altas temperaturas el esterilizado se realizará en autoclave.



Figura 2.- Material de vidrio limpio cubierto de papel aluminio y papel kraft



Figura 3.- Esterilizado del material de vidrio



Figura 4.- Agua de mar almacenada en botella de vidrio en oscuridad

Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo deben contener los nutrientes mínimos necesarios para la especie a cultivar. Los insumos para la preparación de los medios de cultivo son reactivos de calidad grado PA (Reactivo Para Análisis), pH adecuado y factores de crecimiento (vitaminas).

Equipos y materiales

- Balanza analítica (5 dígitos)
- Sistema de filtración al vacío
- Refrigerador
- Agitador orbital
- Campana de extracción de gases
- Purificador de agua
- pH metro
- Autoclave
- Máscara de protección para gases
- Botellas de vidrio de 1 y 5 L
- Filtros de policarbonato de 0,22 y 0,47 μm
- Reactivos
- Espátula tipo cuchara

MICROALGAS MARINAS

Los medios de cultivo se preparan con agua de mar, almacenada en botellas de vidrio de 5 L, que haya estado sometida a oscuridad por un mes, aproximadamente (Fig. 4). Diluir el agua de mar hasta 30 ppm de salinidad (para evitar la cristalización al momento de la esterilización), pasar por filtros de policarbonato de 0,47 y 0,22 μm (Fig. 5), enriquecerla en función a los requerimientos de la especie de microalga a adaptar y cultivar.



Figura 5.- Equipo de filtración

Tabla 2.- Medio F/2 (ANDERSEN 2005)

	Nutrientes	Solución stock	Cantidad	Concentración medio final
Macronutrientes	NaNO ₃	75 g/L	1 mL	8,82*10 ⁻⁴ M
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5 g/L	1 mL	3,62*10 ⁻⁵ M
Micronutrientes	FeCl ₃ .6H ₂ O	3.1500		
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4.3600		
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1800		
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0220	1 mL	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0100		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0100		
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0060		
Vitaminas	Tiamina HCl (B ₁)	0,0020		2,96*10 ⁻⁷ M
	Biotina	0,1	1 mL	2,05*10 ⁻⁹ M
	Cyanocobalamina (B ₁₂)	0,001		3,69*10 ⁻¹⁰ M
Tris	Tris (Regular con HCL 37% a pH 7,2)	50 g/200 mL	2 mL	

Tabla 3.- Medio L1 (ANDERSEN 2005)

	Nutrientes	Solución stock	Cantidad	Concentración medio final
			1 mL	8,82*10 ⁻⁴ M 3,62*10 ⁻⁵ M
Macronutrientes	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,1500 g/L		
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4,3600 g/L		
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1781 g/L		
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0230 g/L		
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0119 g/L		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025 g/L	1 mL	
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,0199 g/L		
	H ₂ SeO ₃	0,00129 g/L		
	NiSO ₄ .6H ₂ O	0,00263 g/L		
	Na ₂ VO ₄	0,00184 g/L		
	K ₂ CrO ₄	0,00194 g/L		
Vitaminas	Tiamina HCl (B ₁)	0,0020 g/L		2,96*10 ⁻⁷ M
	Biotina	0,01 g/L	1 mL	2,05*10 ⁻⁹ M
	Cyanocobalamina (B ₁₂)	0,001 g/L		3,69*10 ⁻¹⁰ M
Tris	Tris (Regule con HCl 37% a pH 7,2)	50 g/200 mL	2 mL	

Tabla 4.- Medio de cultivo BG11 modificado (ANDERSEN 2005)

	Nutrientes	Solución stock	Cantidad	Concentración medio final
Solución de citrato férrico	Ácido Cítrico	6 g/L	1 mL	3,12 *10 ⁻⁵ M
	Citrato de fierro amoniacal	6 g/L		3,00 *10 ⁻⁵ M
Macronutrientes	NaNO ₃	1,5 g/L	1 mL	1,76 *10 ⁻² M
	K ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	40 g/L		1,75 *10 ⁻⁴ M
	MgSO ₄ .7H ₂ O	75 g/L		3,04 *10 ⁻⁴ M
	CaCl ₂ .2H ₂ O	36 g/L		2,45 *10 ⁻⁴ M
	Na ₂ CO ₃	20 g/L		1,89 *10 ⁻⁴ M
	MgNa ₂ EDTA.H ₂ O	1,0 g/L		2,79 *10 ⁻⁶ M
Solución de metales traza	H ₃ BO ₃	2,860 g/L	1 mL	4,63 *10 ⁻⁵ M
	MnCl ₂ 4H ₂ O	1,810 g/L		9,15 *10 ⁻⁶ M
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,220 g/L		7,65 *10 ⁻⁷ M
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,079 g/L		3,16 *10 ⁻⁷ M
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,391 g/L		1,61 *10 ⁻⁶ M
	Co (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0494 g/L		1,70 *10 ⁻⁷ M

Tabla 5.- Medio *Spirulina* modificado (ANDERSEN 2005)

Nutrientes		Solución Stock	Cantidad	Concentración medio final
Solución de citrato férrico	Ácido Cítrico	6 g/L	1mL	3,12 *10 ⁻⁵ M
	Citrato de fierro amoniacal	6 g/L		3,00 *10 ⁻⁵ M
Macronutrientes	NaNO ₃	1,5 g/L	1 mL	1,76 *10 ⁻² M
	K ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	40 g/L		1,75 *10 ⁻⁴ M
	MgSO ₄ .7H ₂ O	75 g/L		3,04 *10 ⁻⁴ M
	CaCl ₂ .2H ₂ O	36 g/L		2,45 *10 ⁻⁴ M
	Na ₂ CO ₃	20 g/L		1,89 *10 ⁻⁴ M
	MgNa ₂ EDTA.H ₂ O	1,0 g/L		2,79 *10 ⁻⁶ M
Solución de metales traza	H ₃ BO ₃	2,860 g/L	1 mL	4,63 *10 ⁻⁵ M
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,810 g/L		9,15 *10 ⁻⁶ M
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,220 g/L		7,65 *10 ⁻⁷ M
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,079 g/L		3,16 *10 ⁻⁷ M
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,391 g/L		1,61 *10 ⁻⁶ M
	Co (NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,0494 g/L		1,70 *10 ⁻⁷ M

Tabla 6.- Medio Chu

Nutrientes		Solución stock	Cantidad	Concentración medio final
Solución de citrato férrico	Ácido Cítrico	6 g/L	1 mL	3,12 *10 ⁻⁵ M
	Citrato de fierro amoniacal	6 g/L		3,00 *10 ⁻⁵ M
Macronutrientes	NaNO ₃	1,5 g/L	1 mL	1,76 *10 ⁻² M
	K ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	40 g/L		1,75 *10 ⁻⁴ M
	MgSO ₄ .7H ₂ O	75 g/L		3,04 *10 ⁻⁴ M
	CaCl ₂ .2H ₂ O	36 g/L		2,45 *10 ⁻⁴ M
	Na ₂ CO ₃	20 g/L		1,89 *10 ⁻⁴ M
	MgNa ₂ EDTA.H ₂ O	1,0 g/L		2,79 *10 ⁻⁶ M
Solución de metales traza	H ₃ BO ₃	2,860 g/L	1mL	4,63 *10 ⁻⁵ M
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,810 g/L		9,15 *10 ⁻⁶ M
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,220 g/L		7,65 *10 ⁻⁷ M
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,079 g/L		3,16 *10 ⁻⁷ M
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,391 g/L		1,61 *10 ⁻⁶ M
	Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,0494 g/L		1,70 *10 ⁻⁷ M

MICROALGAS DE AGUAS CONTINENTALES (CLORÓFITAS, CIANOFITAS, DIATOMEAS)

Los medios de cultivo se preparan con agua destilada y serán enriquecidos según los requerimientos de crecimiento de la microalga a adaptar y cultivar.

- **Medio F/2** (ANDERSEN 2005) (Tabla 2). Medio de cultivo empleado para microalgas marinas (dinoflagelados, diatomeas, clorófitas). En un litro de agua de mar filtrada a 0,47 y 0,22 µm, agregar 1 mL de la solución stock de macronutrientes, 1 mL de micronutrientes, 1 mL de silicato (solo para diatomeas) y 2 mL de Tris, esterilizar a 121 °C por 20 minutos.

Enfriar el medio de cultivo y enriquecer con 1 mL de la solución de vitaminas con un filtro de jeringa de 0,22 µm.

- **Medio L1** (ANDERSEN 2005) (Tabla 3). Medio de cultivo para microalgas marinas (dinoflagelados). Preparar en un litro de agua destilada la solución de macronutrientes y soluciones stock. En un litro de agua de mar filtrada a 0,47 y 0,22 µm, agregar 1 mL de cada macronutriente, 1 mL de cada micronutriente y 2 mL de Tris, esterilizar a 121 °C por 20 minutos, una vez frío el medio de cultivo se enriquecerá con 1 mL de la solución de vitaminas con un filtro de jeringa de 0,22 µm.

- **Medio de cultivo BG11 modificado** (ANDERSEN 2005) (Tabla 4). Medio de cultivo empleado para cianofitas. Preparar soluciones stock de macronutrientes, solución de citrato férrico, metales trazas y vitaminas en agua destilada. Agregar 1 mL de cada stock a la solución final del medio de cultivo, esterilizar a 121 °C por 20 minutos.
- **Medio *Spirulina* modificado** (ANDERSEN 2005) (Tabla 5). Medio de cultivo empleado para cianofitas (*Arthrospira platensis*). Preparar la solución de stock 1 en 500 mL y solución stock 2 en 500 mL de agua destilada. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos, una vez frío mezclar y a la solución final agregar 1 mL de cada solución stock de cianocobalamina con un filtro de jeringa de 0,22 µm.
- **Medio Chu** (Tabla 6). Medio de cultivo empleado para microalgas de agua dulce (dinoflagelados, diatomeas, clorófitas). En un litro de agua destilada, se agrega 1 mL de solución de citrato férrico, 1 mL de la solución de macronutrientes, 1 mL de micronutrientes, y esterilizar a 121 °C por 20 minutos.

TOMA DE MUESTRAS PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS

Lagos, lagunas, océanos

Equipos y materiales (Fig. 6)

- GPS
- Multiparámetros
- Refractómetro
- Frascos de muestreo con tapa
- Red de fitoplancton cónica de 20 µm
- Caja de frío
- Libreta de notas
- Marcadores
- Solución fijadora (formol 4%)

Procedimiento: utilizar una red de fitoplancton de 20 µm de abertura de malla con vaso colector de 10 µm, realizar tres lances verticales desde 10 m de profundidad hasta la superficie (Fig. 7).

Colocar la muestra de agua, proveniente del vaso recolector, en un frasco de 0,1 L (Fig. 8), previamente rotulado con datos del lugar (coordenadas) y fecha, tomar dos muestras por punto, la primera será fijada en formol



Figura 6.- Materiales para recolección



Figura 7.- Lance vertical de la red de fitoplancton

(4%) para realizar el análisis taxonómico y la segunda muestra se colocará en una caja de frío hasta ser llevadas al laboratorio para la obtención de cepas en un plazo no mayor a las 24 horas.

Observaciones: para el muestreo de dinoflagelados no concentrar demasiado la muestra y tomar otra muestra directamente con una botella para evitar maltratarlos con la red.



Figura 8.- Malla con botella recolectora



Figura 9.- Toma de muestra directa con un frasco



Figura 10.- Medición de parámetros físico químicos del medio

Cuerpos de agua pequeños de baja profundidad (charcos, riachuelos)

- GPS
- Multipárametros
- Frascos de muestreo
- Red de fitoplancton cónica de 20 μm
- Caja de frío
- Cámara fotográfica
- Libreta de notas
- Marcadores

Procedimiento: Para cuerpos de agua de poca profundidad recolectar las muestras de agua directamente con un frasco de muestreo (Fig. 9) y registrar los parámetros físicoquímicos del lugar en una libreta de notas (Fig. 10), realizar la captura fotográfica del lugar donde se tomó la muestra para el registro de origen, datos que serán considerados al momento de realizar la adaptación a cultivo de la microalga y el llenado de la ficha de origen de la cepa.

OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE MICROALGAS

Para la obtención de las microalgas, se tomará en consideración los datos de campo como salinidad, temperatura, pH, amonio, fosfatos, nitritos, entre otros, los que servirán para determinar el medio de cultivo y condiciones para su adaptación.

Existen distintos métodos para el aislamiento de células de microalgas, por ejemplo: enriquecimiento de medios de cultivo, aislamiento de una célula con micropipetas, aislamiento en agar, diluciones sucesivas, aislamiento por gravedad (centrifugación y sedimentación), aislamiento por fototaxis (ANDERSEN 2005).

En el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos - IMARPE la técnica empleada es la del aislamiento celular con micropipeta el cual se describirá a continuación.

Aislamiento de una célula con micropipetas

- Microscopio invertido
- Cámara de flujo laminar con mechero
- Cámaras de cultivo
- Micropipetas
- Medios de cultivo estériles
- Porta objetos estériles
- Tubos de cultivo y matraces de 50 mL
- Porta tubos

Procedimiento: limpiar el área de trabajo con alcohol al 70%, preparar el material de trabajo, iniciar la observación de las muestras recolectadas de fitoplancton vivo usando un microscopio compuesto, separar un poco de la muestra en un beaker estéril (Fig. 11).

Una vez seleccionada la especie se procede a su separación mediante la técnica de pipeteo y lavados sucesivos (ANDERSON 2005). Esta técnica consiste en usar unas pipetas Pasteur preparadas a manera de una micropipeta con diámetro de entrada ligeramente superior a una célula de 20 μm .

Preparar un portaobjeto estéril con una gota de la muestra proveniente de la recolección (Figs. 12 - 14).

En el microscopio compuesto (invertido) capturar con la micropipeta una célula, colonia o cadena de la especie de microalga, trasladarla a otro porta objeto con gotas de medio de cultivo estéril, realizar el lavado celular, y así sucesivamente hasta lograr aislar una célula, colonia o cadena en una gota de medio de cultivo estéril.

Las células aisladas se colocan en tubos de ensayos y/o matraces de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo (el medio seleccionado estará en función a la microalga), incubar en una cámara bioclimática a 15 °C, con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y una irradiancia de 60 a 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Cuando estas células logran aclimatarse a las condiciones de laboratorio, en el matraz o tubo de ensayo después de 7 o 15 días se pueden observar pequeños filamentos o células de la microalga. Revisar al microscopio el cultivo y verificar si se trata de un cultivo unialgal, en caso de no ser así, repetir el proceso de aislamiento.

Mantenimiento de cepas de medio líquido

- Microscopio compuesto
- Cámara de flujo laminar con mechero
- Cámaras de cultivo
- Micro pipetas Pasteur estériles
- Medios de cultivo estériles
- Porta objetos estériles
- Tubos de cultivo y/o matraces de 50 y 125 mL
- Gradilla para tubos



Figura 11.- Muestra madre

Procedimiento: las cepas mantenidas en matraces o tubos de ensayo serán recambiadas cada 14 o 21 días dependiendo de la especie de microalga.

Preparar la cámara de flujo laminar, limpiar el interior con alcohol al 70%, colocar el material de trabajo y encender la luz ultravioleta de la cámara, para lograr un área estéril. Rotular 4 tubos o matraces nuevos por cepa con el código y fecha (Fig. 15) para luego dispensar el medio de cultivo estéril (Fig. 16).

Revisar las microalgas que servirán de inóculo, observar al microscopio la viabilidad y estado quístico, entre otras características. Una vez seleccionada la cepa, extraer una alícuota con una pipeta Pasteur estéril (Fig. 17) y trasvasar en un tubo o matraz con medio de cultivo estéril (Fig. 18). Terminado el recambio trasladar los nuevos tubos y/o matraces con inóculo a la cámara de cultivo a condiciones de temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica y humedad determinadas (Fig. 19).

Conservación de las cepas de microalgas en agar enriquecido

- Microscopio óptico
- Cámara de flujo laminar con mechero
- Cámaras de cultivo
- Micro pipetas Pasteur estériles
- Agar enriquecido con medio de cultivo
- Asa de Koll
- Porta objetos estériles
- Tubos de cultivo y/o matraces de 50, 125 mL
- Porta tubos

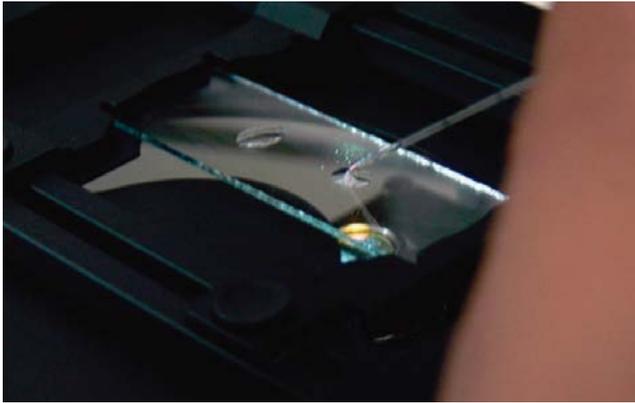


Figura 12.- Muestra madre en portaobjeto

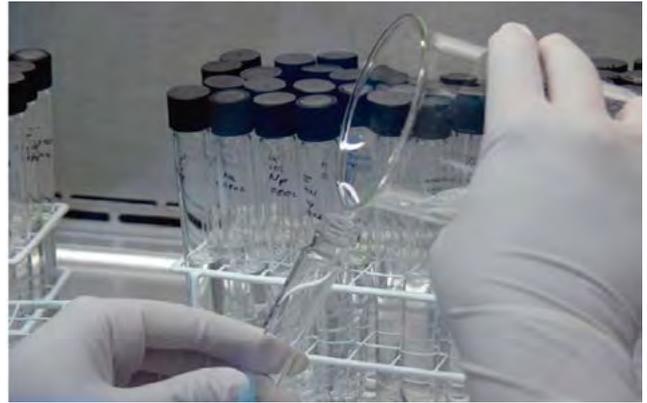


Figura 16.- Tubos de cultivo con medio estéril



Figura 13.- Captura de células con micropipeta



Figura 17.- Toma de inóculo de cepa de microalga



Figura 14.- Lavado celular con medio estéril



Figura 18.- Transferencia del inóculo



Figura 15.- Rotular los tubos con el código de la cepa y la fecha



Figura 19.- Tubos en la cámara climática a 17 °C

Procedimiento: Las cepas en agar se recambian cada 6 meses. Los inóculos se seleccionan a partir de medio líquido o placas de cepas anteriormente preparadas y se realiza bajo microscopio invertido y estereoscopio para observar presencia de hongos y bacterias.

- a Pesar 14 g de agar y colocar en un matraz de 1 L con medio de cultivo específico, dependiendo de la microalga. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 10 minutos el medio de cultivo enriquecido con agar, dejar enfriar aproximadamente a 50 °C y cargar las placas Petri estériles (Fig. 20) dentro de la cámara de flujo laminar.
- b Dejar enfriar hasta la solidificación con la luz UV encendida por aproximadamente 15 minutos (Fig. 21), cerrar las placas e invertirlas para evitar la formación de vapor en su interior, rotular cada placa con código de la cepa y fecha (Fig. 22).
- c Inóculo proveniente de medio líquido: con ayuda de una micropipeta estéril se tomará un poco de inóculo de la cepa en tubo seleccionado y se colocará una gota sobre el agar y con ayuda del asa de siembra previamente esterilizada (flameada en el mechero) se realizará el rayado en agar, sellar con papel Parafilm M® y almacenar en cámara climática a 14 °C.
- d Inóculo proveniente de medio sólido: tomar con ayuda del asa de siembra esterilizada una colonia de la placa seleccionada como inóculo, colocar la colonia de microalga sobre el agar en la placa rotulada, sembrar con la técnica del rayado por estrías (Fig. 23).
- e Terminado el proceso de siembra de inóculo en las placas con agar enriquecido colocarlas en la cámara climática para su crecimiento (Fig. 24).



Figura 20.- Cargar el agar en placa Petri



Figura 22.- Rotular placas: código de cepa, fecha

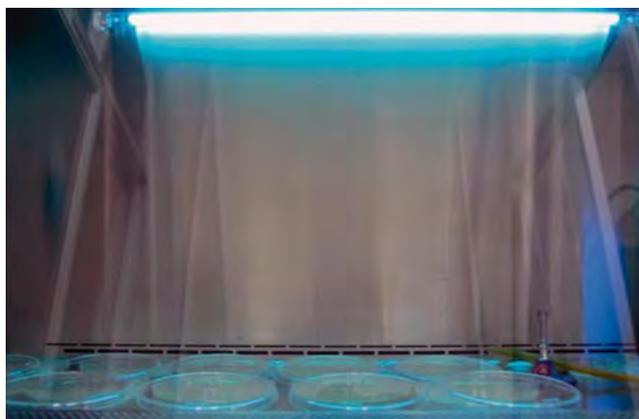


Figura 21.- Placas en cámara de flujo laminar con luz ultravioleta



Figura 23.- Colonia sembrada por estrías en placa de agar de microalgas libres de bacterias



Figura 24.- Placas de agar en cámara climática a 14 °C

MÉTODO PARA ANÁLISIS EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El estudio taxonómico a nivel morfológico debe realizarse de la muestra original y en las etapas sucesivas del cultivo unialgal (GONZÁLEZ *et al.* 1995).

Para la correcta clasificación taxonómica de las microalgas es necesario emplear la técnica de microscopía electrónica de barrido, debido a que proporciona imágenes tridimensionales de ultraestructuras importantes para identificación.

En el caso de microalgas marinas, primero se procede a la desalinización de la muestra para evitar la formación de cristales de sal, emplear concentraciones diluidas de agua de mar filtrada a 0,22 μm de concentraciones del 100, 75, 50 y 25% y agua destilada para no provocar choque osmótico en las células que produzca rotura y deformación celular, cada cambio de salinidad se realizará con espacio de 10 minutos.

Después de haber eliminado la sal de la muestra se procederá a la deshidratación de las células con concentraciones crecientes de alcohol de 10, 30, 60 y 80% y etanol absoluto, cada 10 minutos

entre cada concentración, una vez terminado el proceso de filtración se toma el filtro con una pinza y se procede al montaje para la observación en el microscopio electrónico de barrido.

En el caso del análisis taxonómico de diatomeas, las muestras provenientes de los cultivos deben ser tratadas previamente con el propósito de eliminar la materia orgánica utilizando diferentes métodos: solución de ácido sulfúrico, Método de Hasle y Fryxell 1970, Método de Simonsen 1974, Método de Balech y Ferrando 1964.

Posteriormente se lavará la muestra previamente tratada para eliminar solventes por filtración con agua destilada (ALVEAL *et al.* 1995), utilizando filtros de membrana Isopore™ (RTPP) 1,2 μm , para posteriormente unirlos a un portaobjeto de plata coloidal.

El producto obtenido es sometido a evaporación por punto crítico y pulverización catódica con recubrimiento de paladio y oro. Finalmente, las muestras se analizan y son microfotografiadas usando un microscopio electrónico de barrido para observar estructuras de carácter taxonómico y clasificar las especies. Se filtra al vacío con filtros de policarbonato de 0,22 μm .

REFERENCIAS

- ABALDE J, CID A, FIDALGO J P, TORRES E, HERRERO C. 1995. Microalgas Cultivo y Aplicaciones. Servicio de publicaciones, Universidad de la Coruña. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias. La Coruña España. 210 pp.
- ALVEAL K, FERRARIO M E, OLIVEIRA E C, SAR E A (Editores). 1995. Manual de métodos ficológicos. Concepción, Chile: Universidad de Concepción. 863 p.
- ANDERSEN R A. 2005. Algae Culturing Techniques. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, London, England. 84 – 98 pp.
- Autoridad Nacional del Agua (ANA) 2011. Diagnóstico y Plan de gestión de los Recursos Hídricos en la cuenca de Madre de Dios - Fase I. 247 pp.
- BERGES J A, FRANKLIN D J, HARRISON P J. 2001. Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *J Phycol.* 37: 1138 - 45.
- BOROWITZKA M, BOROWITZKA L. 1988. *Dunaliella*: in microalgal biotechnology. Cambridge University Press. UK. 27 pp.
- CAÑIZARES V R O, CASAS C, DOMINGUEZ B, VOLTOLINA D. 1994. Las microalgas en la acuicultura. Cuadernos sobre Biotecnología. CINESTAC-IPN.

- Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México. 44 pp.
- COLL J. 1991. Acuicultura marina animal, 3a edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 671 p.
- CONTRERAS-FLORES C, PEÑA-CASTRO J M, FLORES-COTERA L B. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobioreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 8: 450-456.
- CRESWELL LR. 2010. Phytoplankton culture for aquaculture feed. SRAC. Publication N° 5004, 1-17.
- DEL CAMPO J A, RODRIGUEZ H, MORENO J, VARGAS M A, GUERRERO R. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 848-854.
- DEL RÍO E, ACIEN G, GARCIA-MALEA G, RIVAS J, MOLINA-GRIMA E, GUERRERO M G. 2007. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluviialis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 74: 397-402.
- FOGG G E, THAKE B. 1987. Algae Cultures and Phytoplankton Ecology. The University of Wisconsin Press Third Edition EU A. 126 pp.
- GLADUE R. 1991. Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds. In: Rotifer and microalgae culture systems, Proceedings of a US-Asia Workshop, Honolulu, Hawaii. January 28-31, 1991. Fulks, W and K.L. Main (eds). The Oceanic Institute, Hawaii, USA. 276-286 pp.
- GONZÁLEZ M, PARRA O, CIFUENTES A. 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En K Alveal, ME Ferrario, EC. Oliveira y E Sar (eds.) Manual de Métodos Ficológicos, Universidad de Concepción, Chile. 219-250.
- GUILLARD R R L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: WL Smith MH Chanley (Eds.). Culture of marine invertebrates animals. Plenum Publishing Corp. New York. 29-60 pp.
- GUILLARD R R L, MORTON S L. 2003. Culture Methods. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (Ed). Manual on harmful marine microalgae. UNESCO, Saint-Berthevin. 77-81.
- HOFF F, SNELL T. 2001. Plankton culture manual. Florida Aqua Farm Inc. E U A. 162 pp.
- JAWORSKI GHM, Wiseman SW, Reynolds CS. 1988. Variability in sinking rate of the freshwater diatom *Asterionella formosa*: the influence of colony morphology. *Br. Phycology*. F. 23: 167-76.
- KAPLAN D A E, RICHMOND D, ARONSON S. 1986. Algal nutrition. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press. Inc. E.U.A. 147- 198 pp.
- KOMMAREDDY A R, ANDERSON G A. 2003. Study of light as a parameter in the growth of algae in a photobio reactor (PBR). ASAE, St. Joseph, Michigan. Paper No. 034057.
- LAVENS P, SORGELOOS P. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. Rome, FAO Fisheries Technical Paper. No. 361: 295 pp.
- MARTIN F P H. 2010. Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore.
- PRATT R. 1944. Studies on *Chlorella vulgaris*. IX. Influence on the growth of *Chlorella* of continuous removal of chlorellin from the solution. *Amer. Jour. Bot.* 31: 418- 421.
- RICHMOND A. 1986. Cell response to environmental factor. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press. Inc. U. S. A. 69-99.
- RIVKIN RB. 1989. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. *Marine Ecology, Progress Series* PP. 55: 291-304.
- SANCHEZ-SAAVEDRA M, VOLTOLINA D. 2002. Efecto de las tasas de lujo de fotones de luz blanca y azul-verde en la eficiencia del crecimiento y contenido de pigmentos de tres especies de diatomeas en cultivos terminales. *Ciencias Marinas*. 28 (3): 273-279.
- SCOTT S A, DAVEY M P, DENNIS J S, HORST I, HOWE C J, LEA- SMITH D J, SMITH A G. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 277-286.
- SPOTTE S H. 1979. Seawater aquariums: the captive environment. Wiley – Interscience. U.S.A. pp 413.
- VARELA R. 1988. Cultivo de microalgas, historia y aplicaciones. *Natura*. 83: 8-10.
- VOSKRENSKAYA N. 1972. Blue light and carbon metabolism. *Anual Rev Plant Physiol*. 23: 219-234.
- WARREN A, DAY J G, BROWN S. 2002. Cultivation of protozoa and algae. In Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. and Stezenbach, L. D., Eds, Manual of Environmental Microbiology, ed. 2. ASM Press, Washington D. C. 7-83 pp.