

**MEDIO SOLIDO-LIQUIDO PARA EL MANTENIMIENTO
PROLONGADO DE CEPAS ALGALES**

Juan Accorinti

Cátedra de Fisiología Vegetal
Dep. Cs. Biol. Fac. de Cs. Exactas y Naturales (UBA)
Ciudad Universitaria de Nuñez. Pab 2 - 4º Piso
1428 Capital Federal
Argentina

RESUMEN

Accorinti, J. 1991. Medio sólido-líquido para el mantenimiento prolongado de cepas algales. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* 22 (2): 35-44.

Se propone y describe un sistema de cultivo "in vitro" de dos fases, en tubos y/o frascos de vidrio neutro (Pyrex o similar), conteniendo en su parte inferior la formulación nutritiva agarizada (sólida) con los macro y micronutrientes mínimos indispensables para normal crecimiento autótrofo. La fase superior líquida, donde se realiza la siembra del inóculo, puede ser de la misma formulación que la inferior y/o contener otros elementos minerales, de acuerdo con las referencias específicas indicadas en cada caso en la bibliografía para crecimiento óptimo. Esta simple metodología, ensayada con éxito en nuestros laboratorios, permite la preservación vital de las cepas algales de distintos hábitats (dulceacuícolas, marinos, salobres y ficobiontes liquénicos) por tiempo prolongado, superior al cultivo de una sola fase, líquida y/o sólida. El método descrito en la presente contribución, no ha sido anunciado en los trabajos técnicos de la bibliografía específica.

ABSTRACT

Accorinti, J. 1991. Long-term maintenance of algal strains in solid-liquid culturing media. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* 22 (2): 35-44.

A novel *in vitro* culturing system for longer active maintenance of algal strains is proposed and described. It consists of two separate phases, one above the other and contained in neutral glass tubes or flasks (Pyrex or similar). The solid basal phase, agarized, includes the macronutrients and at least four micronutrients. These represent the minimum indispensable for normal autotrophic mineral plant nutrition. The upper liquid phase where the alga is seeded, consists of either the same formulation as the solid or a different one, according to the specific requirement of the alga. This two phases system was improved in our laboratories using algae from different habitats (fresh-water, marine, brackish and lichen phycobiont), thus ensuring a longer period of active growth when compared with the same nutrient solution with only the solid or liquid phase. This simple methodology apparently has not been referred to in the literature.

INTRODUCCION

El cultivo de las algas autótrofas tuvo sus orígenes a fines del siglo pasado, paralelamente al desarrollo de las técnicas empleadas en el laboratorio para el crecimiento hidropónico de plantas superiores. Salvada la etapa experimental inicial, incluyendo las primeras formulaciones (*cit. in* Accorinti, 1965) debe señalarse que no se trata de una contribución individual sino que corresponde a sucesivos autores que asentaron en sus obras las mas variadas combinaciones de nutrientes, arribándose a la coincidencia de un mínimo común denominador de macro y microelementos indispensables para el crecimiento normal de especies dulceacuícolas, marinas, salobres, del suelo y liquénicas. A continuación, respetando el orden cronológico, se citan los autores que se dedicaron a la ficología experimental, ya sea con interés puramente académico en sus estudios biológicos, como aquellos que señalan las más variadas aplicaciones, como las que se citan en Accorinti, *op.cit.* Así, señalaremos a von Vischer (1926), Kufferrath (1929), Ketchum & Redfield (1938), Bold (1942), Bourrelly (1948), Pringsheim (1950), Brunnel *et al.* (1950), Provasoli *et al.* (1951), Myers *et al.* (1951), Pappas & Hoffman (1952), Burlew (1953), Mituya *et al.* (1953), Evenare *et al.* (1953), McLaughlin (1956, 1960), McLaughlin & Droop (1957), Tamiya (1957, 1960), Arce & Bold (1958), Krauss (1958, 1962), McLaughlin & Zahl (1959), McLaughlin *et al.* (1960), Starr (1960, 1978), Watanabe (1960a y b), Davis & Ukeles (1961), Goriunova & Osviamova (1961), Accorinti (1960, 1962, 1984), Halperin (1963), Allen (1963), Venkataraman (1969), Lefevre *et al.* (1972), Jhingram & Gapalakrishman (1974), Soeder (1978), Asher & Spalding (1982), Luse *et al.* (1985), Gartner (1986) y Thompson *et al.* (1988).

El cultivo puro o axénico, sus logros y mantenimiento, se refieren en sus comienzos en la obra de Pringsheim (1946). Dicha tarea se ha continuado, ampliado y mejorado por otros, hasta alcanzar los niveles de excelencia encuadrados en la biotecnología de los últimos años: Dainty *et al.* (1985), Richmond (1986), Borowitzka & Borowitzka (1988) y Robinson *et al.* (1988).

Al igual que con las colecciones de bacterias, surgió la necesidad de ordenar los cultivos en centros de ficología experimental, de proyección e intercambio, que dieron origen a las colecciones internacionales, guardadas en ceparios como los de Suiza (Ginebra y Basilea), Inglaterra, primero en Cambridge con el material reunido por Pringsheim, hoy extendidas y establecidas en Ambleside, Cumbria, con su colección de cepas dulceacuícolas (CCAP) y en Escocia, en la Scottish Marine Biological Association, en Oban (SMBA).

Otras son las de Francia (L'Algotheque de Paris), Suecia (Upsala), las colecciones norteamericanas de Indiana, Texas, las de la Kaiser Foundation de California, las de la Universidad de Tokyo (Japón), la de Alemania (Göttingen),

la de Innsbruck (Austria) y otras menores en Institutos y Universidades de distintos países.

En general, los medios de cultivo para el mantenimiento de las colecciones, se basan en fórmulas con los referidos macro y micronutrientes mínimos indispensables o en medios más específicos y complejos, ya sea en soluciones líquidas o de siembra en medios sólidos agarizados, casi todos dispuestos en tubos o frascos expuestos a la luz, en lo posible en cámaras climatizadas.

El mantenimiento de las cepas, principalmente en medios sólidos, se realiza por repiques sucesivos entre dos a tres meses de intervalo, que representan un costo importante en materiales y horas de trabajo técnico, en condiciones de asepsia microbiológica. Obviamente, por los factores enunciados, se han intentado nuevos métodos que permitieron prolongar el tiempo de mantenimiento, aunque éstos, básicamente, no han sufrido mayores variaciones. En algunos casos, como con ciertas cianobacterias o algas verde-azuladas y algas del suelo, con estructuras más resistentes a la desecación, han permitido con éxito su liofilización y otras variantes de la misma, tal como se procede con bacterias. En otros intentos, se ha investigado el posible mantenimiento usando métodos de congelación, por inmersión de los cultivos dispuestos en tubos en nitrógeno líquido logrando su criopreservación, técnica aún en etapa de experimentación, con controles vitales de las algas post-congelación, anotando sus posibles modificaciones a nivel ultraestructura, seguida por microscopía electrónica seriada (Universidad de Durham y en CCAP, Ambleside, Inglaterra).

En los últimos años, distintas Instituciones y Organismos de nuestro país, nos han solicitado cepas algales que disponemos en nuestro cepario, ya sea para estudios e investigaciones académicas, para tareas docentes y para trabajos aplicados. Entre estos últimos, principalmente para piscicultura de agua dulce, usando microalgas de los géneros *Chlorella* y/o *Scenedesmus*, como fuente alimentaria por su función de productores primarios o iniciadores de la cadena trófica. Otro uso común, con las mismas cepas, es el de su empleo como patrones de valoración en bioensayos, para monitoreo de metales pesados, herbicidas, plaguicidas y otros productos tóxicos que interesan en estudios ecológicos de polución dulceacuática.

Debido a dicho interés, se creyó conveniente describir este método intermedio entre el medio sólido y el líquido, que permite un mayor tiempo de preservación vital de las cepas algales y que en nuestros laboratorios han dado excelentes resultados.

MATERIAL Y METODOS

Se usaron dos unidades de cultivo:

a) tubos de ensayo de 20 cm de largo y 2,5 cm de diámetro, con capacidad volumétrica total de 90 ml. La fase inferior sólida y la líquida superpuesta, cubicaron una altura de 4 cm cada una.

b) frascos de 17 cm de largo y 5 cm de diámetro, con un volumen de 250 ml. Tanto las fases sólida como líquida cubicaron una altura de 3 cm por fase.

En cada caso la siembra del inóculo fue proporcionalmente correlativa al volumen de líquido de la fase superior, equivalente a la descarga de un ansa para la siembra en los tubos y entre 3 a 5 descargas para los frascos.

Ambas unidades de cultivo se dispusieron bajo radiación de luz natural (ritmo día-noche) y/o frente a luz constante de tubo fluorescente de 30 W, a una distancia entre 20-30 cm y a temperatura de laboratorio. En todos los ensayos de cultivo, con las distintas cepas algales, el medio sólido de la fase inferior, contenía la formulación del medio de Detmer modificado, con ajuste de pH a 6,8 previo a su esterilización, según se describe en Accorinti (1960) y cuya composición molar se transcribe en Cuadro 1.

Cuadro 1

Formulación del medio Detmer modificado (Accorinti, 1960). Los macronutrientes se expresan en μM y los micronutrientes en μM . (.) El tartrato férrico se prepara por separado (5 g de Cl_3Fe + 5 g de ácido tartárico, llevando a un litro con agua destilada). Por cada litro de solución macronutrientes se agrega 1 ml de micronutrientes y 1 ml de solución de tartrato férrico.

Sales	(c): g/l	elemento	mg/l (ppm)	molaridad
$(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$	1,00	N	42,7	3,05 mM
		Ca	61,1	1,52 mM
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,25	K	50,7	1,30 mM
Cl K	0,25	Cl	33,8	0,95 mM
SO_4Mg	0,25	S	16,7	0,52 mM
		Mg	12,6	0,52 mM
		P	14,2	0,46 mM
BO_3H_3	2,86	B	0,5	42,27 μM
tartrato férrico	(.)	Fe	1,7	30,83 μM
$\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,81	Mn	0,5	9,15 μM
Cl_2Zn	0,11	Zn	0,05	0,81 μM
$\text{Cl}_2 \text{Cu}$	0,05	Cu	0,02	0,37 μM

Los correspondientes medios de cultivo líquidos de las respectivas fases superiores, se prepararon por separado y se agregaron luego de autoclavar, en condiciones asépticas.

Las distintas cepas ensayadas fueron:

Chlorophyceae

Volvocales

- 1- *Dunaliella salina bardawil* (Línea CCAP 19/30; ATCC 30861); hábitat salobre.

Chlorococcales (de hábitats dulceacuícolas)

- 2- *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz. (aislada por Accorinti, 1960, 1962).
- 3- *S. acutus* Meyen (Línea 276-3a: Colección de Cultivos de la Universidad de Göttingen, Alemania (CCUG), a través del Instituto Carbobiológico de Dortmund (ICD).
- 4- *Chlorella pyrenoidosa* Chick (CCGU; ICD).
- 5- *Ch. vulgaris* Beijerinck (CCUG; ICD).
- 6- *Coelastrum sphaericum* (Näg.) var. *dilatatum* (Bohlin et Vischer; línea CCAP, a través de la CCUG; ICD).
- 7- "Trebouxoide" (ficobionte aislado del líquen *Parmotrema reticulatum* (Taylor) Chaisy, creciendo sobre corteza de *Melia azedarach* (aislada por Accorinti, cultivada por de la Torre; identificación líquénica por Adler).

Ulvales

- 8- *Enteromorpha* sp. (aislada de acuarios marinos por Visbeek).

Las fases líquidas superiores variaron de acuerdo a las cepas cultivadas. Para las clorococcales, especies de *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Coelastrum*, se usó la misma formulación del medio de Detmer modificado, como el contenido en la fase inferior sólida.

Para el ficobionte "Trebouxoide" se usó sólo agua destilada. Para *Enteromorpha* sp., el medio líquido correspondió a agua de mar sintética (formulación comercial para el cultivo de peces marinos).

La fase superior líquida para *Dunaliella* fue: Cl Na (23 g/l); Cl₂Mg. 6 H₂O (10 g/l) y SO₄Na₂ (3 g/l).

RESULTADOS

Si bien no se realizó un estudio analítico cuantitativo, entre este método bifásico sólido-líquido y el común sistema monofásico (sólido y/o líquido), los resultados en todos los cultivos fueron evidentes, observados por microscopía óptica y aún por simple inspección visual, que permiten aseverar una notable vi-

talidad de las especies que duplicaron y aún triplicaron la supervivencia al compararlos con los cultivos mantenidos en los sistemas monofásicos.

DISCUSION

El mantenimiento prolongado de las algas sembradas sobre la parte superior líquida del sistema bifásico propuesto, se fundamenta en el establecimiento de un equilibrio entre ambas fases. Es decir, se deduce que al comienzo, el alga sembrada en pleno crecimiento, usará los elementos minerales de la líquida. Cuando cualesquiera de sus elementos se hace indispensable en la solución, debido a nutrición preferencial o mayor consumo, por principio de difusión, los carenciales de la parte superior, son librados por la fase sólida o reservorio inferior, que actúa a modo de "quelante", haciéndolos de nuevo disponibles en la líquida casi en forma permanente. Así, por lento y paulatino proceso de difusión, el sistema propuesto es autoregurable en su disponibilidad nutritiva, permitiendo el consumo racional de los elementos minerales.

CONCLUSIONES

El sistema bifásico propuesto resultó más ventajoso en la racionalización nutricional de las variadas cepas algales ensayadas, procedentes de diferentes hábitats. Por consiguiente, es de amplia aplicabilidad y superior al sistema monofásico común, rindiendo en economía del consumo de materiales, a la vez que permite ahorrar tiempo por manipuleo técnico mucho más espaciado.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de nuestros laboratorios, que de una u otra forma han colaborado en el apoyo de las tareas técnicas relativas a la preparación de los medios de cultivo y mantenimiento del cepario.

REFERENCIAS

- Accorinti, J. 1960. Cultivo unialgal y masivo de *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz. Técnicas de obtención. *Comun. Mus. Argent. Cienc. Nat. Bernardino Rivadavia e Inst. Nac. Invest. Cienc. Nat. Cienc. Bot.* 1 (9): 21-29.
- Accorinti, J. 1962. Inhibidores producidos en cultivos masivos de *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz. *Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat. Bernardino Rivadavia e Inst. Nac. Invest. Cienc. Nat. B. Aires Cienc. Bot* II (6) :363-401.

- Accorinti, J. 1965. El cultivo experimental de las algas. Sus proyecciones en la investigación científica pura y aplicada. *Ed. Culturales Argentinas. Min. Ed. y Just. Subsecr. Cultura*, 53 p.
- Accorinti, J. 1973. Informe de trabajos técnicos y científicos realizados en el Instituto Carbobiológico de Dortmund. Alemania Federal. *Publ. Univ. Bs. As., Fac. Cs. Ex. y Nat.*, 85p.
- Accorinti, J. 1983. El cultivo masivo de microalgas. *Quid II (15)*: 222-230.
- Allen, M. B. 1963. List of cultures maintained by the Laboratory of Comparative Biology. *Kaiser Found. Research Inst. California, U.S.A.*, 17 p.
- Arce, G. & H. C. Bold. 1958. Some Chlorophyceae from Cuban Soils. *Am. J. Bot.* 45: 492-503.
- Asher, A. & D. F. Spalding (Eds.). 1982. Lists of Strains, 4th. Ed. Culture Centre of Algae and Protozoa. *Inst. Terrestrial Ecology. Cambridge*, 104 p.
- Bold, H. C. 1942. The Cultivation of Algae. *Bot. Rev.* 8 (2), 138 p.
- Borowitzka, M. H. & L. J. Borowitzka (Eds.). 1988. Microalgal Biotechnology. *Cambridge University Press*, 487 p.
- Bourrelly, P. 1948. L'Algotheque. Catalogues des collections vivants, herbiers et documents. *Mus. Nat. d'Hist. Nat. Lab. de Cryptogamie. Paris. France*, 20 p.
- Brunnel, J., G. W. Prescott & L.H. Tiffany (Eds.). 1950. The Culturing of Algae (A Symposium). *Publ. Ch. F. Kettering Found. U.S.A.*, 114 p.
- Burlew, J. S. (Ed.). 1953. Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant. *Carnegie Inst. Washington Publ.*, 357p.
- Dainty, A. L., K. H. Goulding, P.K. Robinson, I. Simpkins & M.D. Trevan. 1985. Effect of immobilization on plant cell physiology - real or imaginary? *Trends. Biotechnol.* 3 (3): 59-60.
- Davies, H.C. & R. Ukeles. 1961. Mass Culture of phytoplankton as food for metazoan. *Science* 134: 562-564.
- Evenare, M., A. M. Mayer & E. Gottesman. 1953. Experiments on culture of algae in Israel. *Carnegie Inst. Washington Publ.* 600: 197-203.

- Gärtner, G. 1986. The Culture Collection of Algae at the Botanical Institute of the University at Innsbruck (Austria). *Ber. naturwiss. med. Ver. Innsb.* 72: 33-52; *ibid.* 73: 17-21.
- Goriunova, S. U. & M. N. Ovsiamova. 1961. On the technique of cultivation under laboratory condition of some marine forms of diatoms. *Mikrobiologija Akad. Nauk. S.S.S.R.* 30 (6): 995-997.
- Halperin, R. de D. 1963. Colección de Cultivos de Cianofíceas. *Darwiniana* 12 (4): 559-567.
- Jhingran, V. G. & V. Gopalakrishnan. 1974. Fisheries Technical Paper N° 130 Algae in: *Cultivated Species Catalogue Food and Agriculture Organization of the United Nation* (FAO). Roma, 83 p.
- Ketchum, B. H. & A. C. Redfield. 1938. A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. *Biol Bull.* 75: 165-169.
- Krauss, R. W. 1958. Physiology of the fresh water algae. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 9: 207-244.
- Krauss, R. W. 1962. Mass Culture of Algae for food and other organic compounds. *Am. J. Bot.* 49 (4): 421-435.
- Kufferath, H. 1929. La culture des algues. *Revue algologique* 4: 127-346.
- Lefevre, M., H. Jacob et M. Nisbet. 1972. Auto et heteroantagonisme chez les algues d'eau douce, in vitro et dans les collections d'eau naturelles. *Ann. Stn. Cent. Hydrobiol. Appl.* 4: 197 p.
- Lüsse, B., O. Hoyer & C. J. Soeder. 1985. Mass cultivation of planktonic freshwater algae for the production of extracellular organic matter (E.O.M.). *Zhurnal Wasser Abwasser Forschungsun* 18: 67-75.
- McLaughlin, J. J. A. 1956. Growth factor in unicellular marine algae. Rept. from *Prospectives in marine biology. A Symp. at Scripps. Inst. Ocean Univ. Calif.*: 385-401.
- McLaughlin, J. J. A. 1960. Axenic Culture. *Mc Graw Hill Encycl. and Sci. and Tech.*: 698-701.

- McLaughlin, J. J. A. & I. J. Pintner. 1954. Relative and limiting concentration of major mineral constituents for the grow of algae flagellates. *Trans. N.Y. Acad. Sc. Ser. 1*, 16 (8): 412-417.
- McLaughlin, J. J. A. & P. A. Zahl. 1959. Studies on marine biology. Axenic zooxanthellae from varios invertebrate hosts. *Ann.N.Y. Acad. Sc.* 77: 52-72.
- McLaughlin, J. J. A., P. A. Zahl, A. Marchisotto & J. Preger Jr. 1960. Mass cultivation of some phytoplankton. *Ann. Rev.N.Y. Acad. Sci.* 90 (3): 856-865.
- Mituya, A., T. Nyunova and H. Tamiya. 1953. Pre-pilot plant experiments on algal mass culture. *Carnegie Inst. Washington Publ.* 600: 273-281.
- Myers, J., N. Phillips Jr. & J. R. Graham. 1951. On the mass cultures of algae. *Plant Physiol.* 26: 539-584.
- Pappas, G. D. & H. Hoffman. 1952. The use of antibiotics for obtaining bacteria free culture of *Euglena*. *Ohio J. Sci.* 12 (2): 102.
- Pringsheim, E. G. 1946. Pure cultures of algae. Their preparation and maintenance. *Cambridge Univ. Press*, 119 p.
- Pringsheim, E. G. 1950. El Cultivo de las Algas. *Endeavour* 9 (15) 138-143. Ed. Española.
- Provasoli, L., I. Pintner & L. Packer. 1951. Use of antibiotic in obtaining monoalgal bacteria free cultures. *Proc. Am. Sc. Protozool.* 2: 6.
- Provasoli, L. & I. J. Pintner. 1960. Artificial media for freshwater algae. Problems and suggestions. From the Ecology of Algae (*Pymatuning Symp. in Ecology, Special Publ. N° 2*) Ed. C.A. Tryon and R. T. Hartymann Univ. Pittsb. Press: 84-86.
- Richmond, A.E. 1986. Microalgae of economic potential, in Richmond, A.E. (Ed.), *C R C Handbook of Microbial Mass Culture. Critical Reviews in Biotechnology* 4 (6): 199-243.
- Robinson, P. K., J. O. Reeve & K. H. Goulding. 1988. The biotechnological potential of immobilized microalgal cells, in recent Advances in Biotechnology and Applied Biology. *Proceed 8th. intern. Conf. on Appl. Biol. and Biotech. Hong Kong. The Chinese Univ. Press*: 193-204

- Schloesser, G. 1984. Collection of Algae cultures in Goettingen (West Germany): Additions to the Collection since 1982. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 97: (3/4): 465-475.
- Soeder, C.J. 1978. Economic considerations concerning the autotrophic production of microalgae at the technical scale. *Arch. Hydrobiol.* 11: 259-273.
- Starr, R.C. 1960. The Culture Collection of Algae at Indiana University. *Am. J. Bot.* 47 (1): 67-86.
- Starr, R.C. 1978. The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 14 (Suppl.): 47-100.
- Tamiya, H. 1957. Mass Cultures of Algae. *Ann.rev.Plant. Physiol.* 8: 309-334.
- Tamiya, H. 1960. Process of growth of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Proceeding Symposia of Algology. Indian Council Agriculture Research and UNESCO, N. Delhi*: 128-137.
- Thompson, A.S., J.C. Rhodes & I. Petteman (Eds.). 1988. Culture Collection of Algae and Protozoa. *Catalogue of Strains (CCAP) Natural Environment Research Council*, 164 p.
- Venkataraman, G. S. 1969. The Cultivation of Algae. *Indian Council of Agriculture Research. N. Dehli*, 319 p.
- von Vischer, W. 1926. Etudes d'Algologie experimentale. *Bull. Soc. Bot. Geneve ser. 2, 18*: 23-85.
- Watanabe, A. 1960a. List of algal strains in collections at the Institute of Applied Microbiology. University of Tokio. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 6 (4): 283-292.
- Watanabe, A. 1960b. Collection and cultivation of nitrogen-fixing bluegreen algae and their effect on the growth and yield of rice plants. *Proc. Symp. Algology. Indian Counc. Agricultural Research and UNESCO, N. Dehli*: 162-166.

Recibido/Received: 16 octubre 1991.

Aceptado/Accepted: 27 junio 1992.