



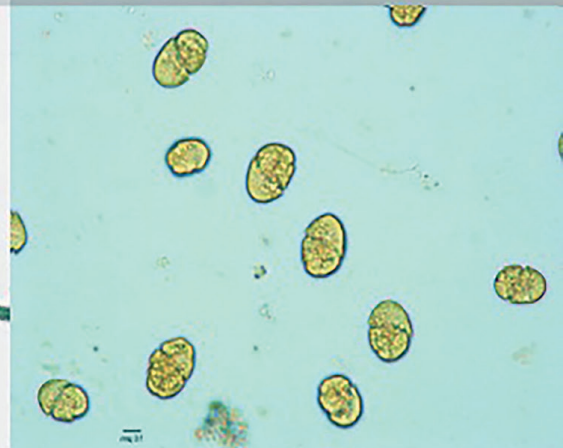
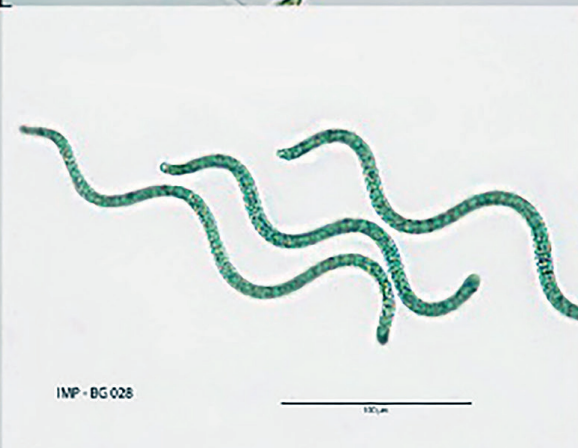
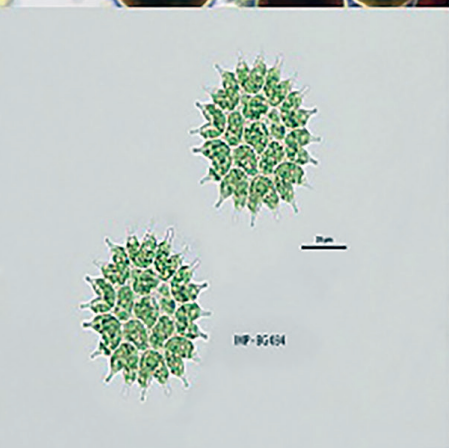
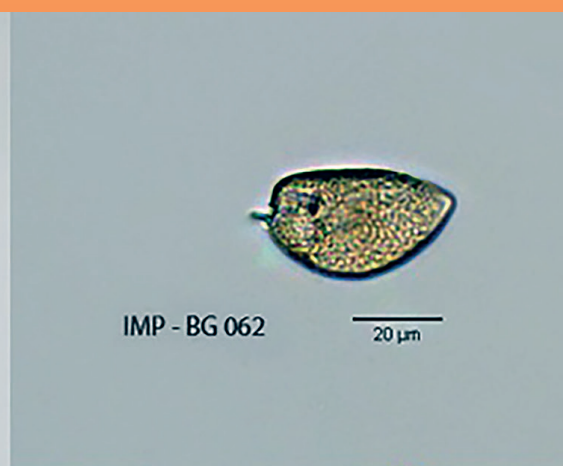
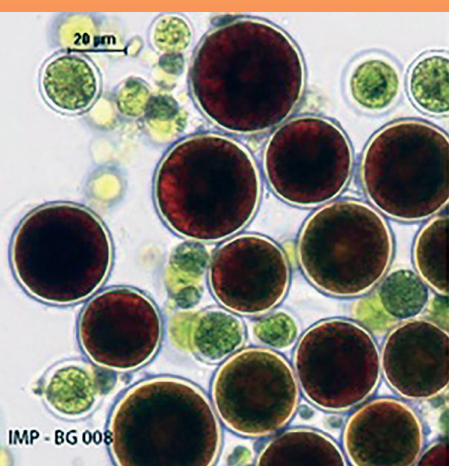
INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

# INFORME

ISSN 0378-7702

Volumen 43, Número especial

## Manual de obtención de cepas de microalgas



Octubre 2017

Callao, Perú

---

---

# MANUAL DE OBTENCIÓN DE CEPAS DE MICROALGAS

## MANUAL FOR OBTAINING MICROALGAE STRAINS

Liz Cecil Tenorio García-Blásquez\*, Hanna Elizabeth Hernández Acevedo, Marco Antonio Aguirre Obregón

### RESUMEN

Tenorio García-Blásquez LC, Hernández Acevedo HE, Aguirre Obregón MA. 2016. *Manual de obtención de cepas de microalgas*. Inf Inst Mar, Per. Inf. 43(especial): 000-000.-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 García-Blásquez LC, Hernández Acevedo HE, Aguirre Obregón MA. 2016. *Manual for obtaining microalgae strains*. Inf Inst Mar, Per. Inf. 43(especial): 000-000.-This manual is a product from the "Programa Presupuestal PpR 0094: Ordenamiento y desarrollo de la acuicultura" with the aim of disseminating the laboratory methodologies used to obtain microalgae strains in the Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Instituto del Mar del Perú. Procedures for preparing culture media and obtaining marine and fresh water microalgae strains are explained and detailed. The manual also presents general aspects of microalgae biology, 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, además con un litoral marino de 3080 km de alta productividad primaria. Los cuerpos de aguas continentales se distribuyen entre los 0 y 6000 m de altitud, proporcionando hábitad de diversas condiciones medioambientales para las microalgas. Muchos de los cuerpos de agua continentales presentan características oligotróficas, y aún no presentan un impacto antrópico significativo, mientras que otros presentan características eutróficas debido principalmente al impacto humano (v.g. acuicultura, turismo, desechos urbanos), los cuales modifican el ambiente y como consecuencia son las principales causas de la pérdida de la biodiversidad, entre las que se encuentran las microalgas.

Por otro lado, el uso de las microalgas se ha incrementado para distintos fines, como: biodisel, biorremediación, industria cosmética, farmacéutica y alimentos (COLL 1991, CRESWELL 2010). Esto ocurre

porque las microalgas tienen muchas ventajas y potencialidades, como por ejemplo su rápido crecimiento, el cual puede escalonarse para llegar a grandes volúmenes. Por otro lado, 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 bioquí-

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

mica adecuada para la óptima nutrición de los organismos cultivables. Existen otras características ligadas a la fisiología de la especie como resistencia a la fotoinhibición, 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 (mono-específico) logrado a partir del aislamiento de una unidad algal en condiciones de asepsia. 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.

## MARCO TEÓRICO

### 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.

Las microalgas son importantes productoras primarias de biomoléculas mediante la fotosíntesis, utilizan energía luminosa y la transforman en energía química. Algunas son fotoautótrofas obligadas (GLADUE 1991), no obstante otras son solamente heterótrofas 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).

Las microalgas son en su mayoría organismos acuáticos, sin embargo existen formas que habitan en sedimentos, suelo, epífitos 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 podemos mencionar 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 (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. El requerimiento de estos nutrientes se clasifica 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. Mientras que los micronutrientes son utilizados en menor concentración como catalizadores en funciones reguladoras osmóticas, como el hierro, manganeso, zinc, molibdeno, vanadio, bario, cloro, cobalto, calcio, sílice y sodio (GUILLARD 1975).

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. La 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).

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: $B_{12}$ , tiamina, biotina                                                  |

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 (VOSKRENSKAYA 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 fotoperiodo. La irradiancia para muchas algas en cultivo de mantenimiento es de  $10 - 30 \mu\text{Einstein seg}^{-1}\text{m}^{-2}$  (1 - 2% de luz solar completa) (Guillard & 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 de mantener una intensidad de luz constante y no tan intensa ya que las microalgas pueden decaer en su crecimiento poblacional por fotoinhibición al dañar el fotosistema II. Los cultivos donde existe una 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 laboratorio 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  $27^\circ\text{C}$ ; 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 dependiendo de las condiciones de laboratorio que se quieran dar.

El pH es otro factor importante en los cultivos. Si existen 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 factores como la productividad algal, respiración celular, alcalinidad del medio, composición iónica del medio de cultivo, actividad microbiana y concentración de  $\text{CO}_2$ . En ciertos niveles alcalinos de pH, se compromete la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  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

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 además enriquecida para mantener un balance de nutrientes y garantizar la asepsia del cultivo. Este equilibrio de nutrientes consiste en adicionar los principales nutrientes inorgánicos como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , 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 u 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  $\text{B}_{12}$  (cianocobalamina)

utilizada en procesos metabólicos de las microalgas (HOFF y SNELL 2001).

Una vez obtenido el inóculo o primer cultivo unialgal (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 por si en algún volumen llevado el cultivo sufre una muerte celular repentina o se contamina. Estos cultivos de respaldo deben ser mantenidos a volúmenes pequeños y realizar recambios de nutrientes según lo requiera la microalga. Al aumentar el volumen de los cultivos y prevenir la contaminación por bacterias se debe trabajar en condiciones de asepsia utilizando materiales estériles y con la ayuda de un mechero. Otra manera de evitar la contaminación es realizar el procedimiento de transferencia bajo una campana de flujo laminar, donde el flujo de aire pasa por filtros y genera un ambiente estéril. También es recomendable utilizar lámparas germicidas de UV antes de realizar el trabajo.

El mantenimiento de los cultivos unialgales en laboratorio depende de factores físicos esenciales como las condiciones de iluminación, temperatura y fotoperiodo. Cuando se tiene un cultivo de cepas la aireación puede convertirse en un vector de contaminación por protozoarios o bacterias, por lo cual no es recomendable. 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).

El propósito de realizar recambios de nutrientes y escalonamiento en volúmenes es retener 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 de los cultivos que se relaciona con la presencia de diferentes estadios de ciclo de vida, por ejemplo teniendo dos cultivos de la misma especie pero uno con células flagelares y otro con células en estado vegetativo. Otras limitaciones son las variaciones en las condiciones de laboratorio, estas pueden conducir a pérdidas de características morfológicas y fisiológicas de las células. Algunos ejemplos de estas modificaciones morfológicas se dan en las diatomeas en la reducción del tamaño de las frústulas (JAWORSKI et al. 1988), 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 (Figura 1). La primera es la fase de adaptación donde 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 donde las cé-

lulas 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 un incremento de células y la población alcanza un equilibrio, es decir que existe un balance entre tasa de natalidad y mortalidad de células. La última fase es la de declive o muerte donde 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, Segwiche y Rafter), por contadores de partículas de membrana o por espectrofotometría.

## METODOLOGÍAS

### TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL DE LABORATORIO Y MEDIOS DE CULTIVO

#### *Preparación de material de vidrio.*

Aplicado a 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: Diluya el detergente neutro (*Extran*) con agua potable y con ayuda de un escobillón o esponja lave el material de vidrio; para el caso de pipetas y tubos de ensayo colóquelos en el lavador ultrasonido por 30 minutos a 60 °C con detergente neutro, enjuague con agua potable hasta eliminar los residuos del detergente, sumerja el material de vidrio en un balde con la solución de HCl al 5%; ya sea vertical u horizontalmente, deje actuar la solución ácida (por varias horas, si es necesario), retire el material de vidrio del HCl y enjuague 10 veces con agua potable hasta tener la seguridad de haber eliminado el total de la solución ácida, realice el último enjuague con agua desionizada. Colóque

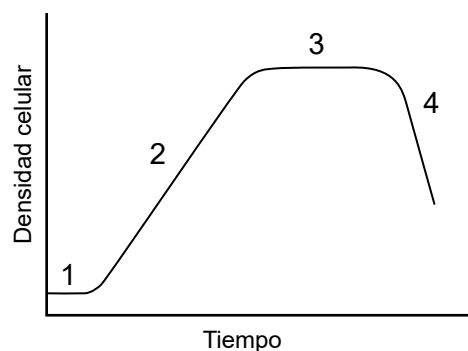


Figura 1. Curva de crecimiento estándar. 1. Fase de adaptación, 2. Fase Exponencial, 3. Fase Estacionaria, 4. Fase de Declive.

Fuente: Fogg y Thake, 1987.

el material limpio en una estufa a 75 °C para su secado, cuando esté seco, cubra la boca del matraz con papel aluminio y luego con papel kraft, sujetando con pabito (Figura 2), esterilizar en autoclave a 15 lb de presión a 120 °C durante 15 minutos (Figura 3) en la opción de secado esterilizado, en caso de que el material se encuentre un poco húmedo llévelo a estufa a secar a 80 °C.

#### *Preparación del material de plástico:*

Aplicado a tubos plásticos, puntas, frascos de plástico, mangueras: Diluya el detergente neutro (*Extran*) con agua potable y con ayuda de un escobillón o esponja, y de ser necesario lave el material de plástico. Enjuague con agua potable hasta eliminar los residuos del detergente. El último enjuague realícelo con agua desionizada. Colóque el material limpio en estufa eléctrica a 75 °C para su secado, en caso de que el material sea resistente a altas temperaturas el esterilizado se realizara en autoclave.

#### *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  $\mu\text{m}$
- Reactivos
- Espátula tipo cuchara

#### *Microalgas marinas:*

Los medios de cultivo se prepararan con agua de mar almacenada en botellas de vidrio de 5 L, en oscuridad por un mes aproximadamente (Figura 4). Diluir el agua de mar a 30 ppm de salinidad (para evitar la cristalización al momento de la esterilización), realizar la purificación mediante un equipo de filtración con filtros de policarbonato de 0.47 y 0.22  $\mu\text{m}$  (Figura 5), enriquecerla en función a los requerimientos de la



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



Figura 3: Esterilizado del material de vidrio.



Figura 4: Almacenar el agua en botella de vidrio en oscuridad.



Figura 5: Equipo de filtración.

especie de microalga a adaptar y cultivar.

*Microalgas de aguas continentales (clorófitas, cianófitas, diatomeas, etc.):*

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** (GUILLARD y RYTHER 1962; GUILLARD 1975 tomado de ANDERSEN 2005) (Tabla 2). Medio de cultivo empleado para microalgas marinas (dinoflagelados, diatomeas, clorófitas, etc.). En un litro de agua de mar filtrada por 0.47 y 0.22  $\mu\text{m}$ , 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 y 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  $\mu\text{m}$ .
- **Medio L1** (GUILLARD y HARGRAVES 1993, tomado de 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 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ , se le agregará 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  $\mu\text{m}$ .
- **Medio de cultivo BG11 modificado** (ALLEN 1968; ALLEN y STANIER 1968; RIPPKA et al. 1979; tomado de ANDERSEN 2005) (Tabla 4). Medio de cultivo empleado para cianófitas. 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** (AIBA y OGAWA 1977; SCHÖSSER 1994; tomado de ANDERSEN 2005) (Tabla 5). Medio de cultivo empleado para cianófitas (*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  $\mu\text{m}$ .

- **Medio Chu (Tabla 6)**. Medio de cultivo empleado para microalgas de agua dulce (dinoflagelados, diatomeas, clorófitas, etc.). 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

Para el caso de lagos, lagunas, océanos:

Equipos y materiales (Figuras 6):

- GPS

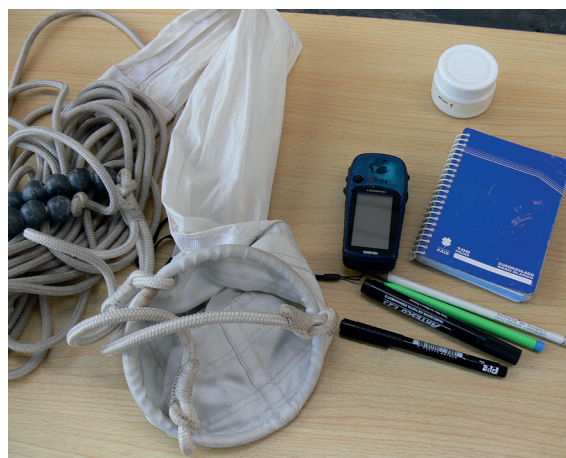


Figura 6: materiales para la colecta.

Tabla 2. Medio F/2 (GUILLARD & RYTHER 1962, GUILLARD 1975 tomado de ANDERSEN 2005)

| Nutrientes      |                                                     | Solución Stock | Cantidad | Concentración medio final |
|-----------------|-----------------------------------------------------|----------------|----------|---------------------------|
| Macronutrientes | NaNO <sub>3</sub>                                   | 75 g/L         | 1 mL     | 8.82*10 <sup>-4</sup> M   |
|                 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O  | 5 g/L          | 1 mL     | 3.62*10 <sup>-5</sup> M   |
| Micronutrientes | FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 3.1500         | 1 mL     |                           |
|                 | Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O              | 4.3600         |          |                           |
|                 | MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                | 0.1800         |          |                           |
|                 | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.0220         |          |                           |
|                 | CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0.0100         |          |                           |
|                 | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0.0100         |          |                           |
|                 | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.0060         |          |                           |
| Vitaminas       | Tiamina HCl (B <sub>1</sub> )                       | 0.0020         | 1 mL     | 2.96*10 <sup>-7</sup> M   |
|                 | Biotina                                             | 0.1            |          | 2.05*10 <sup>-9</sup> M   |
|                 | Cyanocobalamina( B12)                               | 0.001          |          | 3.69*10 <sup>-10</sup> M  |
| Tris            | Tris (Regular con HCL 37% a pH 7.2)                 | 50 g/200 mL    | 2 mL     |                           |

Tabla 3. Medio L1 (GUILLARD AND HARGRAVES 1993, tomado de ANDERSEN 2005).

| Nutrientes      |                                                    | Solución stock | Cantidad | Concentración medio final |
|-----------------|----------------------------------------------------|----------------|----------|---------------------------|
| Macronutrientes | NaNO <sub>3</sub>                                  | 75 g/L         | 1 mL     | 8.82*10 <sup>-4</sup> M   |
|                 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O | 5 g/L          |          | 3.62*10 <sup>-5</sup> M   |
| Micronutrientes | FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O               | 3.1500 g/L     | 1 mL     |                           |
|                 | Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O             | 4.3600 g/L     |          |                           |
|                 | MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O               | 0.1781 g/L     |          |                           |
|                 | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O               | 0.0230 g/L     |          |                           |
|                 | CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O               | 0.0119 g/L     |          |                           |
|                 | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O               | 0.0025 g/L     |          |                           |
|                 | NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O              | 0.0199 g/L     |          |                           |
|                 | H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>                    | 0.00129 g/L    |          |                           |
|                 | NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O               | 0.00263 g/L    |          |                           |
|                 | Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>                    | 0.00184 g/L    |          |                           |
| Vitaminas       | K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>                    | 0.00194 g/L    | 1 mL     |                           |
|                 | Tiamina HCl (B <sub>1</sub> )                      | 0.0020 g/L     |          |                           |
|                 | Biotina                                            | 0.01 g/L       |          |                           |
| Tris            | Cyanocobalamina (Vit B <sub>12</sub> )             | 0.001 g/L      | 1 mL     | 2.96*10 <sup>-7</sup> M   |
|                 |                                                    |                |          | 2.05*10 <sup>-9</sup> M   |
|                 |                                                    |                |          | 3.69*10 <sup>-10</sup> M  |
| Tris            | Tris (Regule con HCl 37% a pH 7.2)                 | 50 g/200 mL    | 2 mL     |                           |

Tabla 4. Medio de cultivo BG11 modificado (ALLEN 1968, ALLEN &amp; STANIER 1968, RIPPKA et al. 1979; tomado de ANDERSEN 2005).

| Nutrientes                  |                                                       | Solución Stock | Cantidad | Concentración medio final |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|----------------|----------|---------------------------|
| Solución de citrato férrico | Ácido Cítrico                                         | 6 g/L          | 1 mL     | 3.12 *10 <sup>-5</sup> M  |
|                             | Citrato de hierro amoniacal                           | 6 g/L          |          | 3.00 *10 <sup>-5</sup> M  |
| Macronutrientes             | NaNO <sub>3</sub>                                     | 1.5 g/L        | 1 mL     | 1.76 *10 <sup>-2</sup> M  |
|                             | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O    | 40 g/L         |          | 1.75 *10 <sup>-4</sup> M  |
|                             | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                  | 75 g/L         |          | 3.04 *10 <sup>-4</sup> M  |
|                             | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                  | 36 g/L         |          | 2.45 *10 <sup>-4</sup> M  |
|                             | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                       | 20 g/L         |          | 1.89 *10 <sup>-4</sup> M  |
|                             | MgNa <sub>2</sub> EDTA·H <sub>2</sub> O               | 1.0 g/L        |          | 2.79 *10 <sup>-6</sup> M  |
| Solución de metales traza   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 2.860 g/L      | 1 mL     | 4.63 *10 <sup>-5</sup> M  |
|                             | MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                  | 1.810 g/L      |          | 9.15 *10 <sup>-6</sup> M  |
|                             | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                  | 0.220 g/L      |          | 7.65 *10 <sup>-7</sup> M  |
|                             | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                  | 0.079 g/L      |          | 3.16 *10 <sup>-7</sup> M  |
|                             | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O   | 0.391 g/L      |          | 1.61 *10 <sup>-6</sup> M  |
|                             | Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.0494 g/L     |          | 1.70 *10 <sup>-7</sup> M  |

Tabla 5. Medio Spirulina modificado (AIBA Y OGAWA 1977, SCHÖSSER 1994; tomado de ANDERSEN 2005).

| Nutrientes                  |                                                       | Solución Stock | Cantidad | Concentración medio final |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|----------------|----------|---------------------------|
| Solución de citrato férrico | Ácido Cítrico                                         | 6 g/L          | 1mL      | 3.12 *10 <sup>-5</sup> M  |
|                             | Citrato de hierro amoniacal                           | 6 g/L          |          | 3.00 *10 <sup>-5</sup> M  |
| Macronutrientes             | NaNO <sub>3</sub>                                     | 1.5 g/L        | 1 mL     | 1.76 *10 <sup>-2</sup> M  |
|                             | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O    | 40 g/L         |          | 1.75 *10 <sup>-4</sup> M  |
|                             | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                  | 75 g/L         |          | 3.04 *10 <sup>-4</sup> M  |
|                             | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                  | 36 g/L         |          | 2.45 *10 <sup>-4</sup> M  |
|                             | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                       | 20 g/L         |          | 1.89 *10 <sup>-4</sup> M  |
|                             | MgNa <sub>2</sub> EDTA·H <sub>2</sub> O               | 1.0 g/L        |          | 2.79 *10 <sup>-6</sup> M  |
| Solución de metales traza   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 2.860 g/L      | 1mL      | 4.63 *10 <sup>-5</sup> M  |
|                             | MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                  | 1.810 g/L      |          | 9.15 *10 <sup>-6</sup> M  |
|                             | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                  | 0.220 g/L      |          | 7.65 *10 <sup>-7</sup> M  |
|                             | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                  | 0.079 g/L      |          | 3.16 *10 <sup>-7</sup> M  |
|                             | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O   | 0.391 g/L      |          | 1.61 *10 <sup>-6</sup> M  |
|                             | Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.0494 g/L     |          | 1.70 *10 <sup>-7</sup> M  |

Tabla 6. Medio Chu.

| Nutrientes                  |                                                        | Solución Stock | Cantidad | Concentración medio final |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------|----------------|----------|---------------------------|
| Solución de citrato férrico | Ácido Cítrico                                          | 6 g/L          | 1mL      | $3.12 \cdot 10^{-5}$ M    |
|                             | Citrato de fierro amoniacal                            | 6 g/L          |          | $3.00 \cdot 10^{-5}$ M    |
| Macronutrientes             | NaNO <sub>3</sub>                                      | 1.5 g/L        | 1 mL     | $1.76 \cdot 10^{-2}$ M    |
|                             | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O     | 40 g/L         |          | $1.75 \cdot 10^{-4}$ M    |
|                             | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                   | 75 g/L         |          | $3.04 \cdot 10^{-4}$ M    |
|                             | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                   | 36 g/L         |          | $2.45 \cdot 10^{-4}$ M    |
|                             | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                        | 20 g/L         |          | $1.89 \cdot 10^{-4}$ M    |
|                             | MgNa <sub>2</sub> EDTA·H <sub>2</sub> O                | 1.0 g/L        |          | $2.79 \cdot 10^{-6}$ M    |
| Solución de metales traza   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 2.860 g/L      | 1mL      | $4.63 \cdot 10^{-5}$ M    |
|                             | MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O                  | 1.810 g/L      |          | $9.15 \cdot 10^{-6}$ M    |
|                             | ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                  | 0.220 g/L      |          | $7.65 \cdot 10^{-7}$ M    |
|                             | CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                  | 0.079 g/L      |          | $3.16 \cdot 10^{-7}$ M    |
|                             | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O   | 0.391 g/L      |          | $1.61 \cdot 10^{-6}$ M    |
|                             | Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.0494 g/L     |          | $1.70 \cdot 10^{-7}$ M    |

- 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 los 10 m de profundidad hasta la superficie (Figuras 7).

Colocar la muestra de agua proveniente del vaso colector en un frasco de 0.1 L (Figura 8), previamente rotulado con datos del lugar (coordenadas) y fecha, tomar dos muestras por punto, la primera será fijada en formol (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 de las 24 horas.

*Observaciones:* En cuanto a muestreo de dinoflagelados, no concentrar demasiado la muestra y tomar otra muestra directamente con una botella para evitar maltratarlos con la red.

*Para el caso de cuerpos de agua pequeños de baja profundidad (charcos, riachuelos):*

*Equipos y materiales:*

- GPS
- Multiparámetros
- Frascos de muestreo
- Red de fitoplancton cónica de 20 µm
- Caja de frío
- Cámara fotográfica

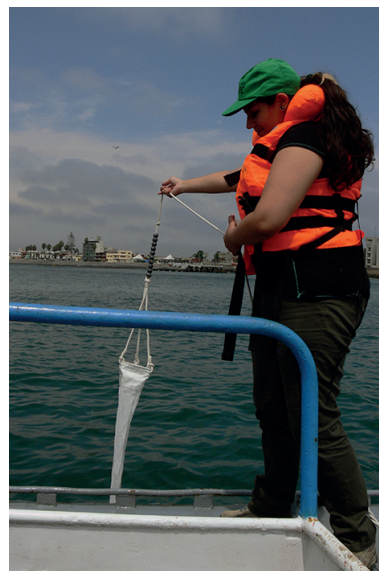


Figura 7: Lance vertical de la red de fitoplancton.



Figura 8: Malla con colector.



Figura 9: Toma de la muestra directamente con un frasco.



Figura 10: Medición de parámetros físico químicos del medio.

- Libreta de notas
- Marcadores

**Procedimiento:** Para cuerpos de agua de poca profundidad colectar las muestras de agua directamente con un frasco de muestreo (Figura 9) y registrar los parámetros físicoquímicos del lugar en una libreta de notas (Figura 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 en cultivo, se tomará en consideración los datos de campo como salinidad, temperatura, pH, amonio, fosfatos, nitritos, etc. estos datos 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 la técnica empleada es la del aislamiento celular con micropipeta el cual se describirá a continuación:

#### *Aislamiento de una célula con micropipetas*

##### *Equipos y materiales:*

- 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 colectadas de fitoplancton vivo usando un microscopio compuesto, separar un poco de la muestra en un Beaker estéril (Figura 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 un diámetro de entrada de un tamaño ligeramente superior a una célula de 20  $\mu\text{m}$ .

Preparar un portaobjeto estéril con una gota de la muestra proveniente de la colecta (Figura 12-14), en el microscopio compuesto (invertido) capturar con la micropipeta una célula, colonia o cadena de una especie de microalgas, trasladar la microalga capturada a otro cubre objetos 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, finalmente las células aisladas se colocan en tubos



Figura 11: Muestra Madre.



Figura 12: Muestra madre en un porta objetos.

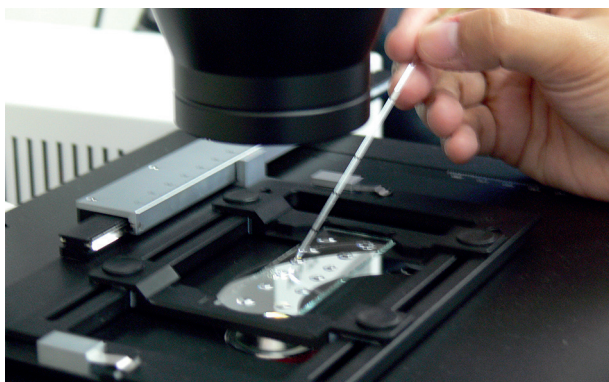


Figura 13: Captura de célula con micropipeta.



Figura 14: Lavado celular con medio estéril.

de ensayos y/o matraces de 50 mL con 10 mL con medio de cultivo (el medio seleccionado estará en función a la microalga), incubar en una cámara bio-climática a 15 °C, con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, y una irradiancia de 60 a 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . 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

#### Equipos y materiales:

- 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

**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



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

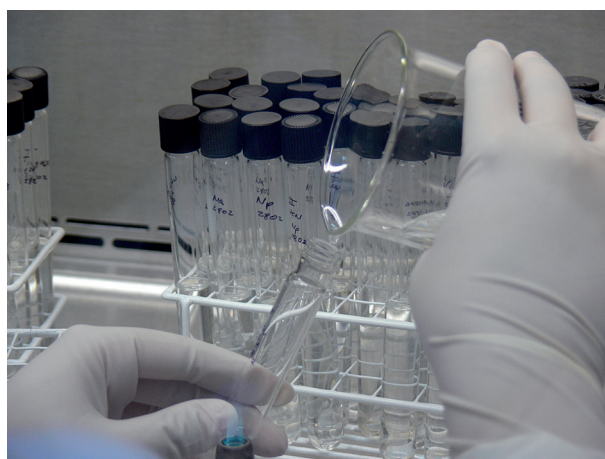


Figura 16: Tubos de cultivo con medio estéril.

por cepa con el código y fecha, (Figura 15) para luego dispensar el medio de cultivo estéril (Figura 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



Figura 17: Toma de inóculo de cepa de microalga.



Figura 18: Transferencia del inóculo.



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

estéril (Figura 17) y trasvasar en un tubo o matraz con medio de cultivo estéril (Figura 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 (Figura 19).

*Conservación de las cepas de microalgas en agar enriquecido*

*Equipos y materiales:*

- 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.

*Procedimiento:* Las cepas en agar se recambiarán cada 6 meses, los inóculos se seleccionarán a partir de medio líquido o placas de cepas anteriormente preparadas y se realizará bajo microscopio invertido y estereoscopio para observar la presencia de hongos y bacterias.

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 dispensar las placas Petri estériles (Figura 20) dentro de la cámara de flujo laminar. Dejar enfriar hasta la solidificación con la luz UV encendida por aproximadamente 15 minutos (Figura 21), cerrar las placas e invertirlas para evitar la formación de vapor en su

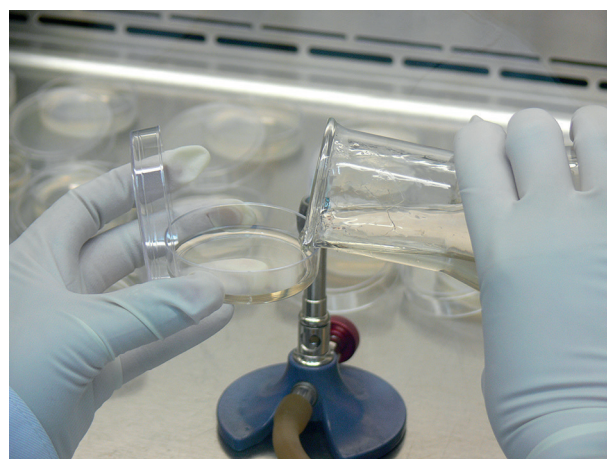


Figura 20: Dispensar el agar en placas de Petri.

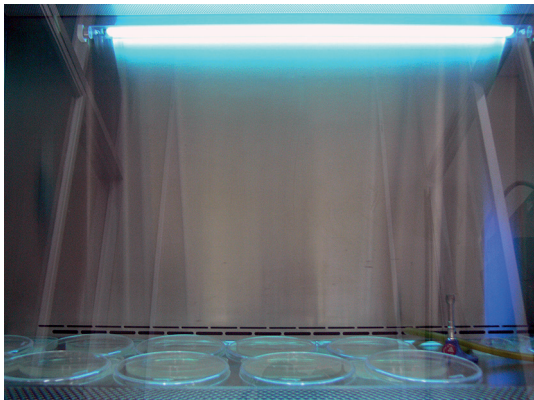


Figura 21: Placas en cámara de flujo laminar con luz ultravioleta.

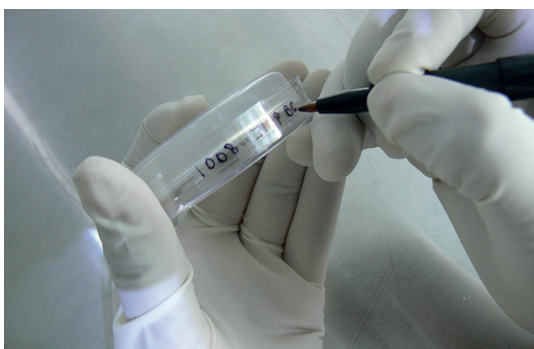


Figura 22: Rotular las placas con el código de la cepa y la fecha.

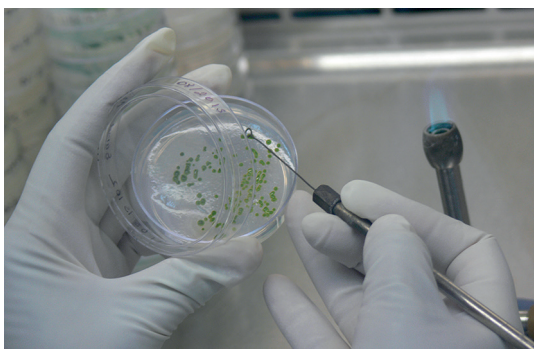


Figura 23: Colonia de microalga libre de bacterias.

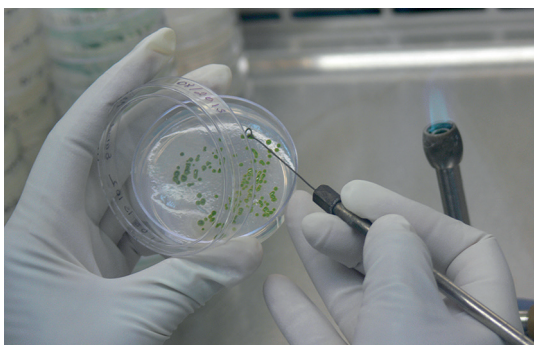


Figura 24: Sembrado por estrías en la placa de agar.

interior, rotular cada placa con código de la cepa y fecha (Figura 22).

- A. Inóculo proveniente de medio líquido: Con ayuda de una micropipeta estéril se tomará un poco de inóculo de la cepa en tubo seleccionada 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.
- B. Inóculo proveniente de medio sólido: Tomar con la ayuda del asa de siembra (previamente esterilizada) una colonia de la placa seleccionada como inóculo (Figura 23), colocar la colonia de microalga sobre el agar en la placa rotulada, sembrar con la técnica del rayado por estrías (Figura 24).

Terminado el proceso de siembra de inóculo en las placas con agar enriquecido colocarlas en la cámara climática para su crecimiento (Figura 25).

#### MÉTODO PARA EL ANÁLISIS EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El estudio taxonómico a nivel morfológico debe realizarse de la muestra original y en las etapas sucesivas de la obtención 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 pro-



Figura 25: Placas de agar en cámara climática a 14 °C.

porciona imágenes tridimensionales de ultraestructuras importantes para su 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 un 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 microscopía electrónica 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 por medio de distintas metodologías (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 polycarbonato de 0.22 µm.

## AGRADECIMIENTOS

El presente manual se produce dentro del Programa de Presupuesto por Resultados PP0094: Ordenamiento y Desarrollo de la Acuicultura por el apoyo económico otorgado para la edición de este manual.

## REFERENCIAS

- ABALDE J, CID A, FIDALGO JP, 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 ME, OLIVEIRA EC, SAR EA (Editores). 1995. Manual de métodos ficológicos. Concepción, Chile: Universidad de Concepción. 863 p.
- ANDERSEN RA. 2005. Algas Culturing Techniques. Phycolological Society of America, Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra. Pg. 84- 98.
- BERGES JA, FRANKLIN DJ, HARRISON PJ. 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 micoalgal bitechnology. Cambridge University Press. UK. pp 27.
- BURLEW JS. 1953. Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnagie Institution of Washington, Washington, D.C. No. 600.
- CAÑIZARES VR. O, CASAS, C., DOMINGUEZ, B., VOLTOLINA, D. 1994. Las microalgas en la acuicultura. Cuadernos sobre Biotecnología. CINVESTAC-IPN. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Mexico. Pp. 44.
- COLL J. 1991. Acuicultura marina animal, 3a edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 671 p.
- CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL EBRO.2015. Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la directiva marco del agua en la Confederación hidrográfica del Ebro. Protocolos de muestreo y el análisis para Fitoplancton Confederación Hidrográfica del Ebro. Zaragoza. 35-46.
- CONTRERAS-FLORES C, PEÑA-CASTRO JM, FLORES-COTERA LB. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores 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 JA, RODRIGUEZ H, MORENO J, VARGAS MA, 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 MG. 2007. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology and Bioengineering 74: 397-402.
- FERNÁNDEZ JM. 2014. Microalgal Biotechnology. Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. Universidad de Almería. Sep. 1.3.
- Ferrario M, Sar E. & Salas S. 1995. Metodología básica para el estudio de Fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC, Sar E. (Ed.). Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción (1995): 10-16.
- FOGG GE, THAKE B. 1987. Algae Cultures and Phytoplankton Ecology The University of Wisconsin Press Third Edition EU A. pp 126.
- 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, pp 276-286.
- GONZALEZ 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 RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: WL Smith MH Chanley (eds.). Culture of marine invertebrates animals. Plenum Publishing Corp. New York., pp.29-60.
- Guillard RRL & Morton SL. 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 UA pp 162.
- 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 DAE, RICHMOND D, ARONSON S. 1986. Algal nutrition. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press. Inc. E.U.A. pp 147-198.
- KOMMAREDDY AR, ANDERSON GA. 2003. Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR). ASAE Paper No. 034057. ASAE, St. Joseph, Michigan.
- Lavens P, Sorgeloos P. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Rome, FAO. 295 pp.
- MARTIN FPH. 2010. Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore.
- MYERS J. 1976. The Biology of the algae: a brief summary. Universidad de Texa, Cargegie Institution of Washington. Algal Culture from Laboratory to pilot plant. Pp. 31 – 36.
- PANIAGUA J, BÜCKL LF, GRANADOS C, LOYA D. 1986. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe especial OC-86-01. CICESE. Ensenada. BC. Mexico. 7-11.
- PARDO I, GARCÍA L, DELGADO C, COSTAS N, ABRAIN R. 2010. Protocolos de muestreo de comunidades biológicas acuáticas fluviales en el ámbito de las confederaciones hidrográficas del Miño-Sil y Cantabrico. Convenio entre la Universidad de Vigo y las confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantabrico. 68pp. NiPO 783-10-001-8.
- 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. E.U.A. U. S. A. pp 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 flujo 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.
- SE-KWON KIM (Eds). 2015. Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances. Elsevier Ltd.
- SCOTT SA, DAVEY MP, DENNIS JS, HORST I, HOWE CJ, LEA-SMITH DJ, SMITH AG. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotechnology 21:277-286.
- SPOTTE SH. 1979. Seawater aquariums: the captive environment. Wiley – Interscience. E.U.A. U.S.A. pp 413.
- STEIN JR. 1973. (Ed.). Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press. 448 p.
- STEINBRENNER J, LINDEN H. 2001. Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Physiol. 125:810-817.
- TORRENTERA L, TACON A. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Una diagnosis. FAO-Italia.; GCP/RLA/075/ITA (Fecha de acceso, 1 de Marzo 2016) URL: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm#chII>
- VAN DEN HOEK C, MANN DG, JAHNS HM. 1995. Algae, An introduction to phycology. Press syndicate of the University of Cambridge. Pg. 152 -159.
- VARELA R. 1988. Cultivo de microalgas, historia y aplicaciones. Natura, 83: 8-10.
- VOSKRESENSKAYA N. 1972. Blue light and carbon metabolism. Annual Rev Plant Physiol 23: 219-234.
- WARREN A, DAY JG, 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., pp 7-83.
- WIEDEMAN VE, WALNE PL, TRAINOR YFR. 1964. A new technique for obtaining axenic cultures of algae. Can. J. of Bot., 42: 958-959.