

# ACTUALIZACIÓN DEL MANUAL PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS MICROALGALES

## UPDATE OF THE MANUAL FOR OBTAINING MICROALGAE STRAINS

Cecil Tenorio  
Marco A. Aguirre O.

Hanna E. Hernández A.  
Carla P. Aguilar S.

### RESUMEN

TENORIO, C., HERNÁNDEZ, H., AGUIRRE, M. y AGUILAR, C. (2023). *Actualización del Manual para obtención de cepas de microalgas*. *Inf Inst Mar Perú*, 50(1), 68-82.- Este manual es un producto del Programa Presupuestal PpR 0094: Ordenamiento y Desarrollo de la acuicultura, su actualización tiene como finalidad 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 continentales. El manual también presenta aspectos generales sobre la adaptación de las células a condiciones de laboratorio y su mantenimiento.

PALABRAS CLAVE: acuicultura; cepas; cultivo axénico; microalgas

### ABSTRACT

TENORIO, C., HERNÁNDEZ, H., AGUIRRE, M., and AGUILAR, C. (2023). *Update of the Manual for obtaining microalgae strains*. *Inf Inst Mar Perú*, 50(1), 68-82.- This manual provides updated laboratory methodologies for obtaining and maintaining microalgae strains in the Germplasm Bank of Aquatic Organisms at the *Instituto del Mar del Perú*, as part of the Budget Program PpR 0094: Aquaculture Planning and Development. The manual includes detailed procedures for preparing culture media and obtaining marine and continental microalgae strains, including recommendations for axenic cultures. Likewise, the manual covers important considerations for adapting microalgae cells to laboratory conditions and their subsequent maintenance.

KEYWORDS: aquaculture; strains; axenic cultivation; microalgae

## 1. INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con alrededor de 12 000 cuerpos de agua entre lagos, lagunas y cochas (ANA, 2011) y con un litoral marino de 3 080 km de alta productividad primaria. Los cuerpos de agua continentales se distribuyen entre 0 y 5 000 msnm, proporcionando hábitat de diversas condiciones medioambientales para las microalgas. Muchos de los cuerpos de agua continentales muestran características oligotróficas y aún no exhiben un impacto antrópico significativo, mientras que otros presentan características eutróficas debido principalmente al impacto humano (acuicultura, turismo, desechos urbanos), los cuales modifican el ambiente y como consecuencia son principales causas de pérdida de biodiversidad afectando también a las microalgas.

Las microalgas poseen muchas ventajas y potencialidades, como por ejemplo rápido crecimiento, el cual puede escalonarse de manera efectiva para llegar a grandes volúmenes. Estos microorganismos son utilizados para distintos fines, como producción de proteínas o piensos, productos fertilizantes, productos farmacéuticos, suplementos dietéticos, industria cosmética, biocombustibles y como alimento en la acuicultura (CRESWELL, 2010).

Son consideradas un recurso importante en el mundo debido a 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; SCOTT *et al.*, 2010).

En la acuicultura, las microalgas son empleadas como alimento para el crecimiento y desarrollo de diversas etapas larvales de otros organismos acuáticos cultivados (ABALDE *et al.*, 1995). Estas deben tener características específicas como no presentar toxinas dañinas para los organismos a alimentar, tamaño pequeño, pared celular digerible y composición bioquímica adecuada para la óptima nutrición de los organismos cultivables. Existen otras características ligadas a la fisiología de la especie como resistencia a la 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 (monoespecífico) logrado a partir del aislamiento de una unidad algal en condiciones de higiene. La obtención de este cultivo se inicia desde el muestreo hasta la propagación a mayores volúmenes, manteniendo 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. La actualización de este manual presenta las pautas y pasos a seguir para la obtención de cepas microalgales.

### Generalidades

Las microalgas pueden ser unicelulares, filamentosas, formadoras de colonias cenobiales y 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.

En su mayoría son 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 continentales y muchas de ellas pueden adaptarse a ambos hábitats. Se encuentran ampliamente distribuidas por todos los ambientes acuáticos del planeta; por ello, existen muy pocas especies de microalgas a las que se les considera endémicas.

En el mar, las microalgas forman parte del plancton, algunas son bentónicas y otras se encuentran en toda la columna de agua. Muchas habitan en ambientes extremos como nieve o hielo, salares, suelo y hasta roca volcánica adaptándose a la poca incidencia de luz, escasos nutrientes, efectos de corrientes, sedimentación y depredadores.

Estos organismos son importantes productores primarios de biomoléculas mediante la fotosíntesis, utilizan energía luminosa y la transforman en energía química. Algunos son fotoautótrofos obligados (GLADUE, 1991), no obstante, otros son solamente heterótrofos y no requieren energía luminosa ya que asimilan la energía a partir de compuestos orgánicos disueltos. Otras especies son mixotróficas y utilizan energía luminosa para dividirse y depredan otras microalgas, como el caso de algunos dinoflagelados (HOFF & SNELL, 2001; HANSEN & TILMANN, 2020; JEONG *et al.*, 2021). 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 y 5 (LAVENS & SORGELOOS, 1996).

### Condiciones de cultivo

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

El crecimiento y mantenimiento de las células en un cultivo microalgal depende de la asimilación de los compuestos nutricionales y minerales que se encuentran en el medio. Los nutrientes necesarios para la formulación de medios de cultivo se clasifican en dos grupos: macro y micronutrientes. Los macronutrientes, son utilizados en la formación y mantenimiento de las células, conformados por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio. Los micronutrientes son utilizados en menor concentración como catalizadores en funciones reguladoras osmóticas, representados por hierro, manganeso, zinc, molibdeno, vanadio, bario, cloro, cobalto, calcio, sílice y sodio (GUILLARD, 1975). Los requerimientos de las microalgas en cultivo dependerán de la especie, sin embargo, es posible utilizar medios de cultivo genéricos para grupos taxonómicos.

También, es necesario añadir al medio de cultivo vitaminas esenciales para el metabolismo de las microalgas. Las vitaminas tiamina (B1), cianocobalamina (B12) y biotina (B6) son consideradas esenciales para la mayoría de microalgas, se estima que toda microalga planctónica requiere cianocobalamina para su óptimo crecimiento (SPOTTE, 1979). Sin embargo, 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.*, 2017).

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, es importante considerar el manejo de luz, irradiación, distribución espectral y fotoperiodo. La irradiancia, por ejemplo, es de 10 a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{seg}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  (1 a 2 % de luz solar completa) para microalgas mantenidas en laboratorio (GUILLARD & MORTON, 2003).

Elevados niveles de intensidad lumínica, permiten que las microalgas generen mayor proporción de pigmentos y lípidos, esta respuesta está relacionada a la protección de las células (SANCHEZ-SAAVEDRA Y VOLTOLINA, 2002).

En cultivos donde existe muy poca concentración celular, se debe mantener baja intensidad lumínica debido a que las microalgas pueden disminuir en su crecimiento poblacional por fotoinhibición al dañar el fotosistema II. Los cultivos donde existe mayor densidad celular son capaces de utilizar la luz incidente con mayor eficacia debido a que 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).

Es importante considerar el fotoperiodo en función al tipo de microalga. Un régimen inadecuado de éste puede generar, en algunas especies, formación de quistes, o muerte de células por exposición a iluminación continua. Los fotoperiodos de luz: oscuridad, más empleados varían entre 12: 12 y 16: 8 horas (LORENZ *et al.*, 2005)

La temperatura, en el ámbito de adaptación a cultivo, debe ser cercana a la del medio natural de

donde fue extraída la microalga, al menos hasta que se adapte a la programada en el laboratorio. Así mismo, es importante reconocer si las fuentes de luz, en el laboratorio, pueden influir en la temperatura ya programada, en la disociación de moléculas de carbono para que puedan estar a disponibilidad de las células al momento de realizar la fotosíntesis y sea directamente proporcional a la tasa de respiración celular (KOMMAREDDY & ANDERSON, 2003).

Las especies tropicales presentan un rango de tolerancia de 16 a 27 °C; en valores menores de este intervalo el crecimiento disminuye mientras que, a temperaturas mayores el cultivo sufriría un colapso (HOFF & 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 un aumento en la producción de astaxantina y luteína (DEL CAMPO *et al.*, 2004) y también se asocia a cambios morfológicos en algunas clorofitas 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. Sin embargo, esto puede variar con microalgas que provienen de estuarios y ambientes salobres (HARRISON & BERGUES, 2005).

El pH es otro factor importante en los cultivos, las variaciones en relación al valor óptimo influirán en el crecimiento celular y en los procesos metabólicos (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988).

Este factor está influenciado por la productividad algal, respiración celular, alcalinidad del medio, composición iónica del medio de cultivo, actividad microbiana y concentración de CO<sub>2</sub>. En ciertos niveles alcalinos, se compromete la disponibilidad de CO<sub>2</sub> llegando a ser limitante para el crecimiento y fotosíntesis. Muchos autores coinciden que el rango óptimo para microalgas es de 7 a 9 (DEL RÍO *et al.*, 2007; MARTIN, 2010).

#### **Aislamiento unialgal y cultivo a partir de 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 enriquecida para mantener el balance de nutrientes y garantizar la asepsia del cultivo. Este equilibrio de nutrientes consiste en adicionar los principales nutrientes inorgánicos como  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ , silicatos, metales trazas, quelados y vitaminas (BERGES *et al.*, 2001).

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

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

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

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

por filtros. También es recomendable utilizar lámparas germicidas de UV antes de realizar el trabajo.

El cultivo de cepas no requiere aireación debido al reducido volumen de siembra o mantenimiento y para evitar posible contaminación. El propósito de realizar recambios de nutrientes y escalonamiento en volúmenes es mantener una población fisiológica, morfológica, y genéticamente saludable.

Existen ciertos aspectos que se deben tener en cuenta en el mantenimiento de cepas microalgales como; la presencia de diferentes estadios de ciclo de vida en cultivos viables y disponibles. Cultivos de respaldo en medio líquido, semisólido y/o sólido, análisis microbiológicos periódicos, registros fotográficos en los diferentes medios de mantenimiento.

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

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

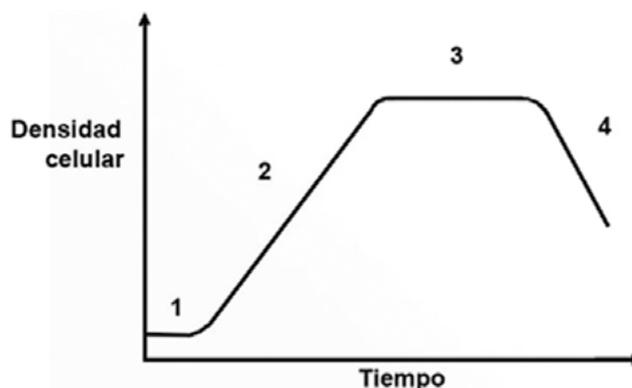


Figura 1.- Curva de crecimiento estándar. 1. Fase de adaptación, 2. Fase exponencial, 3. Fase estacionaria, 4. Fase de declive. (Fuente: FOGG & THAKE, 1987)

La primera es la fase de adaptación, cuando el cultivo comienza su crecimiento, muchas veces esta etapa presenta una caída leve por la adaptación de la microalga a un nuevo medio. La segunda es la fase exponencial cuando las células se encuentran adaptadas al medio de cultivo y empieza una división celular más rápida acercándose a una forma de crecimiento que duplica o triplica el número de éstas. La tercera es la fase estacionaria donde ya no se observa incremento del número de células y la población alcanza un equilibrio, es decir que existe balance entre tasa de natalidad y mortalidad de células. La cuarta y última fase es el declive o muerte cuando el cultivo empieza a decaer en número de células. El tiempo que duran las fases depende de la especie de microalga, las condiciones de cultivo dadas y el suministro de nutrientes o dióxido de carbono (FOGG & THAKE, 1987).

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

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

### Preparación del material de vidrio

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

**Lavado:** Diluya detergente neutro (Extran) con agua potable y con ayuda de escobillas o esponjas lave el material, enjuague con agua potable hasta eliminar los residuos del detergente, sumérjalo en un balde con la solución de HCl al 5 %; ya sea vertical u horizontalmente, deje actuar la solución ácida (por al menos 24 horas o hasta eliminar las sales adheridas al material de vidrio), retire el material del HCl y enjuague 10 veces con agua potable hasta tener la seguridad de haber eliminado el total de la solución ácida de toda la superficie de vidrio, realice el último enjuague con agua desionizada o destilada.

Para el material volumétrico como; pipetas y tubos de ensayo, coloque en el lavador ultra-

sonido por 30 minutos a 60 °C y siga el procedimiento anteriormente descrito. Coloque el material limpio en una estufa a 75 °C para el secado. Cuando esté seco, cubra la boca del material de vidrio con papel aluminio y luego con papel Kraft, sujetando con pabilo (Fig. 2). Esterilice en autoclave a 15 lb de presión a 120 °C durante 20 minutos (Fig. 3), en la opción de secado esterilizado, en caso que el material se encuentre húmedo seque en estufa a 80 °C.

### Preparación del material de plástico

El material de plástico está conformado por tubos, puntas, frascos, mangueras, tapas y tapones. Diluya detergente neutro (Extran) con agua potable y con ayuda de escobillas o esponjas, lavar todo el material. Enjuague con agua potable hasta eliminar los residuos del



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



Figura 3.- Esterilizado del material de vidrio

detergente. El último enjuague realizarlo con agua desionizada. Coloque el material limpio en estufa eléctrica a 75 °C para secar. En caso que el material sea resistente a altas temperaturas, el esterilizado se realizará en autoclave.

### 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 (para análisis químico).

### 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 0,1, 0,5, 1 y 5 L
- Filtros de policarbonato de 0,22 y 0,47  $\mu\text{m}$
- Reactivos
- Espátula tipo cuchara
- Guantes de nitrilo
- Mandil de laboratorio

### Microalgas marinas

Los medios de cultivo se preparan con agua de mar, almacenada en botellas de vidrio de 5 L, que haya estado sometida a oscuridad por un mes, aproximadamente (Fig. 4). El agua de mar, como primer proceso de purificación, debe pasar por una batería de filtros de policarbonato de 0,47 y 0,22  $\mu\text{m}$  (Fig. 5), posteriormente agregue los nutrientes en función a los requerimientos de la especie de microalga a adaptar y cultivar. En algunos casos puede diluirse el agua de mar para evitar la precipitación durante la esterilización, esta dependerá de la concentración en el medio natural y la temperatura a la cual será sometida el agua (HARRISON & BERGUES, 2005).

### Microalgas de aguas continentales

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



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



Figura 5.- Equipo de filtración

## MEDIOS DE CULTIVO

### Medio F/2 (GUILLARD & RYTHER, 1962; GUILLARD, 1975)

Medio de cultivo empleado para microalgas marinas (Chlorophyta, Bacillariophyta, Haptophyta y Ochrophyta). Agregue en un litro de agua de mar filtrada a 0,47 y 0,22  $\mu\text{m}$  los componentes. En caso que la microalga lo requiera, agregue la solución de silicatos (diatomeas). Esterilice a 121 °C por 20 minutos, una vez frío el medio de cultivo agregue 1 mL de la solución de vitaminas con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Vitaminas: disuelva la tiamina, y agregue 1 mL de las otras soluciones stock, luego enrase a 1L de volumen.

Medio F/2 (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975)

Componentes	Solución Stock g/L	Cantidad (mL)	Concentración final (M)
NaNO <sub>3</sub>	75	1	8,82x10 <sup>-4</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5	1	3,62x10 <sup>-5</sup>
Sol. Metales trazas		1	1,06x10 <sup>-4</sup>
Sol vitaminas		1	-
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O (*)	30	1	-

(\*) Solo para diatomeas

Medio F/2: solución metales trazas

Componentes	Solución Stock(g/L)	Cantidad	Concentración final (M)
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	3,15 g	1,17 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	-	4,36 g	1,17 x 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180	1 mL	9,10 x 10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22	1 mL	7,65 x 10 <sup>-8</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10	1 mL	4,2 x 10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9,8	1 mL	3,93 x 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6,3	1 mL	2,6 x 10 <sup>-8</sup>

Medio F/2: solución de vitaminas

Componentes	Solución Stock (g/L)	Cantidad	Concentración final (M)
Tiamina HCl (B <sub>1</sub> )	-	100 mg	2,96x10 <sup>-7</sup>
Biotina	0,5	1 mL	2,05x10 <sup>-9</sup>
Cianocobalamina (Vit B12)	0,5	1 mL	3,69x10 <sup>-10</sup>

**Medio L1 (GUILLARD & HARGRAVES, 1993)**

Medio de cultivo para microalgas marinas (dinoflagelados y diatomeas). Agregue los componentes en 1 L de agua de mar filtrada a 0,47 y 0,22 µm. En caso de que la microalga lo requiera, agregue la solución de silicatos. Esterilice a 121 °C por 20 minutos, una vez frío el medio de cultivo agregue 1 mL de la solución de vitaminas con un filtro de jeringa de 0,22 µm.

Medio L1 (Guillard & Hargraves, 1993)

Componentes	Solución Stock g/L	Cantidad (mL)	Concentración final (M)
NaNO <sub>3</sub>	75	1	8,82x10 <sup>-4</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5	1	3,62x10 <sup>-5</sup>
Sol. Metales trazas		1	1,06x10 <sup>-4</sup>
Sol. vitaminas		1	-
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O (*)	30	1	-

(\*) Solo para diatomeas

Medio L1: solución de metales trazas

Componentes	Solución Stock	Cantidad	Concentración final (M)
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	13,15g	1,17 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	-	4,36g	1,17 x 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	178,1	1 mL	9,09x10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	23,0	1 mL	8,0x10 <sup>-8</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	11,9	1 mL	5,0x10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,5	1 mL	1,0x10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	19,9	1 mL	8,22x10 <sup>-8</sup>
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1,29	1 mL	1,0x10 <sup>-8</sup>
NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,63	1 mL	1,0x10 <sup>-8</sup>
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1,84	1 mL	1,0x10 <sup>-8</sup>
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	1,94	1 mL	1,0x10 <sup>-8</sup>

Medio L1: solución de vitaminas

Componentes	Solución Stock(g/L)	Cantidad	Concentración final (M)
Tiamina HCl (B <sub>1</sub> )	-	100 mg	2,96x10 <sup>-7</sup>
Biotina	0,5	1 mL	2,05x10 <sup>-9</sup>
Cianocobalamina (Vit B12)	0,5	1 mL	3,69x10 <sup>-10</sup>

**Medio de cultivo BG11 modificado (ANDERSEN, 2005)**

Medio de cultivo empleado para cianobacterias. Prepare la solución de citrato férrico en un volumen de 1 L (disolver el citrato y el citrato férrico) y añada 1 mL de esta solución a 900 mL de agua destilada donde se prepara la solución BG11.

Medio BG11 modificado (Andersen, 2005)

Componentes	Solución Stock(g/L)	Cantidad	Concentración final (M)
NaNO <sub>3</sub>			1,76 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	-	1,5 g	1,75 x 10 <sup>-4</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	40	1 mL	3,04 x 10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	75	1 mL	2,45 x 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	36	1 mL	1,89 x 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA.H <sub>2</sub> O	20	1 mL	2,79 x 10 <sup>-6</sup>
Sol. Metales traza		1 mL	
Sol. Citr. férrico		1 mL	

Solución BG11: solución de citrato férrico

Componentes	Solución Stock(g/L)	Concentración final (M)
Ácido cítrico	6	3,12 x 10 <sup>-5</sup>
Citrato de amonio férrico	6	3 x 10 <sup>-5</sup>

Solución BG11: solución de metales traza		
Compuestos	Cantidad (g)	Concentración final (M)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	4,63 x 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,81	9,15 x 10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,22	7,65 x 10 <sup>-7</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,079	3,16 x 10 <sup>-7</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,391	1,61 x 10 <sup>-6</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,049	1,7 x 10 <sup>-7</sup>

Solución de metales trazas: en 900 mL de agua destilada agregue los compuestos, disuelva y enrase a volumen de 1 L.

### Medio *Spirulina* modificado (ANDERSEN, 2005)

Medio de cultivo empleado para cianofitas (*Arthrospira platensis*). Prepare en agua destilada, la solución de stock A en 500 mL y solución stock B en 500 mL. Agregue 1 mL de solución de metales traza. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos, una vez frío junte la solución A y B, luego agregue 1 mL de la solución de vitamina con un filtro de jeringa de 0,22 µm.

Medio *Spirulina* modificado (Andersen, 2005): solución A (500 mL)

Compuestos	Solución Stock(g)	Concentración final (M)
NaHCO <sub>3</sub>	13,61	1,62 x 10 <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,03	3,80 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	2,87 x 10 <sup>-3</sup>

Medio *Spirulina* modificado (Andersen, 2005): solución B (500 mL)

Compuestos	Solución Stock(g)	Concentración final (M)
NaNO <sub>3</sub>	2,5	2,94 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	5,74 x 10 <sup>-3</sup>
NaCl	1,0	1,71 x 10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	8,11 x 10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,04	2,72 x 10 <sup>-4</sup>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01	3,60 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0,08	

Solución de metales trazas: disuelva en 900 mL de agua destilada Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O (0,8 g) y FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,7g) y agregue los otros componentes.

Medio *Spirulina* modificado (Andersen, 2005): solución de metales traza

Compuestos	Solución Stock (g/L)	Cantidad	Concentración final (M)
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	-	0,8g	2,15 x 10 <sup>-6</sup>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	0,7g	2,52 x 10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	1 mL	3,48 x 10 <sup>-9</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2	1 mL	8,97 x 10 <sup>-9</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	1 mL	1,62 x 10 <sup>-7</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1	1 mL	3,44 x 10 <sup>-9</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1	1 mL	4,13 x 10 <sup>-9</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,005	1 mL	2,00 x 10 <sup>-11</sup>

Solución de vitaminas: disuelva la cianocobalamina en 1L de agua destilada

Medio *Spirulina* modificado (Andersen, 2005): solución de vitaminas

Compuestos	Cantidad (g/L)	Concentración final (M)
Cianocobalamina (Vit. B12)	0,005	3,69x10 <sup>-9</sup>

### Medio Chu modificado

Medio de cultivo empleado para microalgas de agua dulce (Chlorophyta, Bacillariophyta, Haptophyta y Ochrophyta) en 1 L 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.

Medio Chu modificado

Compuestos	Solución Stock (g/L)	Cantidad empleada (mL/L)	Concentración final (M)
NaNO <sub>3</sub>	85	1	1 x 10 <sup>-3</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36,7	1	2,5 x 10 <sup>-4</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	36,9	1	1,5 x 10 <sup>-4</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	12,6	1	1,5 x 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	28,4	1	1 x 10 <sup>-4</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,7	1	5 x 10 <sup>-5</sup>

Medio Chu modificado: solución de metales traza

Compuestos	Solución Stock (g/L)	Concentración final (M)
Na <sub>2</sub> EDTA	0,05	0,13 x 10 <sup>-4</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,618	10 x 10 <sup>-4</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0196	0,08x 10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,044	0,15 x 10 <sup>-4</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02	0,084 x 10 <sup>-4</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0126	0,061 x 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0126	0,052 x 10 <sup>-4</sup>

Medio Chu modificado: Solución citrato férrico

Compuestos	Solución Stock (g/100L)	Cantidad (mL/L)	Concentración final (M)
Ácido Cítrico	3,35	1	0,15
Citrato de hierro amoniacal	3,35	1	0,15

**Toma de muestras para la obtención de cepas (lagos, lagunas, océanos)**

**Equipos y materiales (Fig. 6)**

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

**Procedimiento:** utilizar una red de fitoplancton cuya abertura de malla dependerá del tamaño de microalgas que se espera coleccionar (10, 20, 60, 75 µm), la cual es acoplada a un vaso colector de un volumen determinado (200 o 250 mL), realice tres lances verticales desde una profundidad determinada (5, 10 o más metros) hasta la superficie (Fig. 7). Coloque la muestra de agua, proveniente del vaso recolector, en un frasco rotulado con datos del lugar (coordenadas) y fecha (Fig. 8), tome 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 a las 24 horas.



Figura 6.- Materiales para recolección



Figura 7.- Lance vertical de la red de fitoplancton

**Observaciones:** para el muestreo de dinoflagelados, no concentrar demasiado la muestra y tome una segunda muestra directamente con una botella para evitar maltratarlos con la red.

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

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

**Procedimiento:** Para cuerpos de agua de poca profundidad recolecte las muestras directamente con un frasco de muestreo (Fig. 9) y registre los parámetros fisicoquímicos del lugar en una libreta de notas (Fig. 10), realice 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.

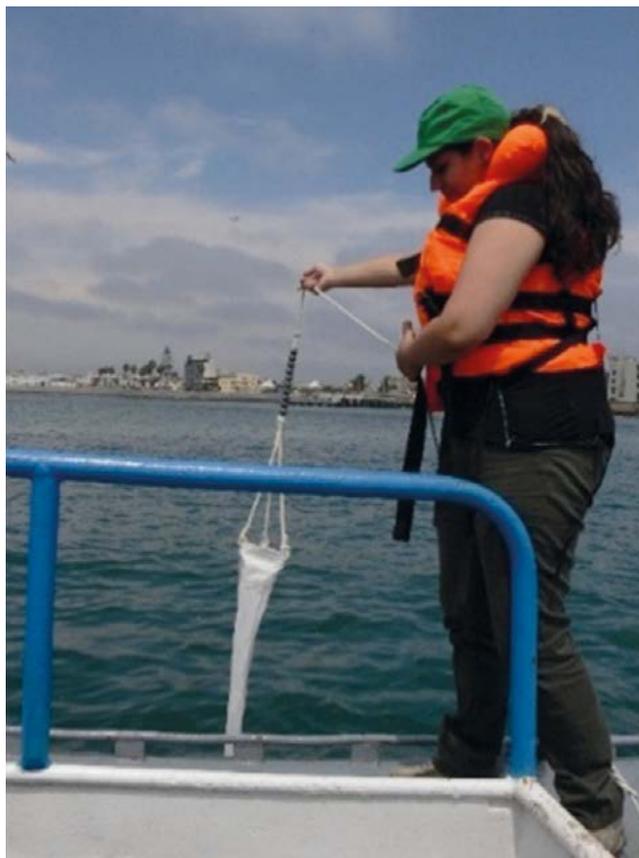


Figura 8.- Malla con botella recolectora



Figura 9.- Toma de muestra directa con un frasco



Figura 10.- Medición de parámetros físico químicos del medio

### OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE CEPAS DE MICROALGAS

Para la obtención de cepas de microalgas, tome en consideración los datos de campo como salinidad, temperatura, pH, amonio, fosfatos, nitritos, nitratos y oxígeno disuelto, además de superficie de donde se extrae la microalga y fuente de alimentación; todo ello servirá 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 BGOA la técnica empleada es la del aislamiento celular con micropipeta, que se describirá a continuación.

#### Aislamiento de una célula con micropipetas

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

**Procedimiento:** limpie el área de trabajo con alcohol al 70 %, preparar el material de trabajo, iniciar la observación de las muestras recolectadas de fitoplancton vivo usando un microscopio compuesto, separar un poco de la muestra en un beaker estéril (Fig. 11). Una vez seleccionada la especie se procede a su separación mediante

la técnica de pipeteo y lavados sucesivos (ANDERSEN, 2005). Esta técnica consiste en usar microcapilares a manera de una micropipeta con diámetro variado de entrada, dependerá del tamaño celular que se vaya aislar.

Preparar un portaobjeto estéril con una gota de la muestra proveniente de la recolección (Figs. 12, 13, 14). En el microscopio compuesto (invertido), capturar con la micropipeta una célula, colonia o cadena de la especie de microalga, trasladarla a otro portaobjeto con gotas de medio de cultivo estéril, realizar el lavado celular, y así sucesivamente hasta lograr aislar una célula, colonia o cadena en una gota de medio de cultivo estéril.

Las células aisladas se colocan en tubos de ensayos con 10 mL de medio de cultivo (el

medio seleccionado estará en función a la microalga), incubar en una cámara bioclimática a temperatura similar a la de su medio natural, con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y una irradiancia de 60 a 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

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

### Mantenimiento de cepas de medio líquido

- Microscopio compuesto
- Cámara de flujo laminar con mechero
- Cámaras de cultivo
- Micropipetas 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 en un periodo de tiempo que dependerá 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 nuevos por cepa con el código y fecha (Fig. 15) para luego dispensar el medio de cultivo estéril (Fig. 16).



Figura 11.- Muestra madre



Figura 12.- Muestra madre en portaobjeto



Figura 13.- Captura de células con micropipeta



Figura 14.- Lavado celular con medio estéril

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

### Conservación de las cepas de microalgas en agar enriquecido

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

**Procedimiento:** Las cepas en agar se recambian cada 6 meses. Los inóculos se seleccionan a partir de medio líquido o placas de cepas anteriormente preparadas y se realiza bajo microscopio invertido y estereoscopio para observar presencia de hongos y/o bacterias en 5 pasos.

a Pese 14 g de agar y coloque en un matraz de 1 L con medio de cultivo específico, dependiendo de la microalga. Esterilice en autoclave a 121 °C por 10 minutos el medio de cultivo enriquecido



Figura 17.- Toma de inóculo de cepa de microalga



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



Figura 18.- Dispensar inóculo microalgal en tubo

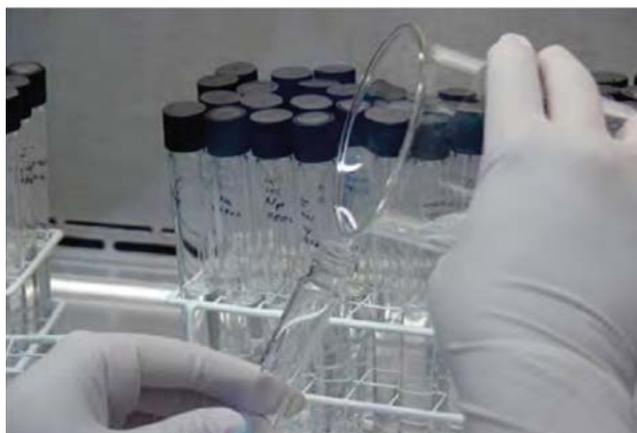


Figura 16.- Tubos de cultivo con medio estéril



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



Figura 20.- Cargar el agar en placa Petri

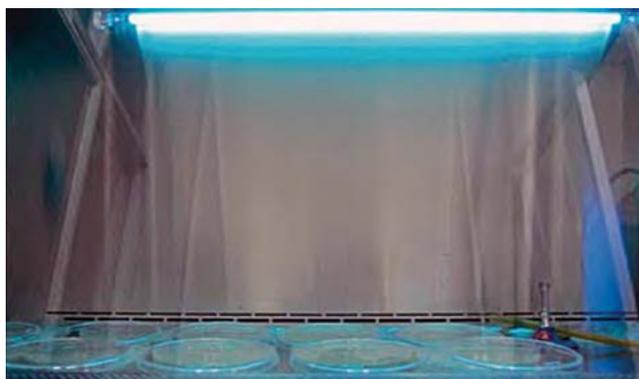


Figura 21.- Placas Petri en cámara de flujo laminar con luz ultravioleta



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



Figura 23.- Colonia sembrada por estrías en placa con agar libres de bacteria

con agar, deje enfriar aproximadamente a 50 °C y cargar las placas Petri estériles (Fig. 20) dentro de la cámara de flujo laminar.

b Deje enfriar hasta la solidificación con la luz UV encendida por aproximadamente 15 minutos (Fig. 21), cierre las placas e invértirlas para evitar la formación de vapor en su interior, rotule cada placa con código de la cepa y fecha (Fig. 22).

c **Inóculo proveniente de medio líquido:** con ayuda de una micropipeta estéril, coloque un poco de inóculo de la cepa del tubo seleccionado, agregue una gota sobre el agar y con ayuda del asa de siembra previamente esterilizada (flameada en el mechero) realice el rayado en agar, selle con papel Parafilm y almacene en cámara climática a 14 °C.

d **Inóculo proveniente de medio sólido:** tome con ayuda del asa de siembra esterilizada una colonia de la placa seleccionada como inóculo, coloque la colonia de microalga sobre el agar en la placa rotulada, siembre con la técnica del rayado por estrías (Fig. 23).

e Terminado el proceso de siembra de inóculo en las placas con agar enriquecido, colóquelas en la cámara climática para su crecimiento (Fig. 24).



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

## Preparación de la muestra para análisis en microscopía electrónica de barrido

El estudio taxonómico a nivel morfológico debe realizarse de la muestra original y en las etapas sucesivas del cultivo unialgal (GONZÁLEZ *et al.*, 1995). Para la correcta clasificación taxonómica de las microalgas es necesario emplear la técnica de microscopía electrónica debido a que proporciona imágenes tridimensionales de importantes ultra estructuras para la identificación como una herramienta más.

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  $\mu\text{m}$  de concentraciones del 100, 75, 50 y 25 % y agua destilada para no provocar choque osmótico en las células que produzca rotura y deformación celular, cada cambio de salinidad se realizará con espacio de 10 minutos. Después de haber eliminado la sal de la muestra, se procederá a la deshidratación de las células en concentraciones crecientes de alcohol de 10, 30, 60 y 80 % y etanol absoluto, cada 10 minutos entre cada concentración, una vez terminado el proceso de filtración se toma el filtro con una pinza y se procede al montaje para la observación en el microscopio electrónico de barrido (GOLDSTEIN *et al.*, 1992)

En el caso del análisis taxonómico de diatomeas, las muestras provenientes de los cultivos deben ser tratadas previamente con el propósito de eliminar la materia orgánica utilizando diferentes soluciones de ácido sulfúrico (HASLE & FRYXELL, 1970; SIMONSEN, 1974).

Posteriormente, con agua destilada utilizando filtros de membrana Isopore™ (RTPP) 1,2  $\mu\text{m}$ , se lavará la muestra previamente tratada para eliminar solventes y 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 micro fotografiadas usando un microscopio electrónico de barrido para observar estructuras de carácter taxonómico y clasificar las especies (ALVEAL *et al.*, 1995).

## 2. REFERENCIAS

- ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, J. P., TORRES, E. y HERRERO, C. (1995). Microalgas Cultivo y Aplicaciones. Servicio de publicaciones, Universidad de la Coruña. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias. La Coruña España. 210 pp.
- ALVEAL, K., FERRARIO, M. E., OLIVEIRA, E. C. y SAR, E. A. (Editores). (1995). Manual de métodos ficológicos. Concepción, Chile: Universidad de Concepción. 863 p.
- ANDERSEN, R. A. (2005). Algae Culturing Techniques. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, London, England. 84 – 98 pp.
- AUTORIDAD NACIONAL DEL AGUA (ANA). (2011). Diagnóstico y Plan de gestión de los Recursos Hídricos en la cuenca de Madre de Dios - Fase I. 247 pp.
- BERGES, J. A., FRANKLIN, D. J. & HARRISON, P. J. (2001). Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *J Phycol.*, 37: 1138 - 1145.
- BOROWITZKA, M. & BOROWITZKA, L. (1988). *Dunaliella*: in microalgal biotechnology. Cambridge University Press. UK. 27 pp.
- CAÑIZARES, V. R. O., CASAS, C., DOMINGUEZ, B. y VOLTOLINA, D. (1994). Las microalgas en la acuicultura. Cuadernos sobre Biotecnología. CINVESTAC-IPN. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México. 44 pp. Coll J. 1991. Acuicultura marina animal, 3a edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 671 p.
- CONTRERAS-FLORES, C., PEÑA-CASTRO, J. M. y FLORES-COTERA, L. B. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobioreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28, 8: 450-456.
- CRESWELL, L.R. (2010). Phytoplankton culture for aquaculture feed. SRAC. Publication N° 5004, 1-17.
- DEL CAMPO, J. A., RODRIGUEZ, H., MORENO, J., VARGAS, M. A. & GUERRERO, R. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 848-854.
- DEL RÍO, E., ACIEN, G., GARCIA-MALEA, G., RIVAS, J., MOLINA-GRIMA, E. & GUERRERO, M. G. (2007). Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 74: 397-402.
- FOGG, G. E. & THAKE, B. (1987). Algae Cultures and Phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press Third edition, EUA. 126 pp.
- GLADUE, R. (1991). Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds. In: Rotifer and microalgae culture systems, Proceedings of a US-Asia Workshop, Honolulu, Hawaii. January 28-31, 1991. Fulks, W and K.L. main (Eds). The Oceanic Institute, Hawaii, USA. 276-286 pp.
- GOLDSTEIN, G., NEWBURY, D., ECHLIN, P., JOY, D., ROMIG, A., LYMAN, C., FIORI, C. & LIFSHIN, E. (1992). Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. Kluwer Academic.

- GONZÁLEZ, M., PARRA, O. y CIFUENTES, A. (1995). Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: K Alveal, Me Ferrario, Ec. Oliveira y E Sar (eds.) Manual de Métodos Ficológicos, Universidad de Concepción, Chile, 219-250.
- GUILLARD, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: WL Smith MH Chanley (Eds.). Culture of marine invertebrates' animals. Plenum Publishing Corp. New York, 29-60 pp.
- GUILLARD, R. R. L. & RYTHER, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol., 8: 229-39.
- GUILLARD, R. R. L. & MORTON, S. L. (2003). Culture Methods. In: Hallegraeff G M, Anderson DM, Cembella Ad (Ed). Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO, Saint-Berthevin, 77-81 pp.
- HANSEN, P. J. & TILLMANN, U. (2020). Mixotrophy among dinoflagellates—prey selection, physiology and ecological importance. In: S. R. DV (Ed.), Dinoflagellates: classification, evolution, physiology and ecological significance, 201-260 pp.
- HASLE, G. R. & FRYXELI, G. A. (1970). Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy Transactions of the American Microscopical Society. JSTOR., 89: 469-474.
- HARRISON, P. J. & BERGES, J. A. (2005). Marine culture media. In: Andersen R.A. (Eds) Algal culturing techniques, Elsevier Academic Press Burlington, MA, 21-34.
- HOFF, F. & SNELL, T. (2001). Plankton Culture Manual. Florida Aqua Farm Inc. E U A, 162 pp.
- JAWORSKI, G. H. M., WISEMAN, S. W. & REYNOLDS, C. S. (1988). Variability in sinking rate of the freshwater diatom *Asterionella formosa*: the influence of colony morphology. Br. Phycology. F., 23: 167-76.
- JEONG, H. J., DU, YOO, Y., KIM, J. S., SEONG, K. A., KANG, N. S., & KIM, T. H. (2010). Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. Ocean science journal, 45(2): 65-69.
- KAPLAN, D., RICHMOND, A. E. & ARONSON, S. (2017). Algal nutrition. In CRC Handbook of microalgal mass culture. CRC Press. 147- 198 pp.
- KOMMAREDDY, A. R. & ANDERSON, G. A. (2003). Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR). 2003 ASAE, St. Joseph, Michigan. Paper No. 034057.
- LAVENS, P. & SORGELOOS, P. (1996). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. Rome, FAO Fisheries Technical Paper, 361: 295 pp.
- LORENZ, M., FRIEDL, T. & DAY, J. G. (2005). Maintenance of actively metabolizing microalgal cultures. In: Andersen R.A. (Eds) Algal culturing techniques, Elsevier Academic Press Burlington, MA. 149-150 pp.
- MARTIN, F. P. H. (2010). Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore.
- PRATT, R. (1944). Studies on *Chlorella vulgaris*. IX. Influence on the growth of *Chlorella* of continuous removal of chlorellin from the solution. Amer. Jour. Bot., 31: 418- 421.
- RICHMOND, A. (1986). Cell response to environmental factor. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press. Inc. U. S. A. 69-99 pp.
- RIVKIN, R. B. (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. y VOLTOLINA, D. (2002). Efecto de las tasas de lujo de fotones de luz blanca y azul-verde en la eficiencia del crecimiento y contenido de pigmentos de tres especies de diatomeas en cultivos terminales. Ciencias marinas, 28(3): 273- 279.
- SCOTT, S. A., DAVEY, M. P., DENNIS, J. S., HORST, I., HOWE, C. J., LEA-SMITH, D. J. & SMITH, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotechnology, 21: 277-286.
- SPOTTE, S. H. (1979). Seawater aquariums: the captive environment. Wiley - Interscience. U.S.A. pp 413.
- SIMONSEN, R. (1974). The diatom plankton of the Indian Ocean Expedition of R/V "Meteor" 1964-1965. Meteor Forschungsergebnisse: Reihe D, Biologie, 19, 1-107 pp.
- VARELA, R. (1988). Cultivo de microalgas, historia y aplicaciones. Natura, 83: 8-10.
- VOSKRENSKAYA, N. (1972). Blue light and carbon metabolism. Annual Rev Plant Physiol., 23: 219-234.
- WARREN, A., DAY, J. G. & BROWN, S. (2002). Cultivation of protozoa and algae. In: Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. and Sterzenbach, L. D., Eds, Manual of Environmental Microbiology, Ed. 2. ASM Press, Washington D. C., 7-83 pp