

PROTOCOLO DE MICROALGAS

**CENTRO REGIONAL DE
INVESTIGACIÓN PESQUERA
(CRIP) MANZANILLO, COLIMA**

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....3

CAPITULO I5

1. IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS DE MICROALGAS.....5

2. METODOS DE AISLAMIENTO5

 2.1. AISLAMIENTO CON PIPETA5

 2.2. DILUCIONES SERIADAS.....6

 2.3. AISLAMIENTO EN PLACAS DE AGAR6

CAPITULO II.8

1. MANTENIMIENTO DE UN CEPARIO.....8

2. CONDICIONES DE CULTIVO.8

 2.1. ILUMINACIÓN.....8

 2.2. TEMPERATURA.....9

 2.3. AIREACIÓN Y AGITACIÓN.....9

 2.4. pH.....9

 2.5. SALINIDAD10

CAPITULO III.11

1. MEDIOS DE CULTIVO.....11

 1.1. NUTRIENTES GRADO ANALÍTICO11

 1.2. NUTRIENTES GRADO INDUSTRIAL.....14

CAPITULO IV.....15

CONCENTRACION, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO15

1. CALCULOS DE RECUENTO CELULAR.....16

 1.1. RECUENTO CELULAR CON CAMARA DE 0.1 mm (Neubauer)16

CAPITULO V.....18

SISTEMA DE SIEMBRAS18

ANEXO.21

ESTERILIZACIÓN Y LAVADO DE MATERIAL21

ANEXO II. BITACORAS DE REGISTRO.23

BIBLIOGRAFÍA.....25

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad que incluye varias prácticas y una amplia gama de especies, sistemas y técnicas de producción. Puede definirse como el cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a hacer más eficiente su producción. La acuicultura tiene una historia de 4.000 años, pero ha sido desde hace 50 cuando se ha convertido en una actividad socioeconómica relevante, dando empleo a más de 12 millones de personas en el mundo.¹

La acuicultura tiene a nivel mundial un importante papel que jugar en los esfuerzos por erradicar el hambre y la malnutrición, proveyendo alimentos ricos en proteínas, aceites esenciales, vitaminas y minerales. Además, puede contribuir a reducir la pobreza mejorando los ingresos económicos, fomentando el comercio, ofreciendo oportunidades de empleo y mejorando el uso de los recursos. La FAO considera que la acuicultura es una actividad que contribuye a la utilización eficaz de los recursos naturales, a la seguridad alimentaria y al desarrollo económico, con un limitado y controlable impacto sobre el medio ambiente.

La tasa de crecimiento mundial 1980-2010 de la acuicultura: 8.8% con tendencias hacia la intensificación de los sistemas de cultivo y el control de los aspectos nutricionales. En este sentido, las microalgas tienen un valor muy importante, ya que, aproximadamente el 90% del total de la producción por acuicultura, se emplean como alimento en al menos una etapa de desarrollo de los organismos cultivados (Duerr *et al.*, 1998), ya sea directamente en moluscos, larvas de crustáceos y peces o bien en organismos intermediarios, como rotíferos, copépodos o artemia.

Cabe mencionar que aun cuando las microalgas tienen características deseables para la acuicultura, no todas son adecuadas como alimento para los organismos cultivados y deben tomarse en cuenta varias consideraciones si se desea llevar a cabo con éxito el cultivo larval de peces o de los organismos que se cultivan como alimento para estos estadios larvales. En primer lugar, las microalgas no deben ser tóxicas, deben tener el tamaño adecuado para ser ingeridas, una pared digerible y además, deben tener una composición bioquímica adecuada. Otros criterios están relacionados con la fisiología de las microalgas e incluyen la resistencia a la fotoinhibición, la respuesta a las fluctuaciones diurnas, la sensibilidad a concentraciones de oxígeno y el estrés osmótico, ya que es común que en los sistemas de cultivo masivo realizados al exterior, se presenten condiciones limitantes que repercuten en el volumen de producción y por lo tanto en la rentabilidad (Abalde *et al.*, 1995).

Entre las especies de microalgas que se usan comúnmente en la alimentación de organismos acuáticos y utilizadas para este proyecto se encuentran *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Chrorella sp.* y *Thalassiosira pseudonana*.

El objetivo de este protocolo es dar a conocer la metodología aplicada para la producción de microalgas para alimento de peces y rotíferos.

¹ APROMAR, 2012

El cultivo de las microalgas tiene un papel trascendental y por tanto, es importante adaptar y desarrollar la tecnología de producción de microalgas a fin de diversificar la actividad acuacultural en Colima, fomentando el crecimiento de esta actividad productiva con la participación de todos los sectores, contribuyendo así al desarrollo socioeconómico de la zona y colocando al Estado a la vanguardia en la transferencia tecnológica en materia de producción de alimento vivo en las instalaciones del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP Manzanillo)

CAPITULO I

1. IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS DE MICROALGAS

Las cepas que se usan para fines comerciales se obtienen generalmente de colecciones ya establecidas y conocidas, pero existen varios motivos para seguir aislando especies de microalgas de poblaciones naturales locales, en parte porque se encuentran más adaptadas a las condiciones ambientales dominantes en cada región.

La finalidad de este apartado es hacer una breve descripción de las técnicas y procedimientos que se usan con mayor frecuencia para aislar y mantener organismos del fitoplancton, aunque hay que mencionar que estos pueden variar de acuerdo a las características que presente cada especie, del tipo de muestra y de los medios y equipo que se disponga.

2. METODOS DE AISLAMIENTO

El objetivo de aislar microalgas es la de obtener cultivos monoespecíficos a partir de un solo individuo (célula, filamento o quiste), que en este caso se definen como cultivos clonales, o iniciados con varios individuos de la misma especie. Estos cultivos pueden contener bacterias o ser libres de ellas.

Existen varios métodos de aislamiento, que dependen de las dimensiones de las microalgas, de su movilidad y de su morfología. Los que más se utilizan son el aislamiento con micropipeta, en placas de agar y con diluciones sucesivas y se recomienda combinar estas técnicas, que permiten lograr con mayor facilidad el aislamiento de organismos.

2.1. AISLAMIENTO CON PIPETA

Este método se utiliza para separar microalgas mayores a $10\mu\text{m}$ de diámetro en forma de quistes, células vegetativas, dinoflagelados, formas coloniales o filamentosas (Andersen y Kawachi, 2005)

Este método consiste en aislar una microalga con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida y/o con un capilar. Se coloca una gota de muestra de fitoplancton en un portaobjeto y se coloca bajo el microscopio, donde las células de interés se succionan por capilaridad con la pipeta y se pasa a un portaobjetos limpio o a una lámina de pocillos con una gota de agua estéril (dulce o de mar según sea el caso. Este procedimiento se repite, “lavando” la célula en medio o en agua estéril hasta cuando no se observen contaminantes y la gota contenga un solo tipo de células, generalmente se requiere al menos cinco transferencias sucesivas.

Una vez realizadas las transferencias, la célula aislada se puede colocar en tubos de ensaye con 2-5 ml de medio de cultivo estéril. Esta técnica se recomienda para microorganismos que no sean

sensibles a la manipulación. Se debe tener cuidado y evitar cambios bruscos de las condiciones de originales de la muestra, por lo cual la transferencia se debe hacer rápido y con cuidado. Este método requiere de práctica. Se recomienda antes de iniciar un aislamiento con pipeta, experimentar con algunas microalgas similares a las que se pretenden aislar, para seleccionar la iluminación, aumento, tipo de laminillas y cantidad de muestra y poder reconocer y capturar a la especie de interés en menos de 10 minutos.

2.2. DILUCIONES SERIADAS

Este método se utiliza cuando la microalga que se pretende aislar tiene un tamaño inferior a 10µm de diámetro y es muy útil para aislar las especies que son más abundantes en la muestra. (Andersen y Kawachi, 2005)

Antes de iniciar las tareas de aislamiento, es necesario calcular la concentración celular de la microalga de interés, con el objeto de calcular el número de diluciones necesario para disminuir la concentración a unas cuantas células/ml. Generalmente se toma 1 ml de la muestra original y se agrega a un tubo de ensayo que contiene 9 ml de medio de cultivo estéril, se homogeniza y luego se agrega 1 ml a un segundo tubo con 9ml de medio, se homogeniza y así sucesivamente. El número de diluciones depende de la concentración de la microalga que se pretende aislar.

2.3. AISLAMIENTO EN PLACAS DE AGAR

Varias especies de microalgas se pueden aislar mediante la técnica de rayado en estrías en una caja Petri con agar. Esta técnica es utilizada para purificar cultivos contaminados con otros microorganismos. No todas las especies se pueden mantener en medio sólido, especialmente especies flageladas y algunas diatomeas (Hoshaw y Rosowski, 1973; Andersen y Kawachi, 2005), pero esta técnica puede dar buenos resultados con especies bentónicas, clorofitas, cocoidales y cianofitas.

Se prepara con un litro de agua tratada, donde se suministran los nutrientes correspondientes (2ml/l) junto con 15g de agar y se esteriliza en autoclave. Posteriormente, se deja a temperatura ambiente y antes de que solidifique se vacía en cajas de Petri estériles, ayudándose de un mechero bajo un cerco estéril para eliminar contaminación.

Se dejan enfriar por 24 horas antes de sembrar. La siembra consiste en tomar una muestra de la especie a inocular (una o dos gotas) con un asa para bacteriología o con una varilla de vidrio doblada, previamente esterilizada y efectuar un barrido en forma de rayado dentro del medio de la caja de Petri. La caja se cubre con su tapa, se invierte y se coloca en un ambiente con temperatura y luz controladas, se incuba durante 4 a 8 días y posteriormente se observa al microscopio y/o estereoscopio y con la ayuda del asa se seleccionan las colonias libres de otros microorganismos, y se transfieren a otra caja de Petri.

Todo este proceso es bajo un estricto control de higiene y en un medio estéril.

Esta actividad se realiza las veces que sea necesario hasta asegurar el éxito del aislamiento de un solo tipo de microalga y para lograrlo con mayor seguridad se recomienda utilizar esta técnica en combinación con las diluciones seriadas que se indicó anteriormente.

CAPITULO II.

1. MANTENIMIENTO DE UN CEPARIO

El cepario es el área que mantiene las cepas puras, es importante mantener los cultivos en condiciones apropiadas para garantizar que las cepas se encuentren en un buen estado, ya que el colapso de las colecciones de microalgas causa la pérdida de cepas. A continuación, se detallan algunas de las condiciones de mantenimiento básicas que son útiles para la mayoría de las especies, aunque en ocasiones es necesario llevar a cabo modificaciones, que dependen de los requerimientos de la especie de interés.

El mantenimiento de las cepas se puede hacer tanto en medio líquido como en sólido, como se mencionó anteriormente. Los cultivos líquidos de las cepas se mantienen en recipientes de volumen pequeño, en matraces Erlenmeyer de 20-100ml o en tubos de ensayo de 25-50 ml.

La transferencia de los cultivos se realiza generalmente cada 15-20 días, dependiendo del crecimiento de la cepa. Las inoculaciones se hacen bajo una atmósfera estéril en un cuarto de siembra, en presencia de mecheros de gas. El área donde se haga la transferencia debe estar perfectamente limpia. La mesa del cuarto de cultivo se limpia previamente con alguna solución desinfectante (etanol al 70%, cloro 4⁰/₀₀). Se recomienda que las transferencias se hagan a baja temperatura, en un cuarto aislado y sin circulación de aire.

Con la finalidad de asegurar alguna cepa, se recomienda mantener cada cepa por triplicado.

Es importante rotular los recipientes con el nombre y origen de la especie, fecha de inoculación y tipo de medio de cultivo. Finalmente se colocan en condiciones favorables de luz y temperatura para su crecimiento.

2. CONDICIONES DE CULTIVO.

El mantenimiento de un cepario no tiene la finalidad de producción, pero su objetivo es el de garantizar la disponibilidad continua de cepas de alta calidad que ofrezcan todas las garantías de éxito al momento de iniciar un cultivo comercial. Por este motivo, es importante que el ambiente en el cual se mantienen estos cultivos estén en condiciones adecuadas para garantizar tal disponibilidad.

A continuación se presentan algunas de las condiciones que permiten mantener el cepario en condiciones adecuadas.

2.1. ILUMINACIÓN

Para el mantenimiento de las cepas, es recomendable usar luz artificial, ya que es posible controlarla de acuerdo a las necesidades del cultivo. La intensidad luminosa que se utiliza puede variar con el

volumen, concentración celular del cultivo y con la especie. Las lámparas que se utilizan con mayor frecuencia son del tipo “cool-white” de 40w.

2.2. TEMPERATURA

Para el mantenimiento de las cepas es recomendable mantener temperaturas de 18°C - 22°C, aunque se pueden usar temperaturas menores para disminuir la frecuencia de las diluciones de mantenimiento. Para fines de reproducción, los cultivos se mantienen a la temperatura más conveniente para acelerar la tasa de crecimiento. La cual depende de los límites de tolerancia de cada especie.

Es importante mencionar que el sistema de iluminación es también una fuente de calor, por lo cual las áreas que se utilizan para el mantenimiento de cepas debe considerar la necesidad de un sistema confiable de control térmico.

2.3. AIREACIÓN Y AGITACIÓN

En cultivos de pequeños volúmenes no es necesaria una aireación, basta con una agitación manual diariamente. En cultivos a mayor escala, la aireación debe ser leve durante la fase inicial de crecimiento (hasta 1-2 días después de la inoculación) que puede ser aumentada dependiendo de la sensibilidad de la especie. (Es recomendable evitar la formación de espuma, controlando la aireación).

Cuando aumenta la concentración celular del cultivo, con la aireación se logra una dispersión efectiva de nutrientes, se mejora la disponibilidad de la luz para las células y se aporta CO₂ ayudando a estabilizar el pH. Así mismo se mantienen en suspensión las microalgas, evitando la formación de estratos térmicos y el cultivo se vuelve más uniforme al momento de la cosecha.

El aire puede ser distribuido por un aireador (blower). Para distribuir el aire en los sistemas de cultivo es común utilizar líneas de PVC con válvulas y se recomienda la utilización de filtros. Existen gran variedad de tipos de filtros que se pueden utilizar por mencionar: millipore, de fibra, de tierra de diatomeas, empaques de algodón y carbón activado. Además de estos filtros, una manera confiable, barata y sencilla de hacer un filtro es utilizar un tubo de PVC, relleno de algodón en sus extremos y carbón activado en el centro. El utilizar filtros ayuda a disminuir la carga bacteriana y partículas que entren evitando así el contacto con el cultivo.

2.4. pH

El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO₂ y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono, influyendo directa o indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Patrick, 1968).

El pH tiene un efecto sobre la solubilidad de varios compuestos metálicos; un aumento de pH puede ocasionar una deficiencia en algunos elementos traza. El crecimiento fotosintético de las microalgas provoca cambios en el pH del medio, si este aumenta hasta un pH de 9, el carbonato puede precipitar lo que implica que los nutrientes no se encuentren disponibles (Abalde et al., 1995).

2.5. SALINIDAD

La concentración de sales minerales disueltas tanto en agua dulce como en agua de mar, puede afectar el crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica. El efecto de la salinidad adquiere mayor influencia cuando se relaciona con otras variables, como temperatura, luz, fuente de nitrógeno y concentración de nutrientes (Fábregas et al., 1986).

La membrana plasmática de células microalgales es permeable al agua pero no a solutos. En un sistema de estrés salino, las células deben equilibrar su presión osmótica con el exterior aumentando la síntesis de solutos o la incorporación de éstos.

CAPITULO III.

1. MEDIOS DE CULTIVO

Existe una gran variedad de medios de cultivo, la mayoría son modificaciones de fórmulas anteriormente establecidas. Para elegir un medio de cultivo adecuado a las necesidades de la microalga a cultivar, es necesario considerar: la salinidad, la composición y concentración de iones, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, pH, elementos traza y vitaminas.

Los medios de cultivo pueden ser naturales o sintéticos. Los medios están preparados con agua enriquecida con sales minerales. Los medios sintéticos se preparan con agua destilada, sales minerales y se adicionan los componentes naturales del agua de mar o del agua dulce (Alfonso y Leal, 1998)

El medio que se utiliza generalmente para la propagación de microalgas es el f/2 (Guillard y Ryther, 1962).

1.1. NUTRIENTES GRADO ANALÍTICO

Estos son utilizados en el cepario, tubos, matraces, frasco y garrafones

Soluciones para obtener medio F/2:

COMPUESTO	Sol. Stock	Cantidad
Silicatos	30 gr	1 ml
Nitratos	75 gr	1 ml
Fosfatos	5 gr	1 ml
Sol. de metales traza	*	1 ml
Solución de vitaminas	*	1 ml

Aforar a un litro y esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² (1.1 kg/cm²) de presión durante 15 minutos excepto las vitaminas que se esterilizan por filtración.

Solución de metales traza

A 950 ml de agua destilada añadir:

COMPUESTO	SOLUCIÓN STOCK	Cantidad
EDTA		4.36 gr/l
CLORURO FERRICO		3.15 gr/l
Sulfato cúprico CuSO ₄	9.8 gr/lt	1 ml
Sulfato de Zinc	22 gr/lt	1 ml
Cloruro de Cobalto CoCl ₂	10gr/lt	1 ml
Cloruro de manganoso MnCl ₂	180gr/lt	1 ml
Molibdato de Sodio Na ₂ MoO ₄	6.3gr/lt	1 ml

Llevar a un volumen final de un litro, calentar para disolver y esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² (1.1 kg/cm²) de presión durante 15 minutos. Mantener en refrigeración.

Solución de vitaminas

A 950 ml de agua destilada añadir:

Compuesto	Sol. stock	Cantidad
Vitamina B ₁₂ *	1 gr/l de agua destilada	1 ml
Biotina	0.1 g/l	
Tiamina- HCl	200mg	

Esterilizar por filtración y mantener en un frasco ámbar en refrigeración

*Para la vitamina B₁₂ se puede preparar con agua destilada y 4 ampulas de Beyodecta por litro de agua.

Todos los nutrientes analíticos se preparan con agua destilada; para una completa disolución del E.D.T.A. se le aplica temperatura, de igual manera con los nitratos.

Los nutrientes se tienen que disolver por separado; cuando son dos o más nutrientes primeramente se disuelven de manera independiente y posteriormente se mezclan para formar una solución.

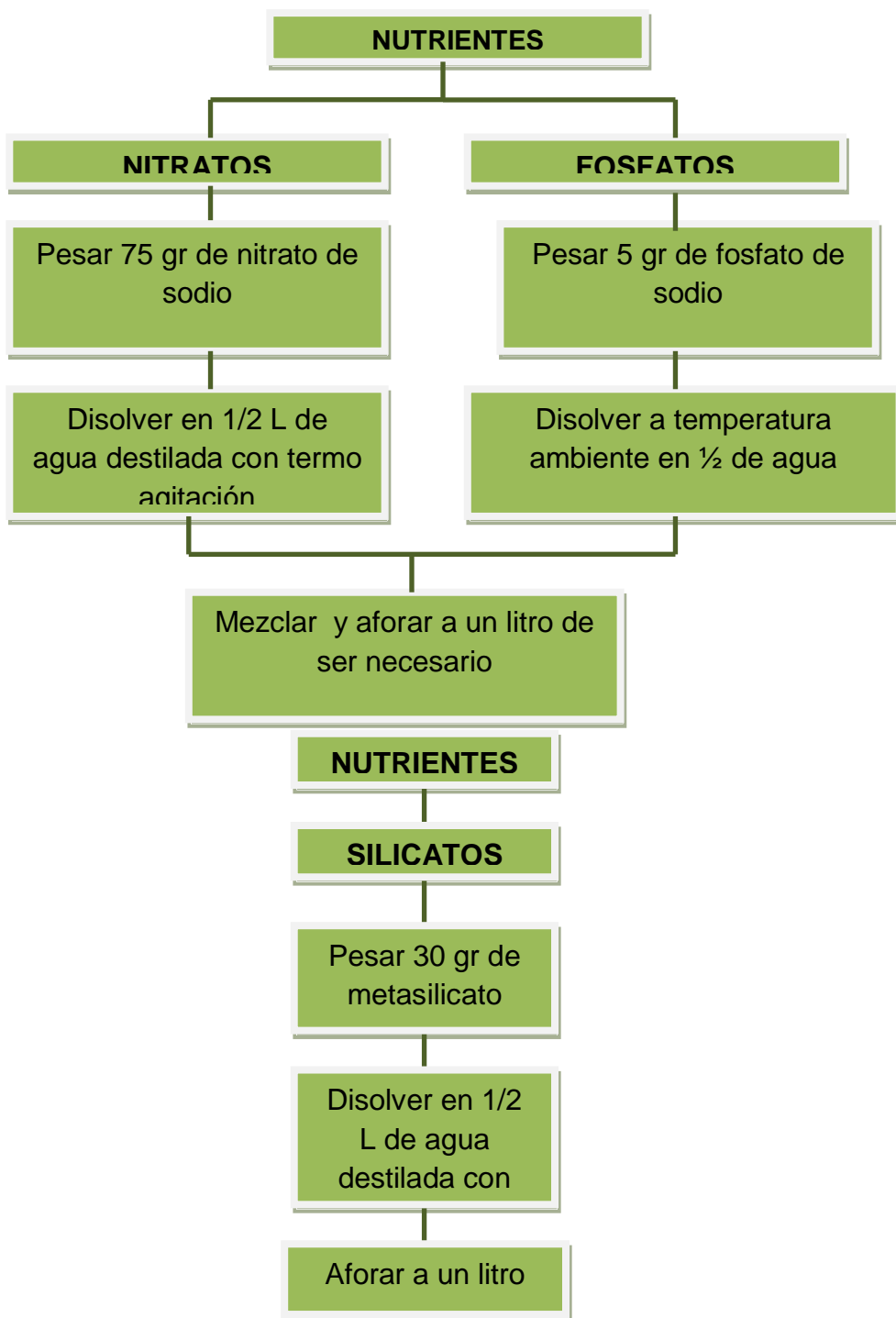


Fig. 1 Diagrama de preparación

1.2. NUTRIENTES GRADO INDUSTRIAL.

NUTRIENTES	REACTIVO	1 LITRO DE AGUA	5 LITROS DE AGUA
Silicatos	Meta silicatos de sodio	120 g	600 g
	Cloruro férrico	12.8 g	64 g
Metales	E.D.T.A	17.6 g	88 g
	Metales traza	4ml	20ml
	Tiamina	1 g	5 g
	Biotina	0.02 g	0.1 g
Vitaminas	Vitamina stock	30ml	150ml
		300 g	1500 g
Nitratos y fosfatos	Nitrato de sodio		
	Fosfato monobásico de sodio	20 g	100 g

Nota: Todos los nutrientes de grado industrial se preparan con agua purificada y se preparan como se indica en el cuadro, son almacenados en refrigeración en frasco ámbar o cubiertos con papel aluminio

CAPITULO IV

CONCENTRACION, RECUESTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO

En un cultivo de microalgas el crecimiento se expresa como el incremento de biomasa en forma de número de células (cel/ml).

El crecimiento puede ser estimado por el recuento celular a través del microscopio, este método es un método sencillo y poco costoso, el cual permite un mejor seguimiento del cultivo mediante su inspección visual.

Uno de los problemas para el recuento al microscopio es obtener una buena reproductibilidad, por lo cual es importante saber seleccionar el tamaño de la muestra, la dilución, el tipo de cámara de recuento, el objetivo del microscopio y la técnica de llenado de la cámara.

La cámara que se utiliza con mayor frecuencia para cultivos de microalgas es el hematocitometro de 0.1mm de profundidad con reglilla de Neubauer, la cual consta de nueve cuadros con lados de 1mm (área total de recuento = 0.9mm²) cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0.1µl. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04mm² (0.2mm x 0.2mm), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños.

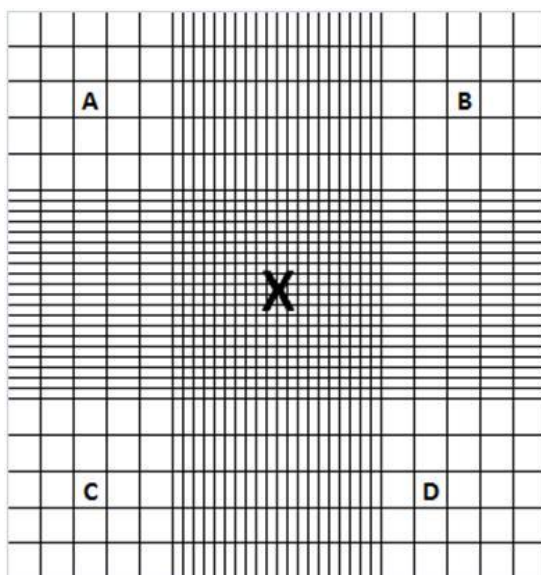


Fig. 2 Reglilla de Neubauer

Para células mayores a 6µm y con cultivos relativamente poco concentrados, se recomienda que el recuento se haga en los cuadros marcados como A, B, C y D. (figura 2)

1. CALCULOS DE RECUENTO CELULAR.

Si se contaron todas las células presentes en los 4 cuadros de 1mm^2 marcados como A, B, C y D, la concentración celular se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$C=(N)(10^4)(\text{dilución})$$

En donde:

C=células/mililitro

N= Promedio de células presentes en 1mm^2 ($0.1\mu\text{l}$)

Dil= Factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra).

Es importante mencionar que si se uso 1 ml de muestra y 9 ml de agua sin células, el volumen total es de 10 ml y el factor de dilución es =10 (esta dilución se define como uno en diez).

10^4 = Factor de conversión de $0.1\mu\text{l}$ a 1ml.

1.1. RECUENTO CELULAR CON CAMARA DE 0.1 mm (Neubauer)

- a) Agitar el cultivo para permitir que las células tengan una distribución homogénea.
- b) tomar una muestra de 1 ml y colocarla en un tubo previamente lavado y seco. Agregar una gota de formol para fijar las células.
- c) cuando el cultivo está muy concentrado ($>10^6$ cel/ml) se diluye la muestra con agua destilada o agua de mar filtrada y esterilizada (según sea el caso) Nota: Regularmente una dilución 1:10 es suficiente, pero es necesario verificar que la concentración resultante sea suficiente.
- d) El tubo se agita y se succiona una muestra con una pipeta Pasteur.
- e) Se llena la cámara con el cubreobjeto ya puesto, colocando la punta de la pipeta Pasteur, cuidando que el volumen depositado sea suficiente para que una parte llegue hasta los canales laterales, pero sin inundarlos completamente. Si esto sucede, se seca y limpia la parte inferior de la cámara y se observa al microscopio para verificar que las células tengan una distribución adecuada (no agrupada).
- f) Generalmente se enfoca la cámara con el objetivo 10X aunque en ocasiones cuando se trata de células pequeñas se utiliza el de 40X. Esto facilita la identificación de las células, descartando los residuos y demás partículas con tamaño similar a la microalga que se está cultivando. (Figura 3)
- g) El registro se hace contando las células que quedan dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como A, B, C y D indicadas en la figura 2 En caso de que las células que tocan las líneas de demarcación entre cuadros, se cuentan solamente las que tocan dos de los cuatro lados, seleccionados al azar.

h) Para tener un recuento más preciso, se usan tres o más submuestras de cada muestra y con éstas se calcula la concentración media.

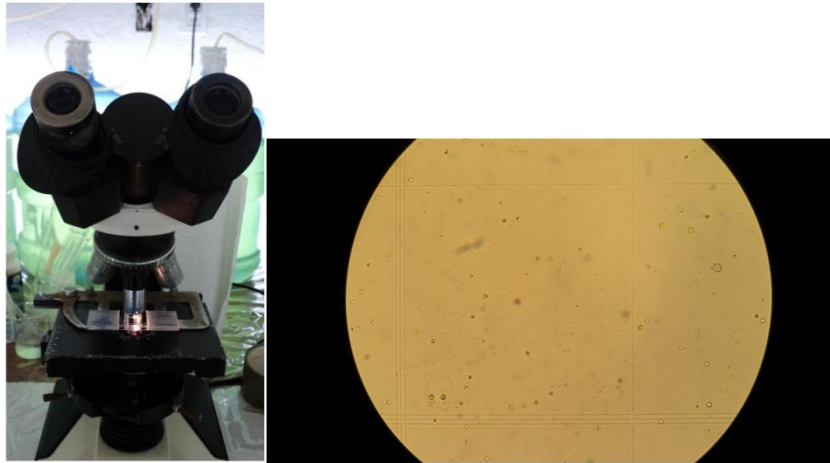


Fig. 3 Microscopio para recuento celular

CAPITULO V.

SISTEMA DE SIEMBRAS

Es necesario revisar las muestras de tubos y matraces previo a una inoculación, esto se hace a través de un conteo (descrito en el capítulo IV) con el fin de descartar contaminación, deformidades y evaluar el estado del inoculo.

Tubos

Estos se inoculan con 9ml de nutriente y 1ml de inoculo (cepa madre), y se mantienen por un lapso 5 días para que lleguen a una adecuada concentración (número de células) y poder llevar a cabo desdobles en otros tubos o en matraces de 250ml.

Matraz de 250ml.

Se colocan 100ml de medio de cultivo enriquecido con nutrientes, preparado igual que los tubos de ensayo y se inoculan con 20ml de microalga, y se mantienen por un lapso de 5 días para lograr una buena concentración (de 2 a 5 millones de células por mililitro) para después inocular un frasco con una capacidad de 1 litro.

Frasco de 1 litros

Los frascos de 1 litro se llenan con 400ml de agua marina tratada (filtrada y esterilizada), 400ml de medio de cultivo y finalmente se inocula con 200 mililitros de microalga proveniente de matraz, por un lapso de 5 días para obtener una concentración mayor de 2 millones de células por mililitro.

A partir de este volumen de cultivo es recomendable filtrar la microalga con malla de 50 micras previo al inoculo en frascos de 3 litros.



Fig. 4 Frascos de 1 Litro.

Fascos de 3 litros

Los fascos de producción se llenan con 2.5 litros de agua salada filtrada y esterilizada y se le adicionan nutrientes (5ml de cada nutriente, inoculando con 500ml de concentrado de Microalgas provenientes de fascos de 1 litro, dejándolos por 5 días para continuar con el escalamiento de la producción a garrafones. Es importante a partir de este volumen de cultivo, mantener una aireación constante y filtrar la microalga con malla de 50micras previo al inoculo en Garrafones.



Fig. 5 Fascos de 3 Litros

Garrafón de 20 litros

Previo al inoculo de los garrafones con microalga, éstos se deberán lavar con agua dulce y desinfectar con cloro (1ml/Litro de agua), nuevamente se enjuagan con agua dulce y se adiciona tiosulfato de sodio a una cantidad de 0.30gr/Litro para eliminar restos de cloro.

Los garrafones se llenan con agua marina filtrada y esterilizada a un volumen de 15 litros y son inoculados con el frasco de 3 litros de microalga, se adicionan los nutrientes correspondientes (20ml de cada nutriente). Por último, rotular con fecha de siembra, especie de microalga y colocar aireación suave.



Fig. 6 Garrafón 20 Litros

Cultivos masivos

Columnas de 150 litros

Las columnas se llenan con agua marina filtrada y esterilizada a un volumen de 130 litros y se siembran con un garrafón de 18 litros de microalga, se agregan los nutrientes de grado industrial (150ml de cada nutriente), rotular con la fecha de siembra, especie de microalga y posteriormente se le coloca aireación suave.

Pilas de concreto

Antes de inocular, se recomienda lavar y desinfectar las pilas con cloro (1ml / litro), se enjuagan con agua dulce y se adiciona tiosulfato de sodio (0.30gr/litro) para neutralizar restos de cloro. Una vez limpias y desinfectadas las pilas, colocar el sistema de aireación, y comenzar a llenar con agua marina filtrada y esterilizada a un volumen de 1,300 litros, inoculando con el volumen de 1 columna, se adicionan 250ml de nutriente.

Nota: En columnas, tinas y cultivo masivo (pilas), se utilizan los nutrientes de grado industrial.

Para *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* se les ponen vitaminas, metales, nitratos y fosfatos. El silicio participa en el medio de cultivo solamente cuando se trata de algas diatomeas (ejemplo: *Chaetoceros calcitrans*). Este elemento es agregado como solución de metasilicato de sodio (SiO_3Na^2). El silicio siempre se lo disuelve aparte y forma una solución stock. El metasilicato de sodio se disuelve con facilidad en agua destilada tibia y es altamente alcalino, por lo que se precipita o se polimeriza cuando se lo agrega al medio.

ANEXO

ESTERILIZACIÓN Y LAVADO DE MATERIAL

a) Esterilización

El material utilizado en el cultivo de microalgas, especialmente en cepario, deben lavarse perfectamente y esterilizarse para evitar la contaminación ya sea por agentes externos o contaminación cruzada de un cultivo a otro. De igual forma se esterilizan los medios de cultivo para el nivel cepario.

La esterilización se hace en autoclave, poniendo todo el material que se va a esterilizar dentro de ella, con una envoltura de papel aluminio. El autoclave se cierra herméticamente y se enciende, una vez que el manómetro ha alcanzado la zona de esterilización (123-127°C o 255-258°F) se le dan entre 15 y 20 minutos; al término de este tiempo se apaga el autoclave y se deja enfriar el material en su interior para ser utilizado al día siguiente.

b) Lavado de material

Todo el material utilizado incluyendo equipos utilizados en diferentes áreas, mangueras, tubos de aireación, varillas de cristal,, deben ser lavados con agua dulce, posteriormente se ponen a remojar en un recipiente con ácido clorhídrico al 10% y se dejan reposar hasta el día siguiente y se enjuagan con abundante agua para quitar los residuos del ácido.

Para la bomba sumergible se recomienda lavar con cloro (sumergirla en cloro, enjuagar, sumergir nuevamente en cloro y enjuagar con abundante agua).

Para el caso de cilindros y tinas estos se lavan con cloro y se cepillan, se realiza un enjuague con abundante agua, posteriormente se agrega ácido clorhídrico al 20% y nuevamente se cepilla, se enjuaga con abundante agua. Es necesario lavar también el equipo de aireación (mangueras, piedras difusoras, etc). (Figura 4)



Fig. 7 Lavado y desinfección de materiales.

c) Higiene

El personal encargado de manipular los cultivos deberá tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

Estar en buen estado de salud, evitar hablar estornudar o toser mientras se realizan las actividades de siembra en cepario (se recomienda utilizar cubrebocas).

Desinfectarse las manos con alcohol antes de agitar las cepas e inocular los tubos, matraces y frascos

Utilizar solamente material estéril para inocular los tubos y matraces

Mantener cubiertos los cultivos, para evitar la contaminación con otros microorganismos.

Apartar el material sucio, ya que este puede ser tomado accidentalmente y ser utilizado para inocular cultivos de especies distintas.

d) Labores cotidianas del área de microalgas

Agitar los tubos de ensayo y matraces del cepario por la mañana y por la tarde

Registro de variables (pH, salinidad, temperatura) y anotación en la bitácora.

Toma de muestras para hacer conteo celular.

Lavar material

Esterilizar el material necesario para realizar cultivo en cepario.

Realizar siembras según corresponda

Preparar nutrientes en caso de ser necesario

Mantener en orden y limpia cada una de las áreas (cepario, área de garrafones, área de cilindros y tinas) al término de las labores diarias.

ANEXO II. BITACORAS DE REGISTRO.

AREA: MICROALGAS

SEMANA DEL _____ AL _____ DE _____

DEL _____

RESPONSABLE: _____

		PARAMETROS		
		pH	T°C	Salinidad (ppm)
LUNES	GARR			
	CIL			
	TINA			
	MASIVO			
MARTES	GARR			
	CIL			
	TINA			
	MASIVO			
MIERCOLES	GARR			
	CIL			
	TINA			
	MASIVO			
JUEVES	GARR			
	CIL			
	TINA			
	MASIVO			

		PARAMETROS		
		pH	T°C	Salinidad (ppm)
VIERNES	GARR			
	CIL			
	TINA			
	MASIVO			
SABADO	GARR			
	CIL			
	TINA			
	MASIVO			
DOMINGO	GARR			
	CIL			
	TINA			
	MASIVO			

OBSERVACIONES: _____

FECHA: _____ RESPONSABLE _____

PRODUCCION **ESPECIE:** _____

	VOLUMEN	CEL/ML	DIAS DE CULTIVO	DESTINO	OBSERVACIONES
TUBO					
MATRAZ					
FRASCO					
GARRAFON					
CILINDRO					
TINA					
MASIVO					

ESPECIE: _____

	VOLUMEN	CEL/ML	DIAS DE CULTIVO	DESTINO	OBSERVACIONES
TUBO					
MATRAZ					
FRASCO					
GARRAFON					
CILINDRO					
TINA					
MASIVO					

ESPECIE: _____

	VOLUMEN	CEL/ML	DIAS DE CULTIVO	DESTINO	OBSERVACIONES
TUBO					
MATRAZ					
FRASCO					
GARRAFON					
CILINDRO					
TINA					
MASIVO					

BIBLIOGRAFÍA

Abalde, J., P. Hidalgo y E. Torres. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidad de Coruña, España. 210 p.

Alfonso, e. y Leal, S. 1998. Creación y mantenimiento de un cepario de microalgas. Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de La Habana, Cuba, 21 págs.

Andersen, R.A y Kawachi, M. 2005. Traditional Microalgae Isolation Techniques. En: Andersen, R.A. (ed), Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. E.U.A., 83-100pp

Duerr, E., A. Molnar y V. Sato. 1998. Culture microalgae as aquaculture feeds. Journal Marine Biotechnology, 7:65-70.

Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., Liaño, R., y Abalde, J.1986. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch cultures. Journal of Plant Physiology 125: 475-484.

Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of microbiology 8: 229-239.

Hoshaw, R.W. y Rosowski, J.R. 1973. Methods for microscopic algae. En: Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements. Stein, J.R. (ed), Cambridge University Press, UK, 53-68 pp.

Patrick, R 1968. The structure of diatom communities on similar conditions. Annals Nature 102: 173-183.