

# MANUAL DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL DE LABORATORIO DE ALIMENTO VIVO: MICROALGAS

## MANUAL ON DISINFECTION AND STERILIZATION OF LIVE FOOD LABORATORY MATERIAL: MICROALGAE

Ruth Alejos Cabrera  
Wilmer Gaspar Reyes

Gheraldine Ynga Huamán  
Alexander Niño Velásquez

### RESUMEN

ALEJOS R, YNGA G, GASPAR W, NIÑO A. 2021. *Manual de desinfección y esterilización del material de laboratorio de alimento vivo: microalgas*. Inf Inst Mar Perú. 48(1): 50-66.- A través del manual se brinda información detallada sobre aspectos de limpieza, desinfección y esterilización de diversos materiales, que son empleados en un laboratorio de cultivo de microalgas. Por ello, en este documento se describen los procedimientos que se aplican en el Laboratorio de Alimento Vivo del Instituto del Mar del Perú (IMARPE).

PALABRAS CLAVE: Alimento vivo, desinfección, esterilizado, laboratorio, microalgas

### ABSTRACT

ALEJOS R, YNGA G, GASPAR W, NIÑO A. 2021. *Manual on disinfection and sterilization of live food laboratory material: microalgae*. Inf Inst Mar Peru. 48(1): 50-66.- This manual provides detailed information on cleaning, disinfection, and sterilization of various materials used in a microalgae culture laboratory. Therefore, this document describes the procedures applied in the Live Food Laboratory of the Instituto del Mar del Peru (IMARPE).

KEYWORDS: live food, disinfection, sterilization, laboratory, microalgae

## 1. INTRODUCCIÓN

En la acuicultura es esencial la calidad del alimento vivo brindado a los organismos. Por ello, muchos "hatcheries" tanto de peces, como de moluscos prefieren contar con un laboratorio propio de microalgas. Esto para autoabastecerse y asegurar la calidad e inocuidad del alimento.

Ante ello, es necesario tener claros los principios básicos de: limpieza, desinfección y esterilizado. Del mismo modo, conocer los diferentes métodos que se pueden emplear antes, durante y después de los procesos de producción del alimento vivo. Estas actividades son clave para reducir o minimizar el riesgo de contaminación en cada etapa de los cultivos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define la esterilización como la técnica de saneamiento cuyo fin es la destrucción de toda forma de vida. Eliminando todo microorganismo, tanto patógeno como no patógeno, incluidas las formas esporuladas, altamente resistentes.

Un objeto esterilizado está libre de microorganismos. No se debe confundir con la desinfección, pues no los elimina todos, solo aquellos que pueden causar enfermedad o

efectos deletéreos sobre los productos en que se encuentran (alimentos, cosméticos, etc.).

Por ello, un objeto desinfectado no está estéril (PÉREZ *et al.*, 2010). La minuciosidad de la limpieza que antecede a la esterilización, es el factor central en la eficacia de estas operaciones (KAHRS, 1995).

El objetivo del manual, es difundir las diferentes técnicas de desinfección y esterilizado de materiales que se utilizan en el cultivo de microalgas. Enmarcado en las actividades del PpR del Proyecto: Estudio de la Calidad del Alimento Vivo del Instituto del Mar del Perú.

### MARCO TEÓRICO

La desinfección del agua se ha practicado por milenios, aunque con poca o ninguna conciencia de los principios involucrados. Registros históricos indican que la ebullición del agua se habría recomendado al menos hace 500 años a.C. En 1986, se registró el primer uso de cloro para la desinfección del agua en un experimento vinculado a los estudios de filtración en Louisville - Kentucky, USA. Al año siguiente, Inglaterra empleó el cloro de forma experimental, para desinfectar la red de distribución del agua después de una epidemia de tifoidea (AWWA, 2006).

Hace unos 150 años se comenzó a usar técnicas para controlar el crecimiento microbiano: desde los primeros estudios de Pasteur hasta Chamberlain, quien en 1884 inventó la autoclave basada en el uso de calor húmedo a presión para eliminar microorganismos. Hoy en día los laboratorios usan de manera rutinaria diversos procesos físicos, químicos y mecánicos para controlar su crecimiento.

Solo conllevan a eliminar parcialmente los microorganismos existentes, métodos como: desinfección, pasteurización, etc. En el sector salud, es importante destruir a los patógenos para evitar su transmisión. Mientras que, en diversas industrias, incluyendo la alimentaria, es importante eliminar microorganismos para conservar su calidad (BONILLA *et al.*, 2016).

La esterilización se consigue generalmente por métodos físicos y excepcionalmente por la aplicación de compuestos químicos.

Entre los métodos físicos más comunes está la aplicación de calor (por vía húmeda o seca), la filtración o la radiación.

La esterilización se logra con productos químicos: óxido de etileno, formaldehído o glutaraldehído. La desinfección, mediante agentes desinfectantes o antisépticos dependiendo de su uso (PÉREZ *et al.*, 2010).

A continuación, los métodos de desinfección y esterilización más empleados en laboratorios de índole microbiológico. Se aplican también, en diferentes procesos que intervienen en el cultivo microalgal.

En la figura 1 se observan los aspectos básicos para asegurar la calidad e inocuidad de los cultivos microalgales.

### LIMPIEZA

Remoción de materia extraña en el ambiente, superficies y objetos. Usando el lavado manual o mecánico (Fig. 2).

El propósito de la limpieza es disminuir la biocarga (número de microorganismos) a través del arrastre mecánico.

Se suele usar agua con detergente para este proceso. Sin embargo, es recomendable un

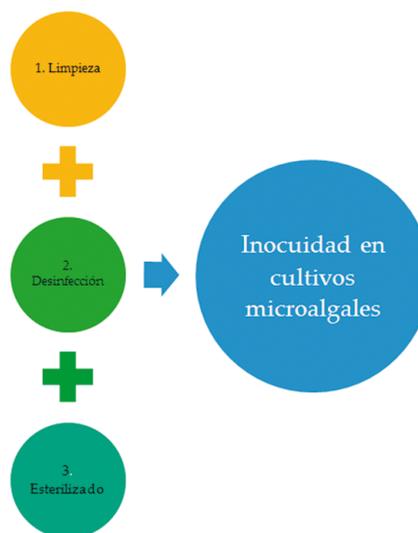


Figura 1.- Aspectos básicos para asegurar la calidad e inocuidad de los cultivos microalgales. Elaboración propia



Figura 2.- Limpieza de superficies. Proceso primordial para una correcta desinfección

detergente enzimático, de esa manera se garantiza la eficacia del proceso (MINISTERIO DE SALUD, 2002).

Es importante que el personal del laboratorio esté capacitado para manipular los agentes que intervienen en la limpieza y desinfección, tanto de superficies como materiales. La limpieza comprende 3 tipos de acción:

- Acción mecánica: frotar, cepillar o lavar con agua a presión.
- Acción química: uso de detergentes, detergentes enzimáticos y agua. Son necesarios para inhibir y disminuir la biocarga y las partículas de polvo. Cabe resaltar que el agua tibia mejora la calidad de disolución del detergente, así como las enzimas.

Acción térmica: referida al uso del calor (agua caliente).

## DESINFECCIÓN

Es la destrucción de microorganismos presentes en la superficie de implementos, equipos y manipuladores, usando sustancias químicas llamadas desinfectantes o antisépticos (Fig. 3).

Los desinfectantes son sustancias químicas aplicadas sobre objetos y superficies; los antisépticos son sustancias químicas aplicadas sobre la piel y mucosas (ROJAS, 2011).

Para que la desinfección sea eficaz, se debe limpiar las superficies antes de aplicar los químicos. Este requisito podría denominarse como proceso de "limpieza-desinfección" (KAHRS, 1995).

Todo buen método de desinfección deberá cumplir las siguientes condiciones:

- Eliminar el mayor número de microorganismos (al menos todos los patógenos).
- Ser económico.
- No debe ser corrosivo, tóxico o irritante para los tejidos.
- Al menos ser soluble en agua.

En la Tabla 1 se presentan diversas sustancias que pueden ser utilizadas con fines de desinfección en laboratorios de microbiología

En el caso del Laboratorio de Alimento Vivo, se emplean soluciones de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones, dependiendo del material y/o superficie a desinfectar.

También se emplean soluciones a base de ácido muriático comercial y ácido ortofosfórico al 10%, este último se usa solo para los paliglobos. En la Tabla 4, se detalla la preparación de los desinfectantes.

A causa de las recurrentes enfermedades transmitidas por el agua, en USA durante el siglo XIX, tales como fiebre tifoidea, disentería y el cólera, es que se empezó a usar el cloro. Al inicio de 1900, la tasa de incidencia fue alta, con más de 25.000 muertes por tifoidea. Sin



Figura 3.- Uso de solución de hipoclorito de sodio para desinfección del agua de mar

embargo, se redujo por el uso de cloro, teniendo menos de 20 muertes en 1960 (LAUBUSCH, 1964).

Con una caída drástica en enfermedades y muertes, luego de aplicar el cloro, la necesidad de emplear productos químicos fue razonable. Así es como empieza a ser usado como desinfectante de elección, principalmente por: efectividad (RACE, 1918), eficiencia, economía de operación, conveniencia y persistencia de cloro residual.

Sus propiedades únicas hacen que su uso sea una forma de controlar: el sabor, olor, monitoreo de algas, limo, desinfección principal de agua y otros fines. Sin embargo, ha sido objeto de indagación pues algunos de los subproductos del proceso pueden ser cancerígenos. A pesar de esto, sigue siendo de amplio uso (AWWA, 2006).

### Factores que comprometen la eficacia de los desinfectantes

La limpieza previa a la aplicación del desinfectante, es esencial dentro del proceso. Su eficacia depende de los organismos a combatir, modo de multiplicación, resistencia al medio ambiente y a las sustancias químicas.

Tabla 1.- Agentes desinfectantes comúnmente utilizados en microbiología y su mecanismo de acción

Agente	Mecanismo de acción	Aplicaciones
Compuestos clorados: Hipoclorito de sodio (NaOCl)	- Efecto letal por la combinación rápida con proteínas. - Los clorados reaccionan con el agua para formar ácido hipocloroso que es bactericida. - Oxidante, corrosivo para metales, de degradación con el tiempo. Se recomienda almacenarlas en frascos herméticamente cerrados, protegidos de la luz, el calor y la humedad. Preparar la cantidad para uso.	- Purificación del agua. - Sanitización de utensilios. - Microbiocida. - En superficies se recomienda concentración del 1%, con variaciones entre 1-10 g/L.
Ácido inorgánico: Ácido clorhídrico (HCl), sulfúrico, nítrico, fosfórico, sulfámico.	- Produce un pH 2, 5 o inferior. - Elimina los precipitados inorgánicos de las superficies. - Irritante para la piel y las membranas mucosas.	- Solución al 0,5%. - Muy corrosivo para los metales, pero pueden inhibirse parcialmente con productos anticorrosivos.
Componentes fenólicos: Fenol	- Actúa rompiendo la pared de las células precipitando las proteínas celulares. - En bajas concentraciones inactiva las enzimas, interfiriendo con el metabolismo de la pared celular. - Surfactante. - Irritante y altamente tóxico.	- Solución de 5mg/L. - Presenta acción residual (que perdura por un periodo luego de su aplicación). - Efectivo contra bacterias, virus, hongos. No actúa sobre esporas.
Compuestos con base en Iodo: Tintura de Iodo, solución, Povidona-Iodo.	- No se tiene claro el mecanismo de acción, se presume que ocasiona la precipitación de las proteínas. - Agente activo de superficies.	- La tintura de Iodo es usada como antiséptico. - Efectivo contra esporas, hongos y virus.
Alcohol (Etílico, Isopropílico)	- Actúa por desnaturalización de la proteína de la pared celular. - Funciona inmediatamente y es de fácil aplicación. - Es inflamable, opaca el acrílico, reseca los plásticos y gomas. Reseca la piel.	- Concentración de uso: entre 60 y 90%. - Efectivo contra bacterias, virus, hongos. No actúa sobre esporas.
Compuestos de amonio cuaternario	- Inactivación de enzimas productoras de energía, desnaturalización de proteínas y ruptura de la membrana celular.	- Soluciones de 1 mg/L. - Se puede inactivar en presencia de materia orgánica.
Peróxido de hidrógeno y perácidos	- Son oxidantes energéticos y potentes germicidas de amplio espectro. - Inocuos para el hombre y el medio ambiente. - Es un desinfectante lento, por lo que se puede emplear para desinfectar superficies de trabajo de laboratorio.	- Soluciones preparadas entre 3 y 6%. - Debe protegerse de la luz y almacenarse en un lugar fresco, debido a que se descompone muy fácilmente.

Fuente: FAO, 1997; Rueda, Amigot, Ducha, 2003; OMS, 2008; Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2012, Rojas, 2011

También tienen importancia la concentración del desinfectante, tiempo de contacto con las superficies, temperatura ambiente, entre otros factores (KASTENHUBER, 1991).

La presencia o no de materia orgánica externa, es determinante para el éxito de la desinfección, pues esta diluye y neutraliza rápidamente las sustancias biocidas. Se debe cepillar, así como baldear con agua las superficies antes de aplicar los desinfectantes. Esta práctica no puede ser reemplazada empleando más desinfectante, ni por aspersion en alta presión (KAHRS, 1995).

ROJAS (2011) recomienda las siguientes pautas para un correcto proceso de desinfección:

- Prepare diariamente la solución desinfectante para su uso.

- No use recipientes metálicos.
- Mantenga el producto desinfectante en un lugar seco y protegido de la luz.
- Emplee la concentración recomendada por la casa comercial.
- No mezcle el desinfectante con otras sustancias.
- Utilice guantes para su empleo.

## ESTERILIZACIÓN

Está estimada con el nivel más alto de seguridad de eficacia biocida, por lo tanto, en la destrucción de microorganismos o sus formas de resistencia.

El esquema representa los distintos grados de este último, relacionados con la estructura de

los microorganismos, su capacidad de producir esporas, presencia de ciertos componentes en su pared celular (lípidos, proteínas) o de su grosor.

La esterilización puede ser física o química (Fig. 4).

El medio físico más usado es el calor húmedo o seco.

Aunque, si estos no aplican, por características del material o el medio, la filtración e incluso la radiación son los métodos a elegir (Tabla 2).

Excepcionalmente, en aplicaciones a material de uso sanitario, donde no se pueden emplear las metodologías señaladas, se usa algún tipo de esterilización fría.

Esta última, se lleva a cabo en dispositivos cerrados con un agente químico gaseoso como: óxido de etileno, formaldehído o glutaraldehído (PÉREZ *et al.*, 2010).

Otros factores influyentes en mayor o menor resistencia frente a la esterilización: la carga bacteriana total, pH, temperatura, presencia de materia orgánica y/o sales minerales.

**Calor seco**

Este provoca la desnaturalización de proteínas, lesiones por oxidación y efectos tóxicos por niveles elevados de electrolitos. Los microorganismos entran en contacto con el calor transmitido por el material, lo cual produce un efecto letal (VIGNOLI, 2002).

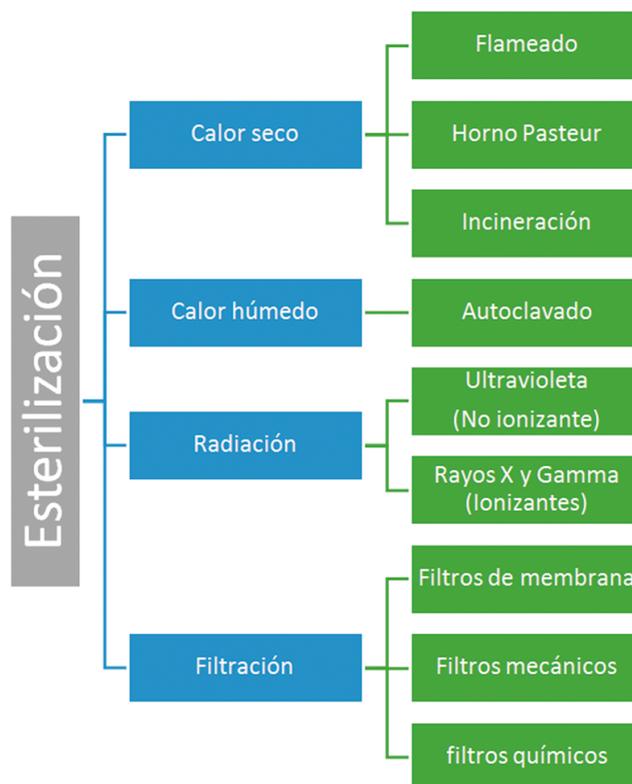


Figura 4.- Métodos de esterilización. Elaboración propia

El proceso requiere una temperatura más alta que el calor húmedo y mayor tiempo de exposición. Por ello, el método es conveniente para materiales secos que no pueden ser esterilizados por vapor debido a sus efectos nocivos o falta de penetración. Los materiales incluyen: cristalería, polvos, aceites, instrumentos metálicos o medios resistentes a elevadas temperaturas (PHARMACOPOEIA, 2019).

Tabla 2.- Métodos, fuentes y tipos de agentes esterilizantes- empleados en microbiología

Método	Fuente	Tipos
Calor seco	Acción directa de la llama.	Esterilización al rojo Flameado Incineración
	Acción directa por generador de calor.	Estufa de calor seco
Calor húmedo	Acción de agua caliente.	Baño maría hirviente Calentamiento repetido Ebullición directa
	Acción de vapor de agua.	Autoclavado
Radiación	Ionizantes	Rayos X y Gamma
	No Ionizantes (ultravioleta)	UV 260 nm (ADN/ARN) UV 280-230 nm (proteínas)
Filtración	Filtros	Filtros de diferente composición, tamaño de poro y estructura

Fuente: Rojas, 2011

Existen tres formas principales de esterilización por calor seco: flameado, incineración y mediante el uso del horno Pasteur.

#### a) Flameado

Esta técnica consiste en pasar el material por la llama en un mechero tipo Bunsen (Fig. 5), con el fin de esterilizar los tubos de vidrio, pipetas, matraces, entre otros. Se aplica durante el proceso de siembra de microalgas y preparación de medios de cultivo.

#### b) Horno Pasteur o Poupinell (calor seco)

En este caso se realiza en una estufa denominada horno Pasteur (Fig. 6). En su interior se disponen los materiales a esterilizar, protegidos con papel satinado o en contenedores especiales para evitar la contaminación ambiental, hasta su empleo.

La destrucción microbiana se produce por oxidación de los componentes celulares y desnaturalización de proteínas. Es menos eficaz por la ausencia de agua, por ello deben incrementarse tanto las temperaturas como los tiempos de exposición (PÉREZ *et al.*, 2010).

La temperatura varía entre 120 y 180 °C, requiriéndose distintos tiempos de exposición. A 140 °C se necesitan mínimo 5 horas, de 160 °C a 180 °C se requieren al menos 2 horas. Esta última, se usa para material de vidrio.

Se recomienda NO abrir la puerta del horno inmediatamente al finalizar la esterilización, ello puede ocasionar rotura del material.

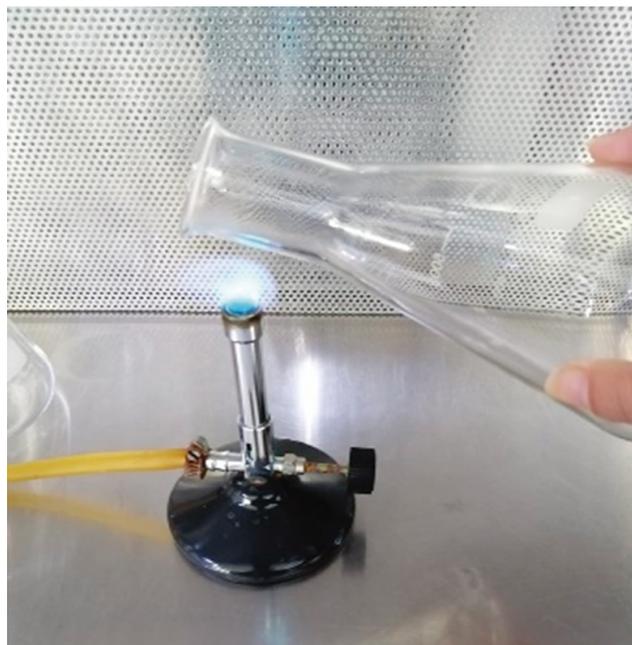


Figura 5.- Flameado de matraz Erlenmeyer antes del proceso de siembra

Tanto el papel, como el algodón no pueden ser esterilizados a más de 160 °C (ROJAS, 2011).

#### c) Incineración

Sirve para destruir el material descartable contaminado, también en caso de trabajar con microorganismos que pueden dañar la salud humana, animal o al medio ambiente, ej. horno de incineración a nivel hospitalario, muflas, etc.

#### Calor húmedo

El manejo de vapor de agua es el agente más frecuentemente utilizado.



Figura 6.- Estufa de 80 L para esterilizar materiales pequeños como pipetas Pasteur, viales y otros



Figura 7. Estufa vertical de 750 L de capacidad, para esterilización de probetas, matraces, beakers, tapones u otros materiales resistentes al calor



Figura 8.- Autoclave vertical, equipo empleado para la esterilización del medio de cultivo, del agua de mar y agua destilada

Este mecanismo destruye los microorganismos por desnaturalización de proteínas, enzimas y desestabilización de membranas (PÉREZ *et al.*, 2010). Estos efectos se deben a dos razones:

- a. El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas (ARN, ADN, proteínas, etc.) son producidas por la eliminación de agua. Reacciones inversas podrían dañar la célula por generación de productos tóxicos.

Las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas se estabilizan mediante puentes de hidrógeno intramoleculares, pudiendo ser

reemplazadas, como rotas por el agua a altas temperaturas.

- b. El vapor de agua posee un nivel de transferencia de calor más elevado que el aire. Se libera energía durante la condensación, haciendo que los materiales húmedos conduzcan el calor más rápido.

La esterilización con calor húmedo, se utiliza principalmente con la autoclave (Fig. 8).

Se debe usar la temperatura para controlar y monitorear el proceso; la presión se usa para que la temperatura sea óptima (PHARMACOPOEIA, 2019).

Las recomendaciones para el proceso de autoclavado son 15 minutos a 121-124 °C (200 kPa). En la Tabla 3 se muestran condiciones alternativas, con diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

Esta, durante el autoclavado de agua de mar es menor a 105 °C por 10 minutos a 132 kPa. Se debe a que temperaturas más altas ocasionan el precipitado de las sales del agua.

Se han realizado diversas pruebas, obteniendo resultados óptimos para el cultivo de microalgas, sin presentar problemas de contaminación.

### RADIACIÓN

El principal mecanismo del efecto de la luz UV, se basa en que los rayos penetran la membrana exterior de las bacterias, virus, hongos y algas, inhibiendo tanto la síntesis del ADN (VILLEGAS-FIGUEROA, 2007; LUCAS, 2003) como el crecimiento y la respiración (VIGNOLI, 2002).

Su acción depende de: tipo de radiación, tiempo de exposición, dosis de radiación, resistencia relativa de los microorganismos, transparencia del fluido y capacidad de absorción del fluido (VILLEGAS-FIGUEROA, 2007).

Existen dos tipos de radiaciones: a) Ionizantes: tiene fines médicos, b) No ionizantes la más usada en acuicultura, especialmente la luz UV.

#### a) Radiaciones ionizantes

Los rayos X igual que los rayos Gamma, producen iones además de radicales libres. Alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas, lipídicas y elementos esenciales para la viabilidad de los microorganismos.

Tienen gran penetrabilidad, esteriliza material médico termolábil o termosensible como: jeringas descartables, sondas, guantes de látex, suturas de nylon, agujas, bisturíes, catéteres, prótesis, etc.

Nose emplean para medios de cultivo o soluciones proteicas pues alteran los componentes.

Sobre los microorganismos, los efectos de las radiaciones ionizantes son letales, sean directos, indirectos y mutagénicos.

Tabla 3.- Tiempo de esterilizado según la temperatura (°C) y presión (kPa) empleado para el autoclavado de los materiales de laboratorio

Temperatura	Presión aproximada (kPa)	Tiempo mínimo de esterilización (min)
105°C	132 (~1.3 atm)	10*
126-129 °C	250 (~2.5 atm)	10
134-138 °C	300 (~3.0 atm)	5

Fuente: PHARMACOPOEIA (2019). 1 atm = 101.325 kPa

\* Condiciones de autoclavado aplicado en el Laboratorio de Alimento Vivo – IMARPE

Los efectos letales directos se logran a altas dosis de radiación, mientras que los indirectos y mutagénicos se consiguen a menores dosis.

Los efectos letales directos son daños ocasionados al ADN como: roturas en ambas cadenas y entrecruzamiento de las mismas. Los mutagénicos son menores ocasionados al ADN y los indirectos por producción de hidrógeno y de radicales hidroxilo (OH·) reaccionan fácilmente con macromoléculas como el ADN y provocan roturas en las cadenas.

#### b) Radiación ultravioleta (UV) (Fig. 9)

Este método inactiva a los microorganismos en los rangos 230-280 nm. Su acción se ejerce por la desnaturalización de ácidos nucleicos, su efectividad es influenciada por presencia de materia orgánica, longitud de la onda, temperatura, tipo de microorganismos y la intensidad de UV que se ve afectada tanto por distancia, como por suciedad de los tubos (VILLEGAS-FIGUEROA, 2007).



Figura 9.- Equipo UV, empleado en tratamiento del agua de mar

Funciona con bajos caudales y aguas claras, por ello debe instalarse luego de un filtro de al menos  $1\mu\text{m}$  (BARNABÉ, 1991).

Su efecto inhibitor se cumple cuando los rayos UV tienen contacto directo con los microorganismos.

### FILTRACIÓN

Consiste en pasar fluido, sea gas o líquido, por un filtro. La combinación de poros del filtro, la trama de éste y el químico del material del que está hecho, retiene los microorganismos, pero no el fluido.

La filtración es adecuada para bacterias y otros microorganismos de cierto tamaño, aplica a fluidos termolábiles o en la creación de ambientes protegidos (aire filtrado). Sin embargo, los virus no son retenidos por los filtros habituales.

La aplicación de este método es diversa en el campo de la microbiología, se puede usar para eliminar microorganismos de soluciones, fluidos, gases o para esterilizar el ambiente de trabajo. En cualquier caso, no son destruidos, sino que son retenidos físicamente o adsorbidos por los filtros con un tamaño de poro adecuado.

El tamaño de poro considerado esterilizante es el de  $0,22\mu\text{m}$ , aunque recientemente se tiende a la utilización de  $0,1\mu\text{m}$  (MELTZER & JORNITZ, 2006). El uso de filtros en acuicultura, tiene por objeto eliminar sustancias y organismos indeseables en el agua de cultivo.

Existe diversidad de filtros en el mercado mundial. La selección del tipo correcto para

un uso específico, requiere de conocimiento y principios básicos de operación.

Se describen los tipos de filtros más utilizados y sus aplicaciones más relevantes.

#### a) Filtros de membrana

Se usan para esterilizar soluciones termolábiles como: antibióticos, vitaminas, medios de cultivo líquidos que contienen azúcares a concentraciones elevadas que pueden caramelizar, proteínas que pueden desnaturalizarse por el calor, de esta forma los microorganismos quedan retenidos y el líquido filtrado se encuentra estéril.

Los filtros de  $0,45$  y  $0,22\mu\text{m}$ , retienen la mayoría de microorganismos, pero no virus ni bacterias pequeñas como microplasma. Por lo que se pueden filtrar hasta  $0,1\mu\text{m}$  para aumentar el espectro del primero (MELTZER & JORNITZ, 2006; GÓMEZ & MOLDENHAUER, 2009).

Los filtros son de variada composición dependiendo de su aplicación, normalmente son: ésteres de celulosa (acetato de celulosa, nitrato de celulosa), politetrafluoretileno (PTFE o teflón), fluoruro de polivinilo hidrofóbico (PVDF), etc.

Son de distintos tamaños (diámetro), dependiendo del volumen a esterilizar, se usan en diferentes mecanismos. Para volúmenes grandes, la solución pasa a través del filtro montado y conectado a una bomba de vacío que facilita la succión (Fig. 10).

Previo a la filtración, se esteriliza todo el equipo que estará en contacto con la solución: el soporte, embudo para filtros y el Kitasato. Este material

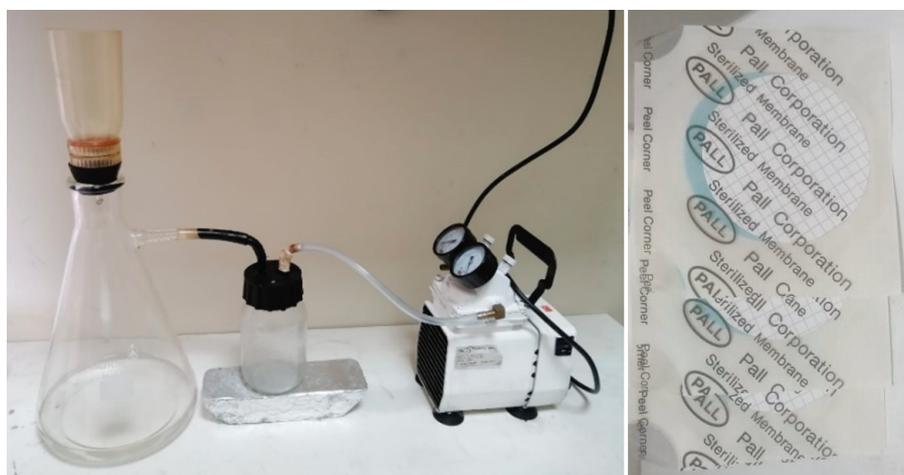


Figura 10.- Equipo de filtración (izq.) y filtros tipo membrana de  $0,45\mu\text{m}$  (der.)

puede ser de vidrio, policarbonato o polietileno esterilizables (PÉREZ *et al.*, 2010).

### b) Filtros mecánicos

Sirven para eliminar partículas en suspensión, emplean las diferencias en el tamaño de la partícula en solución.

En la figura 11, se muestran los filtros tipo bolsa/manga y bobinado (CUNO), ambos trabajan por el principio de micro filtración.

El líquido es purificado a través de poros permeables. Las bolsas pueden ser usadas para grandes cantidades de agua. Su alta capacidad es gracias a los tamaños de los poros que van entre 1-200  $\mu\text{m}$ .

Esta última depende de la superficie del área de las bolsas. Los sistemas más grandes pueden limpiar más de 500  $\text{m}^3/\text{h}$  (multi filtros de bolsa) (Fig. 12) (HUERTA, 2017).

### c) Filtros químicos

El sistema más conocido es el de carbón activado, su gran superficie y propiedad de absorción es capaz de eliminar diferentes compuestos orgánicos con gran eficiencia hasta llegar a la saturación de su superficie.

Se puede activar de nuevo, mediante lavados con disolventes orgánicos o por calentamiento (PRIETO, 2001). Los filtros de carbón activo se utilizan principalmente para eliminación de cloro y compuestos orgánicos en el agua.

### PROCEDIMIENTO APLICADO EN IMARPE: LABORATORIO DE ALIMENTO VIVO

En esta sección se describen los procedimientos para garantizar la inocuidad de los cultivos microalgales en IMARPE.



Figura 11.- Porta filtro (a), filtros tipo bobinado (b) y filtro tipo bolsa o manga (c), empleados en el tratamiento de la calidad del agua de mar



Figura 12.- Filtros mecánicos que retienen partículas más grandes, toma del agua de mar

En la Tabla 4, se muestran las concentraciones en diversos materiales y su respectiva de soluciones desinfectantes empleadas preparación.

Tabla 4.- Uso y preparación de soluciones desinfectantes en el Laboratorio de Alimento Vivo – IMARPE

Material	Insumo Químico	Concentración final	Alícuota	Enrase a:	Preparación	Frecuencia
<b>Para superficies</b>						
Estanterías y mesas de trabajo	Alcohol al 70%	-	-	-	Uso directo	Diariamente
Pisos	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	50 ppm	100 mL	10 L	Tomar 100 mL de lejía y llenar a 10 L	Diariamente
Pediluvios	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	83.3 ppm	50 mL	3 L	Tomar 50 mL de lejía y llenar a 3 L	Diariamente
<b>Para Material de vidrio</b>						
Matraces	Ácido muriático comercial	-	5 mL	500 mL	Tomar 5 mL y llenar a 500 mL. Dejar actuar por 3 min.	Para remover residuos de sarro (20 mL/matraz)
	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	83.3 ppm	5 mL	300 mL	Tomar 5 mL de lejía y llenar a 300 mL. Agregar 2,5 g de detergente	Para ser usado al momento
	Detergente	-	2.5 g (1 cdta.)	-		
Pipetas	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	555.5 ppm	100 mL	900 mL	Tomar 100 mL y enrasar a 900 mL. Dejar actuar hasta el día siguiente	Semanal
Probeta, beacker, vial, pipeta Pasteur, otros.	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	25 ppm	15 mL	3 L	Tomar 15 mL y llenar a 3 L. Dejar actuar hasta el día siguiente	Semanal
<b>Material de plástico</b>						
Paliglobos	Ácido ortofosfórico al 10%	-	3 mL	400 mL	Tomar 3 mL y llenar a 400 mL. Dejar actuar por 1 minuto	Semanal. Uso: solo para remover residuos de sarro
	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	187.5	300 mL	8 L	Tomar 300 mL y llenar a 8 L. Dejar actuar hasta el día siguiente	Semanal
Tapones de jebe	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	25 ppm	10 mL	2 L	Tomar 10 mL y llenar a 2 L	Para ser usado al momento
Botellas de plástico de 7 L	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	50 ppm	20 mL	2 L	Tomar 20 mL de lejía y llenar a 2 L. Agregar 10 g de detergente	Renovar la solución cada 10 botellas porque la solución pierde efectividad
	Detergente	-	10 g (2 cdas.)	-		
Botellas de plástico de 20 L	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	50 ppm	30 mL	3 L	Tomar 30 mL de lejía y llenar a 3 L. Agregar 10 g de detergente	
	Detergente	-	10 g (2 cdas.)	-		
<b>Otros materiales</b>						
Tanques de fibra de vidrio	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	-	-	-	Uso directo	Para ser usado al momento
	Ácido muriático comercial	-	-	-	Aplicación con mopa	Solo cuando el tanque se opaca
Filtros tipo bobinado	Hipoclorito de sodio al 5% (Lejía)	25 ppm	50 mL	10 L	Tomar 50 mL de lejía y llenar a 10 L. Dejar actuar por 16 h	Para ser usado al momento

Fuente: Elaboración propia

## PROCEDIMIENTO PARA LIMPIEZA DE LAS SALAS DE MICROALGAS

Como parte de las buenas prácticas de laboratorio, durante la producción se deben limpiar diariamente las siguientes superficies:

- Estanterías y mesas de trabajo: utilizar un paño húmedo para retirar las partículas de polvo, sales o materia orgánica. Luego desinfectar con alcohol y papel toalla.
- Pisos: limpiar las partículas de polvo o materia orgánica. Trapear con solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm.
- Pediluvios: preparar solución de hipoclorito de sodio a 83,3 ppm. Colocar al ingreso de cada sala antes de iniciar las actividades. Cambiar la solución diariamente.

## PROCEDIMIENTO PARA LAVADO Y ESTERILIZADO DE MATERIAL DE VIDRIO

### Matraces

1. Limpieza del material: lavar y enjuagar para retirar residuos de microalgas.
2. Preparar una solución con 5 mL de hipoclorito de sodio al 5% y enrasar a 300 mL con agua potable. Adicionar 2,5 g de detergente. Dejar actuar por 3 minutos. Usar la solución para la desinfección del material.
3. Enjuagar con abundante agua potable durante 3 minutos aproximadamente. Dejar escurrir.
4. Esterilizar los materiales vía calor seco, en la estufa de aire forzado a 120 °C por 2 horas (Anexo)

Nota: en caso de observar presencia de sarro, preparar una solución con 5 mL de ácido muriático comercial y enrasar a 500 mL con agua potable. Distribuir 20 mL en cada matraz. Dejar actuar por 3 minutos. Lavar y enjuagar con abundante agua potable. Este proceso se debe realizar después del paso 1.

### Pipetas

1. Limpieza del material: lavar y enjuagar para retirar residuos químicos.



Figura 13.- Pediluvio al ingreso de los ambientes

2. Preparar solución de hipoclorito de sodio a 555,5 ppm (ver Tabla 4). Dejar actuar hasta el día siguiente.
3. Enjuagar con abundante agua potable durante 3 minutos aproximadamente. Dejar escurrir.
4. Esterilizar los materiales vía calor seco, en la estufa de aire forzado a 120 °C por 2 horas.

### Otros materiales de vidrio (probeta, beacker, vial, pipetas Pasteur, etc.)

1. Limpieza del material: lavar y enjuagar para retirar residuos químicos o de microalgas.
2. Preparar solución de hipoclorito de sodio a 25 ppm (Tabla 4). Dejar actuar por 24 horas.
3. Enjuagar con abundante agua potable durante 3 minutos aproximadamente. Dejar escurrir.
4. Esterilizar los materiales vía calor seco, en la estufa de aire forzado. Para beacker y probetas a 120 °C por 2 horas. En el caso de pipetas Pasteur y viales, a 80 °C por 4 horas (Anexo).

## PROCEDIMIENTO PARA LAVADO Y ESTERILIZADO DE MATERIAL DE PLÁSTICO

### Paliglobos

1. Lavar y enjuagar para retirar residuos de microalgas.
2. Si persisten residuos de microalgas o de sales, preparar solución con 3 mL de ácido ortofosfórico al 10% y enrasar a 400 mL con agua destilada. Colocar las puntas de los paliglobos por un minuto. Enjuagar con abundante agua.

3. Sumergir los paliglobos en una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 187,5 ppm (Tabla 4). Dejar actuar por 24 horas.
4. Enjuagar con abundante agua por 3 minutos.
5. Para secar se somete a presión de aire. Almacenar una vez secos.

### Tapones de jebe

1. Limpieza del material: lavar y enjuagar para retirar residuos de microalgas y sales.
2. Sumergir los tapones en solución de hipoclorito de sodio a concentración de 25 ppm (Tabla 4). Dejar actuar por 5 minutos.
3. Enjuagar con abundante agua. Dejar escurrir.
4. Para secar se coloca en la estufa de aire forzado, cuando ésta se apaga y la temperatura desciende. Así se evita el deterioro de los tapones.

### Botellas de 7 L y 20 L

1. Limpieza del material: lavar y enjuagar para retirar residuos de microalgas y sales.
2. Preparar solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm (Tabla 4) y adicionar 10 g de detergente.
3. Usar esta solución en las botellas (trasvasar) y agitar firmemente tapando la boca de la botella con un tapón de jebe. Dejar actuar por 5 minutos.
4. Enjuagar con abundante agua potable hasta que no queden residuos de cloro.
5. Dejar escurrir. Almacenar una vez secos.

Nota: Considerar que cada 10 botellas, se debe renovar la solución desinfectante por pérdida de efectividad.

### PROCEDIMIENTO PARA DESINFECCIÓN DE TANQUES DE CULTIVO DE 250 L

1. Enjuagar los tanques de policarbonato con agua potable a presión, a fin de remover residuos de microalgas y sales adheridas a las paredes.
2. Adicionar hipoclorito de sodio al 5%, por las paredes del tanque.
3. Limpiar con la mopa y dejar actuar por 5 minutos.

4. Enjuagar con abundante agua potable, cuidando no salpicar a las paredes de la sala, ya que puede dañar los paneles de luces LED.

Nota: Cuando las paredes de los tanques se opacan, se puede lavar con ácido muriático comercial diluido (Tabla 4). Esta sustancia permite que el color de los tanques se aclare, lo cual es de suma importancia en el cultivo, al aprovechar mejor la iluminación, estos no se ven afectados en cuanto al crecimiento celular.

### PROCEDIMIENTO PARA DESINFECCIÓN DE LOS FILTROS

1. Al culminar las actividades, se deben retirar los filtros tipo bobinado y lavarlos a presión con agua potable para retirar los residuos que quedan retenidos en los hilos. Del mismo modo, se procede con el filtro tipo bolsa de 1  $\mu$ m.
2. Sumergirlos en una solución de hipoclorito de sodio a 25 ppm (Tabla 4) y dejarlos hasta el día siguiente.
3. Antes de su uso, enjuagar con agua potable a presión.

### PROCEDIMIENTO PARA TRATAMIENTO DEL AGUA DE MAR

Para los cultivos de microalgas, el agua de mar atraviesa por tratamientos tanto físicos como químicos, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación.

Teniendo en cuenta que el agua de mar contiene diversos organismos y compuestos que producen variación en su calidad y concentración de nutrientes, su uso directo para el cultivo no es recomendable.

Debido a esto, son necesarios tratamientos previos como filtración, esterilización y adición de nutrientes. A fin de mejorar y/o mantener los requerimientos mínimos para el desarrollo de los cultivos (YNGA y NIÑO, 2019).

Se describe el procedimiento a seguir:

1. Mediante bombeo, succionar agua de mar desde la zona costera y pasar por 4 filtros mecánicos de piedra grava: ¼", 3/8", ¾" y arena de mar.

- Almacenar en un depósito de 25 m<sup>3</sup> y pasar por rebose al segundo de 11 m<sup>3</sup>. Recircular el agua de mar durante 24 horas a través de un filtro mecánico de arena de cuarzo.
2. Para utilizar el agua del depósito, encender una electrobomba de ¾ HP y pasar por un equipo de luz UV para desinfectar el agua de mar.
  3. Filtrar por una batería de 3 filtros tipo bobinado de 10, 5 y 1 µm.
  4. Al ingresar a la sala de microalgas, irradiar por segunda vez con luz UV y pasar por doble filtrado: a) filtro tipo bobinado de 1 µm, b) filtro tipo bolsa de 1 µm.
  5. En este punto decidir el nivel de cultivo que se va a realizar:
    - a. Microalgas - Nivel inicial (500 mL y 1 L): Continuar con el proceso de filtrado a través de uno tipo membrana de 0,45 µm, usando equipo de filtración. Trasvasar a un frasco ámbar de 5 L y autoclavar a 105 °C x 10 minutos. Al culminar, retirarlo, dejar enfriar y mantenerlo cerrado hasta realizar la siembra. (Anexo).
    - b. Microalgas - Nivel intermedio y final (7, 20 y 250 L): Llenar las botellas de plástico y/o tanques con agua de mar filtrada a 1 µm. Adicionar una solución de cloro al 2,18% (dosis 1 mL/L de agua de mar), dejar actuar por 24 horas con aireación constante. Al día siguiente, neutralizar con Tiosulfato de sodio al 28,1% (dosis 0,5 mL/L de agua de mar), mezclar y, antes de sembrar comprobar la ausencia de cloro a través de un test.

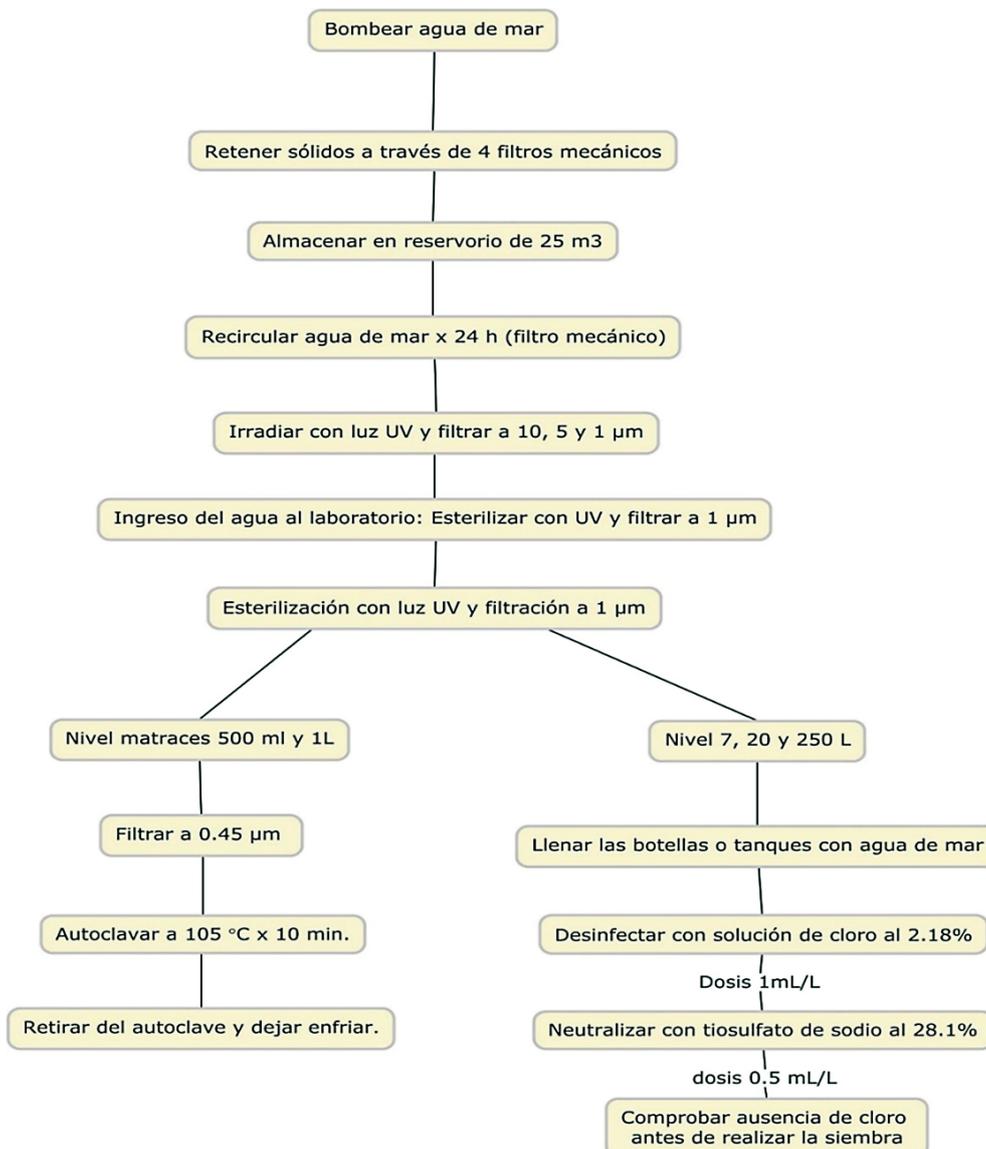


Diagrama de flujo del tratamiento del agua de mar. Elaboración propia

## PROCEDIMIENTO PARA ESTERILIZADO DE AGUA DE MAR Y MEDIOS DE CULTIVO

Este proceso es primordial para el inicio de la producción microalgal, por ello, se usa calor húmedo a través de una autoclave vertical. Esta permite esterilizar con mayor seguridad los medios de cultivo y el agua de mar que se emplea para la siembra de matraces a nivel de 0,5 y 1 L.

1. Filtrar agua de mar.
2. Trasvasar en envases de vidrio resistentes a altas temperaturas y presión. Se debe tener en cuenta de no sobrellenar los envases, para evitar posibles derrames.
3. Colocar al interior de la autoclave e iniciar el proceso. (Anexo).

## REFERENCIAS

- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. 2012. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies. Brasília. 48-53
- AWWA (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION). 2006. MANUAL M20: Water chlorination/chloramination: Practices and principles. American Water Works Association - AWWA. Second edition.
- BARNABÉ G. 1991. Acuicultura 1. Ediciones Omega, SA. Barcelona. pp. 153. En: Santos-Acevedo, M. 2014. Diseño y adecuación de un laboratorio para investigación en acuicultura y bioensayos de productos naturales marinos (tesis de maestría). FUNIBER. pp. 12.
- BONILLA M, PAJARES S, VIGUERAS J, SIGALA J, LE BORGNE S. 2016. Manual de Prácticas de Microbiología básica. Universidad Autónoma Metropolitana. 19 – 20.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1997. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. FAO Documento Técnico de Pesca N° 334, 174. Roma.
- GÓMEZ M, MOLDENHAUER J. 2009. Biological indicators for sterilization processes. PDA Books. Davis Healthcare International Publishing, LLC. Bethesda. In: Pérez-Uz, B., De Silóniz, M., Torralba, B., Vázquez, C. 2010. Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3(5): 1-14.
- HUERTA M. 2017. Selección y dimensionamiento de las unidades de tratamiento de agua para un sistema de recirculación en el liceo técnico profesional Dr. Rigoberto Iglesias Bastías de Lebu. Tesis. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Chile. P. 7.
- KAHRS R. 1995. Principios generales de la desinfección. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 14 (1): 143-163.
- KASTENHUBER H. 1991. Physical factors influencing the activity of antimicrobial agents. In Disinfection, sterilization and preservation. 4ta edition (S.S. Block, edit.). Lea & Febiger, Filadelfia & Londres. 59-72.
- LAUBUSCH E J. 1964. Chlorination and Other Disinfection Processes. Washington, D.C. The Chlorine Institute. In: AWWA (American Water Works Association). 2006. MANUAL M20: Water chlorination/chloramination: Practices and principles. American Water Works Association – AWWA (2nd Ed.) pp. 2.
- LUCAS, J. 2003. Introduction. 1-11. In: Lucas, S.J. y Southgate, P.C. (Eds). 2003. Aquaculture. Farming Aquatic Animals and Plants. Fishing News Books a Blackwell Publishing company. Australia. pp. 502.
- MELTZER T H, JORNITZ M W. 2006. Chapter 1: The sterilizing filter. In: Pharmaceutical Filtration: The Management of Organism Removal. PDA Books. pp. 4-18.
- MINISTERIO DE SALUD. 2002. Manual de desinfección y esterilización hospitalaria. Recuperado de <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1444.pdf>
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2008. Manual de bioseguridad en el laboratorio. (3era. ed). Ginebra. Suiza. 240-250.
- PHARMACOPOEIA. 2019 The International Pharmacopoeia: Methods of sterilization. Chapter 5.8. 9<sup>th</sup>. Edition.
- PÉREZ B, DE SILÓNIZ I, TORRALBA B, VÁZQUEZ C. 2010. Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3(5), 1-14. ISSN: 1989-3620.
- PRIETO. 2001. Uso de filtros biológicos en la larvicultura del camarón *Pennaeus vannamei* (tesis de grado). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. pp. 6-7.
- RACE J. 1918. Chlorination and Chloramines. Jour. AWWA, 3:63.
- ROJAS A. 2011. Manual de microbiología: conceptos y práctica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia. 14-20.
- RUEDA J, AMIGOT L, DUCHA J. 2003. Evaluación de desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas bacterianas de origen animal. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties. 22 (3): 1097-1104.
- VIGNOLI R. 2002. Esterilización y desinfección. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2027.pdf>
- VILLEGAS FIGUEROA P. 2007. Sistemas de recirculación de aguas y su rol en la acuicultura sustentable (tesis de maestría), Iquique, Chile. En: Santos-Acevedo, M. 2014. Diseño y adecuación de un laboratorio para investigación en acuicultura y bioensayos de productos naturales marinos (tesis de maestría). FUNIBER. pp. 12.
- YNGA G, NIÑO A. 2019. Manual para la producción de microalgas marinas en el Instituto del Mar del Perú. Inf Inst Mar Perú. 46(1): 5-16.

## ANEXO

### Instrucciones de uso de la estufa

1. Colocar el material a esterilizar. Cerrar las puertas.
2. Subir la llave electromagnética de la estufa.
3. Encender el equipo.
4. Seleccionar la temperatura y girar la perilla en sentido horario para programar a 120 °C.
5. Seleccionar el tiempo y girar la perilla en sentido horario para programar 2 horas.
6. Una vez programado, al concluir el tiempo de secado, el equipo emitirá un sonido indicando que debe apagarse. Dejar enfriar el material esterilizado.



1. Colocar el material



2. Subir llave electromagnética



3. Encender la estufa



4. Seleccionar la temperatura (120 °C)



5. Seleccionar el tiempo de ejecución (2 horas)



6. Equipo funcionando correctamente

Proceso de manejo de la autoclave vertical marca LABOKLAV modelo ECO-B. Elaboración propia

### Instrucciones de uso del equipo de filtración

1. Limpiar y desinfectar la zona de trabajo
2. Armar el equipo de filtración, el cual está conformado por: una bomba de vacío, un matraz Kitasato de 2 L, embudo de vidrio, vaso Millipore de 500 mL y filtro de membrana de 0,45 µm.
3. Retirar la membrana y colocarlo en el embudo con la superficie cuadrículada hacia arriba. Se recomienda el uso de pinzas estériles para este procedimiento.

4. Colocar el vaso Millipore, adicionar agua de mar tratada y encender la bomba. Tener en cuenta que, al observar disminución en la velocidad del filtrado, es indicativo de saturación del filtro, por lo que es necesario su cambio.
5. Una vez lleno el matraz Kitasato, trasvasar el contenido a un frasco de vidrio resistente, cerrar suavemente para el proceso de autoclavado.

**Instrucciones para el uso del autoclave**

1. Echar aproximadamente 12 L de agua destilada hasta cubrir la resistencia. El nivel del agua debe mantenerse en cada ciclo de esterilización.
2. Colocar el material a esterilizar dentro de la canastilla. Tener en cuenta que la presión a la que llega el interior del equipo, puede ocasionar rotura en los frascos. Se recomienda cerrarlos levemente para evitar el derrame.
3. Subir la llave electromagnética del autoclave.
4. Encender el equipo.
5. Para cerrar la tapa del autoclave, mantener presionado el botón “flecha hacia abajo” hasta que la pantalla indique “cerrado correctamente”.
6. Presionar el botón PROGRAM y seleccionar la función P1 Liquids ST, el cual corresponde a un ciclo de autoclavado de 105 °C, 132 Kpa por 10 minutos.
7. Presionar el botón ENTER.
8. Presionar el botón START para iniciar el ciclo de autoclavado.
9. Abrir la válvula de ingreso de agua potable.
10. Al finalizar el ciclo, presionar el botón STOP y abrir la tapa del autoclave para evitar la formación de cristales en el agua de mar. Retirar los frascos de la canastilla, usando guantes térmicos y dejar enfriar.

Nota: Este procedimiento también aplica para el esterilizado del medio Guillard F/2, a excepción de las vitaminas.



1. Subir llave electromagnética



2. Encender el equipo



3. Presionar el boton para cerrar



4. Presionar PROGRAM y seleccionar Liquids



5. Presionar START



6. Abrir la válvula de ingreso de agua potable



7. Presionar STOP al finalizar el ciclo y abrir la tapa

Proceso de uso de estufa de 750L marca MEMMERT modelo UF750. Elaboración propia