

# INDICE:

<b>CAPITULO 1. ¿QUE ES EL FITOPLANCTON?</b>	7
1. EL FITOPLANCTON	2
2. GRUPOS TAXONÓMICOS IMPLICADOS	2
<b>2.1. Diatomeas</b>	2
2.1.1. Diatomeas pennales	3
2.1.2. Diatomeas centrales	3
<b>2.2. Dinoflagelados</b>	3
<b>2.3. Criptoficeas</b>	4
<b>2.4. Primsesioficeas</b>	4
<b>2.5. Prasinoficeas</b>	4
<b>2.6. Cloroficeas</b>	5
3. CRECIMIENTO Y REPRODUCCION DEL FITOPLANCTON	5
<b>3.1. La fotosíntesis</b>	5
<b>3.2. Requerimientos nutritivos</b>	6
<b>3.3. Reproducción</b>	6
<b>3.4. Curvas de crecimiento</b>	7
3.4.1. Fase de retardo	7
3.4.2. Fase exponencial	7
3.4.3. Fase de transición	8
3.4.4. Fase descendente	8
4. COMPOSICION QUÍMICA	8
<b>CAPITULO 2. EL CULTIVO</b>	11
1. LOS MEDIOS DE CULTIVO	11
<b>1.1. Aguas de mar enriquecidas</b>	12
<b>1.2. Los medios sintéticos o artificiales</b>	12
<b>1.3. Ventajas e inconvenientes de los dos tipos de medios</b>	12
<b>1.4. Preparación de medios de cultivo</b>	13
1.4.1. Reservas primarias y secundarias de los componentes	13
1.4.2. Preparación del agua de mar	13
<b>1.5. Preparación de reservas y esterilización del medio</b>	14
1.5.1. Autoclavado	14
1.5.2. Esterilización por microondas	15
1.5.3. Esterilización por ultravioleta	15
1.5.4. Esterilización por lejía	15
<b>1.6. Manipulación y conservación de los medios y las reservas</b>	15
2. EQUIPAMIENTO PARA EL CULTIVO DE FITOPLANCTON	15
<b>2.1. Recipientes</b>	16
2.1.1. Tipos	16
2.1.2. Materiales	17
<b>2.2. Materiales de pesada y volumetría</b>	18
<b>2.3. Las cámaras de cultivo</b>	18
2.3.1. Control de la iluminación	18
2.3.2. Control de la temperatura	18
2.3.3. Control de la aireación	19
<b>2.4. Bombas</b>	19
3. TIPOS DE CULTIVO	19
<b>CAPITULO 3. LA DINAMICA DE LOS CULTIVOS</b>	22
1. CONTROL DEL CRECIMIENTO	22
<b>1.1. Contaje del número de células de un cultivo (recuento)</b>	22
1.1.1. Recuentos al microscopio	22
1.1.2. Recuentos automatizados	23
1.1.3. Otros métodos de recuento de fitoplancton	24
2. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS. LAS COLECCIONES	26
<b>2.1. Inoculación sucesiva</b>	26
3. CONTROL DEL ESTADO DE LOS CULTIVOS	26
<b>3.1. Contaminación con otras especies de fitoplancton</b>	27
<b>3.2. Contaminación bacteriana</b>	28
<b>TERMINOS DEL TEXTO RECOGIDOS EN EL GLOSARIO.</b>	37

## 1 EL FITOPLANCTON

En el mar, la mayor parte de los organismos viven sin fijarse a superficies sólidas, ya que estas son muy escasas. Algunos de estos organismos son capaces de vencer los movimientos del agua (corrientes, etc.) nadando. Tal es, por ejemplo, el caso de los peces. Otros seres marinos, más pequeños, tienen poca o ninguna capacidad de natación, por lo que son arrastrados por los movimientos del mar. A este tipo de organismos se les conoce con el nombre de **Plancton** y, dentro de éstos, el conjunto de los que son capaces de realizar la fotosíntesis, se denomina **Fitoplancton**, que significa plancton vegetal.

Los organismos fotosintéticos, es decir, las plantas con clorofila, toman anhídrido carbónico y sales minerales y, por medio de la energía de la luz captada por la clorofila, producen materia orgánica en el proceso conocido como **fotosíntesis**.

Dado que en el mar, la luz solar sólo penetra hasta determinada profundidad (**zona fótica**) y, además, va disminuyendo a medida que profundiza en el medio marino, las plantas fotosintéticas sólo pueden estar presentes en las capas superficiales de los océanos y mares.

Como en la superficie de las aguas marinas apenas hay superficies sólidas o sustratos en los que apoyarse, la mayor parte de las plantas marinas se ven obligadas a vivir suspendidas en el medio acuático, lo que, de hecho, convierte a la mayoría de ellas en miembros del fitoplancton.

Los animales construyen su cuerpo y realizan sus actividades por medio de la energía y la materia que obtienen de consumir los vegetales fotosintéticos. Por tanto, la cantidad de animales que puede existir está condicionada por la presencia de los vegetales, en número, calidad nutritiva y peso suficientes. En consecuencia, dado que en el medio marino la mayor parte de los vegetales fotosintéticos son miembros del fitoplancton, será esta comunidad vegetal la que condiciona la cantidad de animales que puede haber en el mar.

## 2 GRUPOS TAXONOMICOS IMPLICADOS

El fitoplancton incluye varios grupos de algas que, en su mayor parte, son microscópicos y unicelulares, aunque frecuentemente aparecen formando colonias.

### 2.1. DIATOMEAS

Son organismos unicelulares que tienen un caparazón silíceo (constituido por sílice,  $\text{SiO}_2$ ), que se llama **frústulo** y que está formado por dos mitades llamadas **valvas**, que encajan una dentro de otra como si tratara de una caja de zapatos. Tienen una importancia fundamental en el cultivo de fitoplancton, ya que muchas de sus especies se emplean como alimento en los criaderos y semilleros de moluscos bivalvos.

## Contenido

### 1. El fitoplancton

### 2. Grupos taxonómicos implicados

- 2.1. Diatomeas
  - 2.1.1. Diatomeas pennales
  - 2.1.2. Diatomeas centrales
- 2.2. Dinoflagelados
- 2.3. Criptofíceas
- 2.4. Primesiofíceas
- 2.5. Clorofíceas

### 3. Crecimiento y reproducción del fitoplancton

- 3.1. La fotosíntesis
- 3.2. Requerimientos nutritivos
- 3.3. Reproducción
- 3.4. Curvas de crecimiento
  - 3.4.1. Fase de retardo
  - 3.4.2. Fase exponencial
  - 3.4.3. Fase de transición
  - 3.4.4. Fase estacionaria
  - 3.4.5. Fase descendente

### 4. Composición química

Existen dos tipos fundamentales de diatomeas: Centrales y Pennales.

### 2.1.1. Diatomeas Pennales

Las Diatomeas Pennales son normalmente alargadas, con una especie de grieta en las valvas, llamada **rafe**, por la cual puede salir el citoplasma dotándolas de alguna capacidad de movimiento. También poseen una serie de estrías, que van desde el rafe hasta el borde de las valvas, prestándoles un aspecto inconfundible, aunque no siempre fácilmente visibles con el microscopio ya que suelen aparecer en el campo óptico con la valva hacia arriba.

Las especies más frecuentes son *Nitzschia seriata*, *Phaeodactylum tricornatum* y varias especies de los géneros *Navícula* y *Pleurosigma*.

### 2.1.2. Diatomeas Centrales

Las Diatomeas Centrales no tienen rafe y muchas de ellas llevan prolongaciones. Las especies de este grupo frecuentemente se ven al microscopio en vista lateral, es decir, en una posición en la que no se aprecian las valvas.

Las especies más abundantes pertenecen a los géneros *Chaetoceros* (coloniales o no) y *Thalassiosira*. También son muy frecuentes las especies *Skeletonema costatum* y *Leptocylindrus danicus*.

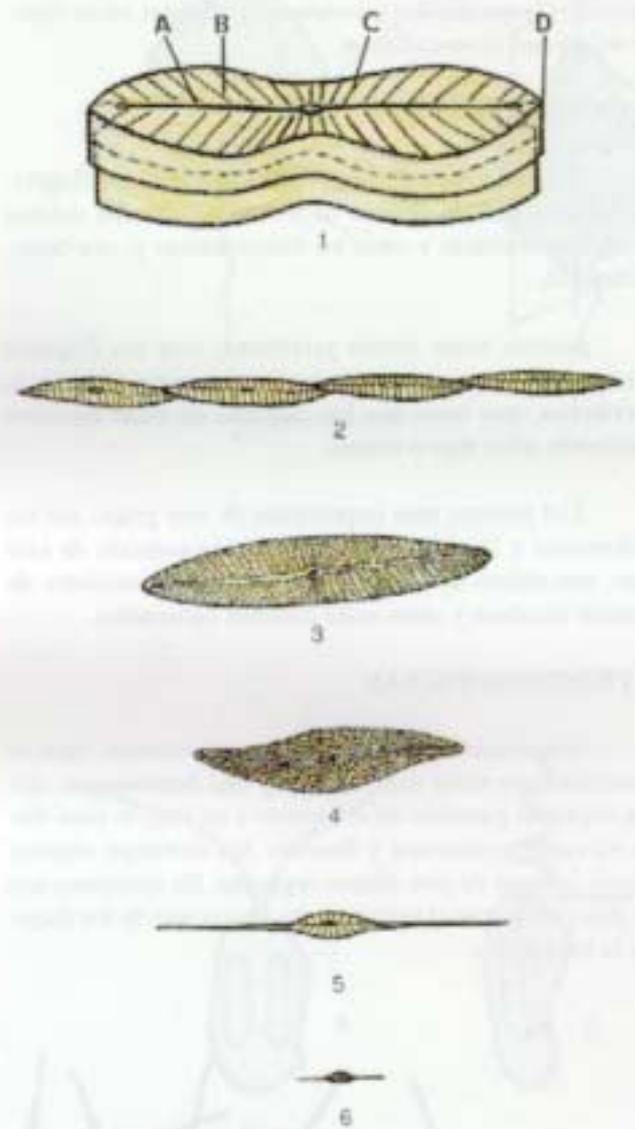
## 2.2. DINOFLAGELADOS

Son organismos unicelulares, casi nunca coloniales, con dos flagelos que sirven a la natación. Uno de los flagelos está arrollado alrededor del cuerpo y el otro se prolonga desde el cuerpo hacia atrás, siguiendo el **surco longitudinal**.

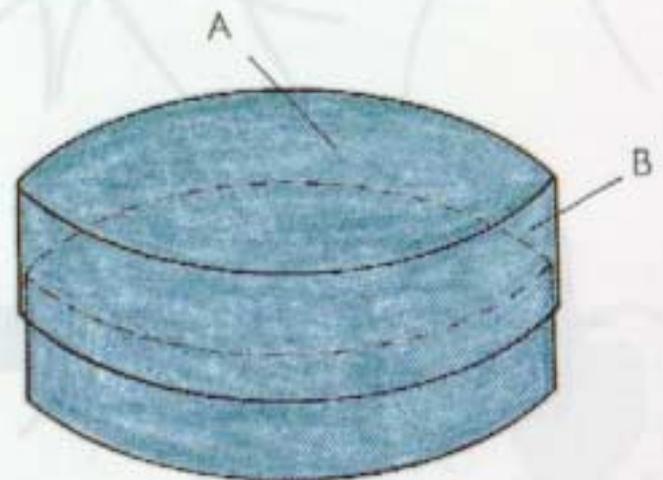
Algunos dinoflagelados tienen caparazón externo hecho de placas de celulosa. Este es el caso de los dinoflagelados llamados **tecados**. Otros, carecen de cubierta alguna, dinoflagelados **desnudos**, con lo que su forma varía con mayor facilidad.

No todos los dinoflagelados son fotosintéticos y por tanto, algunos de ellos deben considerarse como zooplancton, ya que en realidad responden mejor a la definición de animales que a la de vegetales. Al microscopio pueden distinguirse ambos grupos ya que los fotosintéticos presentan cloroplastos, que son gránulos de color verdoso, mientras que los no fotosintéticos suelen llevar varios glóbulos de color rojo o amarillo, además de tener una gran vacuola.

Al contrario de lo que sucede con las diatomeas, los dinoflagelados apenas tienen importancia en el cultivo de fitoplancton, pero la adquieren, tanto por su importante presencia en el medio marino, como por el hecho de que pueden producir sustancias tóxicas que afectan a los organismos cultivados o a la calidad del agua para el cultivo de



1. *Diatomea Pennal*. (A. Rafe. B. Valva. C. Estria. D. Manto)  
 2. *Nitzschia seriata*. 3. *Navícula*. 4. *Pleurosigma*.  
 5. *Nitzschia longissima*. 6. *Phaeodactylum tricornatum*.



*Diatomea central*. A. Valva. B. Manto.

algunas otras especies fitoplanctónicas. Algunas especies importantes desde este punto de vista son: *Alexandrium tamarese*, *Gymnodinium catenatum* y algunas otras especies del género *Gymnodinium*.

### 2.3. CRIPTOFICEAS

Son un grupo de organismos unicelulares flagelados. Al igual que en el caso de los dinoflagelados existen formas fotosintéticas y otras no fotosintéticas y, por tanto, sin clorofila.

Suelen tener forma piriforme, con los flagelos situados en la parte gruesa. Llevan un pigmento especial, la **ficoeritrina**, que hace que los cultivos de estas especies manifiesten color rojo o rosado.

Los géneros más importantes de este grupo son las *Rhodomonas* y las *Criptomonas*. Algunas especies de este grupo, son objeto de cultivo en criaderos y semilleros de moluscos bivalvos y otros seres marinos cultivables.

### 2.4. PRIMNESIOFICEAS

Son organismos flagelados, unicelulares, que se caracterizan por tener dos flagelos y una **haptonema**, que es un orgánulo parecido en el aspecto a un flagelo pero distinto en cuanto estructura y función. Sin embargo, algunas especies carecen de este último orgánulo. En ocasiones son muy difíciles de ver al microscopio óptico uno de los flagelos y la haptonema.

Son de color marrón dorado y, generalmente, poseen dos cloroplastos por célula.

Este grupo incluye organismos muy importantes desde el punto de vista ecológico, como p. ej., los coccolitofóridos, y algunas especies son abundantemente empleadas en acuicultura, como p. ej., *Isochrysis galbana* y *Monochrysis* (= *Pavlova*) *lutheri*.

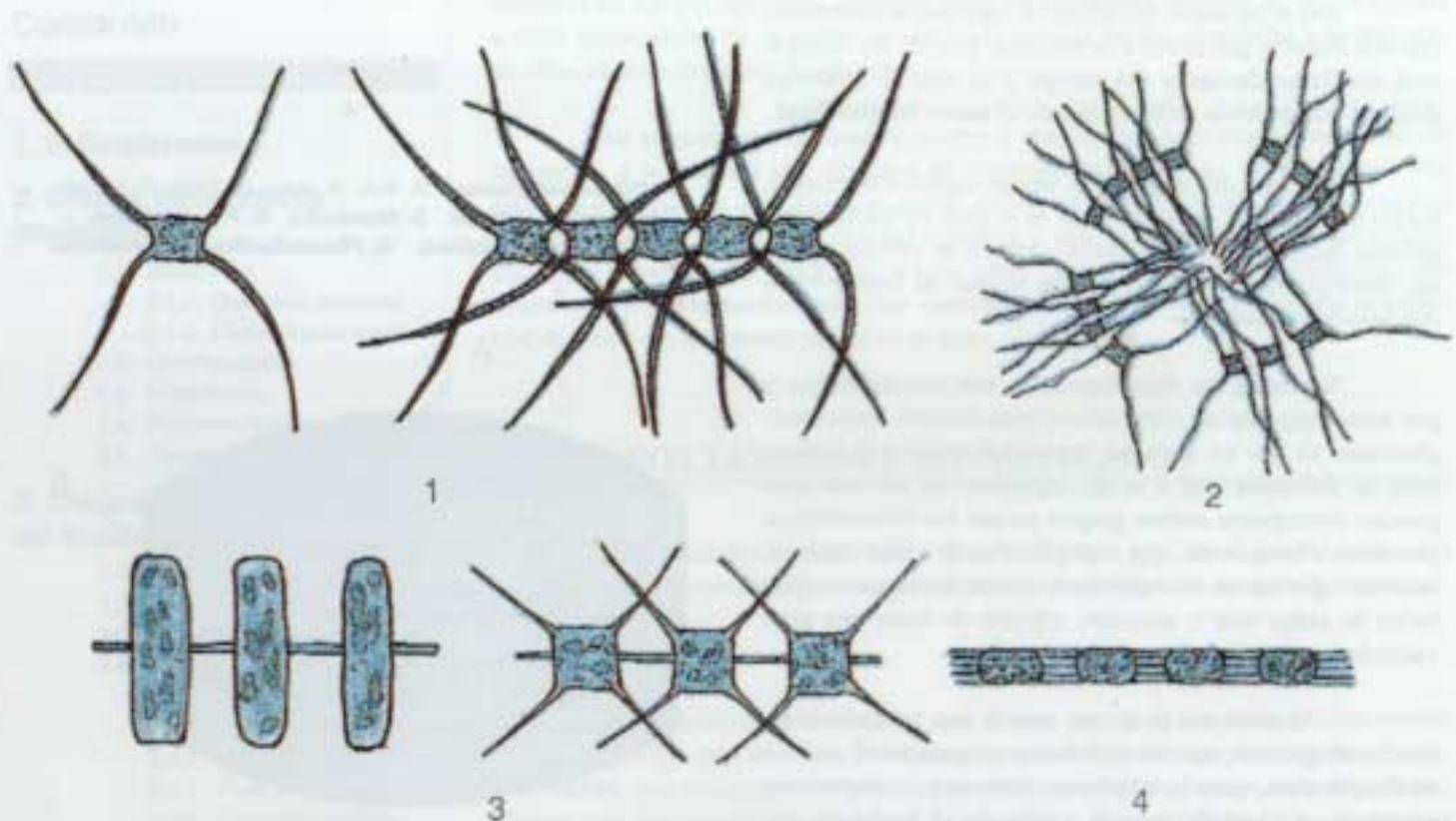
### 2.5. PRASINOFICEAS

Son microorganismos unicelulares flagelados, que tienen entre 1 y 8 flagelos, normalmente 4, que salen de una hendidura en uno de los extremos de la célula.

Las células están cubiertas por escamas orgánicas que difícilmente se ven al microscopio óptico, pero que cuando forman una cubierta continua, en ocasiones pueden verse cuando la cubierta se desprende de las células, como sucede, p. ej., en los cultivos de *Tetraselmis*.

Suelen tener un solo cloroplasto y son de color verde. La reproducción es normalmente asexual, sin que haya evidencias de que exista reproducción sexual, salvo en *Tetraselmis*. En ocasiones originan estados no flagelados (inmóviles) que pueden llegar a reproducirse.

Los géneros más conocidos son *Pyramimonas* y *Tetraselmis*, ambos con 4 flagelos. El primero es muy abundante en el mar y el segundo es una de las especies fitoplanctónicas más empleadas en acuicultura.



1. *Chaetoceros*. 2. *Chaetoceros socialis*. 3. *Thalassiosira*. 4. *Skeletonema*.

## 2.6. CLOROFICEAS

Las clorofíceas planctónicas son células con las mismas características que las prasinofíceas, sólo que carecen de escamas. Los géneros más importantes son *Chlamidomonas* y *Dunaliella*, de los cuales, éste último, se emplea en cultivos marinos como alimento de especies comerciales filtradoras.

## 3 CRECIMIENTO Y REPRODUCCION DEL FITOPLANCTON

### 3.1. LA FOTOSINTESIS

La fotosíntesis es un proceso mediante el cual los vegetales producen la materia orgánica de que están compuestos utilizando la energía solar, agua, anhídrido carbónico, sales minerales (Nitrato, Amonio, Fosfato, etc) y, en cantidades muy pequeñas, otros compuestos. En el proceso de fotosíntesis, a la vez que se toma  $CO_2$  se libera oxígeno ( $O_2$ ), con lo cual el primero de estos gases se hace más escaso en el medio y el segundo más abundante cuanto más intensa sea la fotosíntesis.

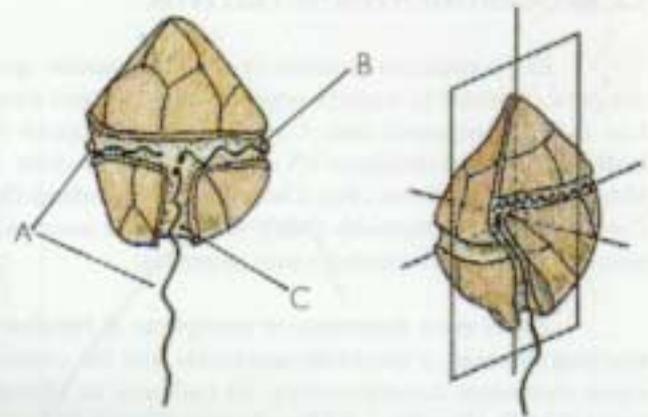
La velocidad de la fotosíntesis en el fitoplancton depende de varios factores, entre los que destacan: a) La especie de que se trate, b) La luz y c) La concentración de nutrientes.

La luz estimula la fotosíntesis hasta un cierto nivel, a partir del cual no produce ningún efecto beneficioso e, incluso, llega ser perjudicial.

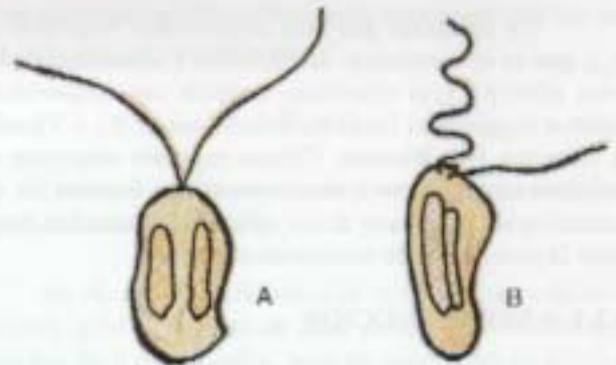
Respecto de la fotosíntesis no solamente tiene importancia la intensidad luminosa si no también, la calidad de la luz (**espectro**), es decir, las distintas radiaciones que la forman y la proporción en que se encuentran. Este hecho ha de tenerse muy en cuenta a la hora de cultivar fitoplancton, ya que éste absorbe bien las radiaciones roja y azul, pero mucho peor las radiaciones verde y amarilla, por lo que estos dos tipos de luz son, por tanto, poco aconsejables para el crecimiento del fitoplancton.

Se denominan nutrientes, las sustancias minerales presentes en el medio marino que el fitoplancton puede incorporar a su organismo como alimento. Se consideran nutrientes fundamentales los nitratos y fosfatos.

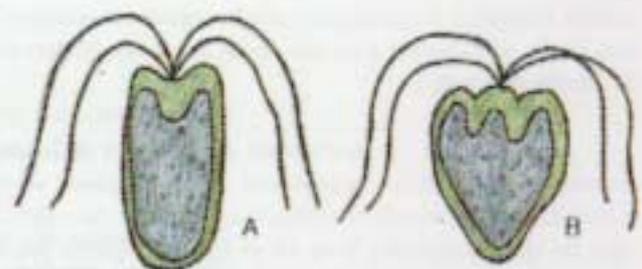
La fotosíntesis responde a la concentración de nutrientes en una forma similar a la intensidad de la luz. Algunos nutrientes comienzan a tener efectos perjudiciales a concentraciones relativamente bajas y otros pueden aportarse en concentraciones altas, sin que perjudiquen las algas. Los niveles óptimos de nutrientes dependerán, en cualquier caso, de las especies fitoplanctónicas e, incluso, del tipo de cultivo que se trate.



**Dinoflagelado.** A. Flagelos. B. Surco transversal o cíngulum. C. Surco longitudinal o sulcus.



**A. Isochrysis. B. Pylova.**



**Prasinofíceas. A. Tetraselmis. B. Pyramimonas.**

### 3.2. REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS

El fitoplancton requiere diversos elementos químicos para construir la materia orgánica de su propio cuerpo. Los más importantes son: Carbono (C), Oxígeno (O), Hidrógeno (H), Nitrógeno (N), Azufre (S), Fósforo (P), Magnesio (Mg), Hierro (Fe), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Cobalto (Co) y Manganeso (Mn), si bien otros muchos son necesarios, pero en cantidades más pequeñas.

Todos estos elementos se incorporan al fitoplancton por vías diversas, a través de sustancias que los contienen como elementos constituyentes: El carbono, se obtiene a partir del  $\text{CO}_2$  disuelto o del bicarbonato cálcico. El oxígeno y el hidrógeno se obtienen del agua. El nitrógeno se adquiere fundamentalmente a partir de nitratos o de amonio. El azufre, de los sulfatos presentes en el agua. El magnesio y los demás metales a partir de diversos compuestos que existen en el agua en proporciones variables.

Algunas especies necesitan además de estas sustancias inorgánicas, una o más vitaminas. Esto sucede en los casos en los que los organismos no tienen los mecanismos que le permitan sintetizar esos compuestos.

La vitamina que más organismos requieren es la  $\text{B}_{12}$ , que es el compuesto denominado **Cianocobalamina** (y otros afines). Otras vitaminas, también muy requeridas por muchos organismos fitoplanctónicos, son la  $\text{B}_1$  o **Tiamina** y la vitamina H o **Biotina**. Ciertas especies requieren otros compuestos orgánicos (otras vitaminas o factores de crecimiento) que, en el caso de los cultivos industriales, hay que tener la precaución de incorporar al medio.

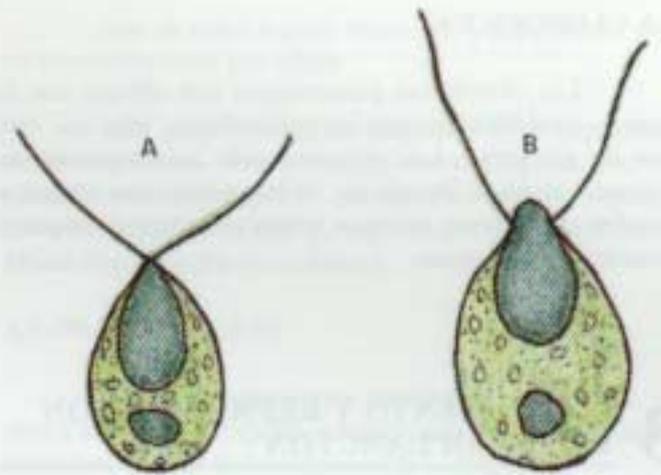
### 3.3. LA REPRODUCCION

Hemos visto como se produce la biomasa por medio de la fotosíntesis y ahora estudiaremos como esa biomasa se distribuye en las células del fitoplancton.

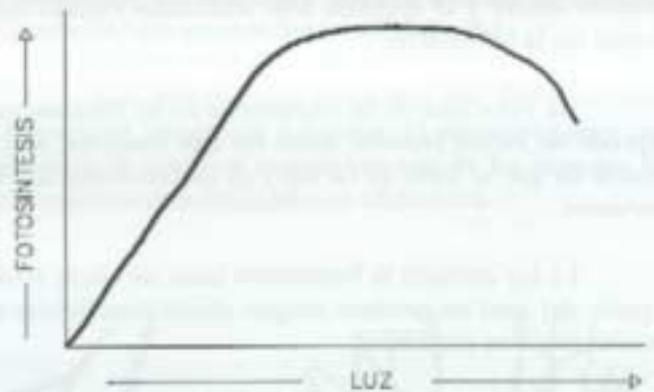
Al fotosintetizar, las células fitoplanctónicas van aumentando su contenido hasta que, al llegar determinado momento, se reproducen por bipartición. Es decir, la célula se divide en dos células aproximadamente iguales, cada una de las cuales se lleva la mitad de la materia orgánica.

Este es el modo más frecuente de reproducción de todas las especies de fitoplancton, pero no es el único. Existe también reproducción sexual. En momentos determinados, generalmente cuando comienzan las condiciones ambientales desfavorables, tales como p. ej., escasez de nutrientes, las células normales (vegetativas) pueden producir gametos que, más tarde, se fusionan para dar lugar a una célula denominada **zigoto** (= cigoto).

Este cigoto, en la mayoría de los casos da lugar, por división, a dos células vegetativas. En otros casos se transforma en una forma de resistencia que pierde movilidad (en caso de que la tuviera) y se va al fondo o queda pegada a alguna superficie sólida, en espera de condiciones más favorables para reanudar la vida vegetativa normal.



Clorofíceas. A. *Dunaliella*. B. *Chlamidomonas*.



Efecto de la luz sobre la fotosíntesis.

## Definición estricta de Plancton (Margaleff)

Conjunto de seres vivos, animales o vegetales, adultos y larvarios que flotan pasivamente en las aguas dulces o marinas, o que, si nadan, no pueden resistir el movimiento de las corrientes débiles.

Los límites de esta entidad biológica son difusos. Todos los grupos, animales o vegetales marinos tienen sus representantes, temporales o permanentes en el plancton.

### 3.4. LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

La forma en que el fitoplancton va aumentando su concentración en el agua se describe por medio de las llamadas **curvas de crecimiento**, que no son otra cosa que la representación de las variaciones de la cantidad de fitoplancton (biomasa) a lo largo del tiempo. En general, las curvas de crecimiento presentan cuatro fases bien diferenciadas: de retardo, exponencial, estacionaria y descendente.

#### 3.4.1. Fase de retardo

La fase de retardo se produce cuando un grupo de células de fitoplancton, se encuentran con un medio ambiente al que no estaban aclimatadas, por lo que durante un tiempo no crecen, o el crecimiento se compensa con la mortalidad, o, lo que es lo mismo, las células que se producen son tantas como las que mueren, por lo cual, la población, en su conjunto, no crece.

#### 3.4.2. Fase exponencial

Como comentamos anteriormente, el fitoplancton se reproduce principalmente por bipartición, y el tiempo que una célula tarda en dividirse es menor cuanto mejor sea su estado fisiológico y, por tanto, cuanto mejores condiciones presente el medio. La velocidad a la que las células se dividen no se suele medir por el tiempo que tardan en dividirse, sino por su inverso, que es el número de veces que se dividen en un tiempo determinado (normalmente, un día). A esta medida se le denomina **tasa de división** o de **duplicación** o, de una forma más general, **tasa de crecimiento**.

Pongamos que una población de fitoplancton tiene una tasa de crecimiento de 1 división/día. Si partimos de un número inicial de células  $N_0$ , al cabo de un día las células se



**Efecto de los nutrientes sobre la fotosíntesis.**

habrán dividido una vez y, por lo tanto, el número de células actual será de  $N_1 = 2 N_0$ , es decir, el doble de células. Al día siguiente este número se habrá duplicado y, por tanto, habrá  $N_2 = 2 N_1$ , o sea  $N_2 = N_0 \times 2 \times 2 = N_0 \times 2^2$ , que es  $N_0 \times 2^d$  elevado al número de divisiones por unidad de tiempo elegida (que en este caso son dos). Poniendo esta expresión en una forma más general, tenemos que:

$$N_t = N_0 \times 2^d$$

Donde  $d$  es el número de divisiones que la población sufrió hasta el tiempo  $t$ .

En el caso que acabamos de ver, el número de divisiones era igual al número de días, porque la tasa de crecimiento era de 1 división/día, pero en general no es así, y el número de divisiones hay que calcularlo multiplicando la tasa de crecimiento por el número de días, es decir:

$$\text{Tasa de crecimiento} \times \text{Días} = \text{Divisiones}$$

## Situación del Plancton en una clasificación ecológica de los seres vivos (*Según Stener, modific.*)

### 1. BIOS (ecosistema planetario):

#### 1.1. GEOBIOS (tierras emergidas)

#### 1.2. HIDROBIOS (aguas)

##### 1.2.a. LIMNOBIOS (aguas dulces)

##### 1.2.b. HALOBIOS (fauna y flora marinas)

##### 1.2.b.1. BENTOS (fondos marinos)

- SEIBIOS (fijos)
- NAGILES (Corredores, reptadores)

##### 1.2.b.2. PELAGOS (columna de agua marina)

- NECTON (nadadores)
- PLANCTON (los que son arrastrados)
  - FITOPLANCTON
  - ZOOPLANCTON

Por tanto, la fórmula que describe el cambio de la biomasa de fitoplancton a lo largo del tiempo es:

$$N_t = N_0 \times 2^{rt}$$

Donde  $N_t$  es el número de células (o cualquier otra medida de biomasa) en el día  $t$ , y  $r$  es la tasa de crecimiento expresada en divisiones/día.

Este tipo de crecimiento se denomina **exponencial** y se da después de la fase de retardo (suponiendo que esta exista, lo que no siempre sucede) y dura hasta que la escasez de nutrientes o el exceso de sustancias de deshecho de las algas, o cualquier otro factor, reduce la tasa de crecimiento al empeorar el estado fisiológico del fitoplancton.

### 3.4.3. Fase de transición

La fase de crecimiento exponencial, como acabamos de decir, termina cuando la tasa de crecimiento disminuye y se va haciendo cada vez más pequeña hasta llegar a ser cero, es decir, hasta que deja de haber crecimiento y, por tanto, la cantidad de fitoplancton se mantiene constante. Este período de transición recibe a veces el nombre de **exponencial tardía** o de

### 3.4.4. Fase estacionaria

Cuando se alcanza el crecimiento cero la biomasa del fitoplancton puede mantenerse (con algunos altos y bajos), durante un período más o menos largo de tiempo, hasta que las células empiezan a morir más que a reproducirse (por tanto, tasas de crecimiento negativas). Este período recibe el nombre de **fase estacionaria** y su duración es variable. En general, las especies que crecen muy rápido, con tasas de crecimiento altas, tienen fases estacionarias cortas, mientras que a las de crecimiento lento les sucede lo contrario.

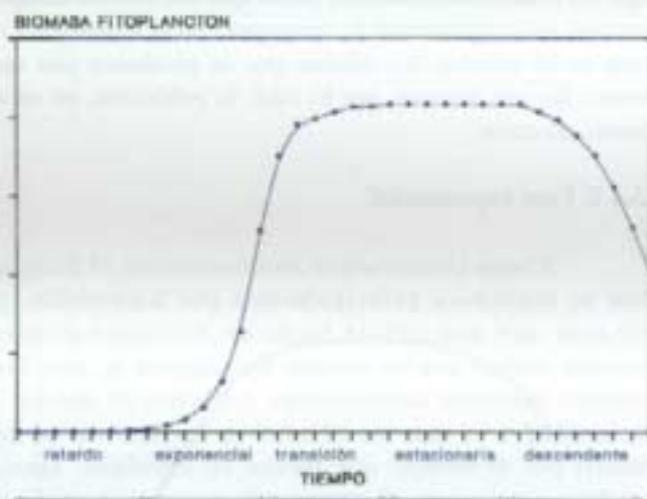
### 3.4.5. Fase descendente

Por último se produce la muerte de las células, lo cual lleva a un período de reducción de la cantidad de fitoplancton que constituye la fase descendente o de muerte o de senescencia.

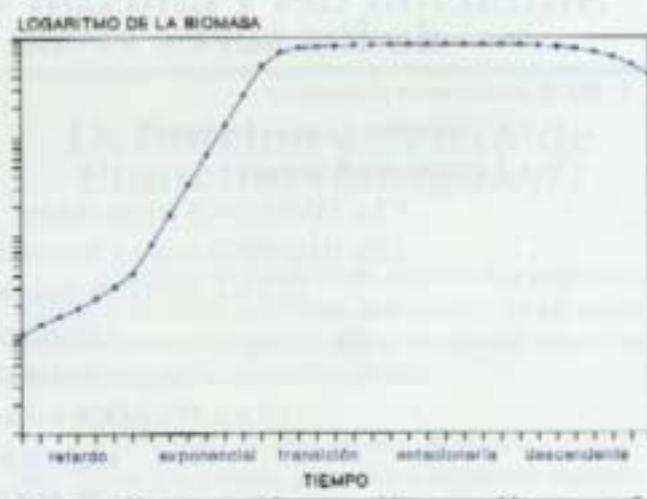
Es muy frecuente representar la curva de crecimiento en escala logarítmica, por motivos puramente prácticos. Tanto la fase de retardo como la estacionaria son relativamente fáciles de detectar, pero una curva exponencial no es fácil saber cuando empieza y cuando acaba. Al aplicar logaritmos a los datos, la parte exponencial de la curva se convierte en una recta, por lo que es mucho más fácil de detectar. Esta recta se caracteriza además, porque su pendiente es la tasa de crecimiento.

## 4 COMPOSICION QUIMICA

El fitoplancton sintetiza, a partir de los nutrientes que incorpora a su organismo, los compuestos que constituyen



Curva de crecimiento del fitoplancton con las fases correspondientes.



Forma de la curva de crecimiento transformada al usar logaritmos de la biomasa.

## Características comunes al Plancton

- **Flotabilidad:** supresión de alimentos pesados o su reducción al mínimo.
- **Locomoción de poca importancia:** cilios, flagelos, delicados apéndices ...
- **Transparencia:** constituye una defensa.
- **Organos de los sentidos transformados**
- **Gran actividad reproductora**

sus células. Sin embargo, cada uno de esos compuestos se sintetiza en diferentes proporciones, dependiendo del organismo que se trate y de su estado fisiológico, el cual, a su vez, depende de las condiciones del ambiente, que pueden ser el medio de cultivo o el ambiente natural. Así, p. ej., en un ambiente pobre en nitrógeno, la cantidad de componentes que llevan este elemento, como las proteínas, se reduce mucho, aumentando la proporción de los lípidos e hidratos de carbono, que no tienen nitrógeno en su molécula.

Del mismo modo, variaciones en la concentración de otros elementos, como sucede p. ej., a lo largo de la curva de crecimiento, o variaciones en temperatura o en la intensidad o el color de la luz, producen igualmente cambios en las proporciones entre compuestos y, por consiguiente, en la composición química.

En general, puede decirse que en la fase exponencial de la curva de crecimiento se sintetizan más proteínas en relación a lípidos e hidratos de carbono, mientras que en la fase estacionaria sucede todo lo contrario.

Entre especies se dan dos tipos importantes de diferencias en lo que respecta a la composición química: diferencia en la proporción entre compuestos y carencia de determinados compuestos.

Desde el punto de vista de la utilización del fitoplancton como alimento para otros organismos, es necesario conseguir cultivos con una composición química global equilibrada, es decir, que tengan lípidos, hidratos de carbono y proteínas en las proporciones más adecuadas para la especie que se quiere alimentar, y es necesario además, que contenga todos los compuestos concretos que esa especie requiere, p. ej., un tipo de ácido graso o de aminoácido determinado.

Para ello deben elegirse la o las especies que contengan dichos compuestos esenciales u buscar las proporciones más adecuadas entre todos los compuestos, eligiendo las condiciones de cultivo apropiadas. Existe también la posibilidad de completar la alimentación de algunos organismos con alimentos inertes, como harina o compuestos especialmente diseñados para ese fin.

## Otras clasificaciones del Plancton

### 1) Por el TAMAÑO

- 1.1. MACROPLANCTON (Medusas ...)
- 1.2. MESOPLANCTON (Copépodos ...)
- 1.3. MICROPLANCTON (Peridíneas ...)
- 1.4. NANOPLANCTON (Coccolitoforales ...)

### 2) Por su LOCALIZACIÓN

- 2.1. NERITICO (costero)
- 2.2. OCEANICO (alejado de la costa)
- 2.3. BATIPELAGICO (que llega hasta los abismos)
- 2.4. FAOPLANCTON (entre 1 y 30 m de la columna de agua)
- 2.5. KNEFOPLANCTON (entre 30 y 500 m de la columna de agua)

### 3) Por su PERSISTENCIA

- 3.1. HOLOPLANCTON (todos los estadios del ciclo vital de la especie corresponden al plancton).
- 3.2. MEROPLANCTON (solo algunas fases del ciclo vital de la especie corresponden al plancton).

## Autoevaluación

**1** Relaciona las dos series de vocablos (serie de letras: género; serie de números: grupo):

A	<i>Dunaliella</i>	1	Dinoflagelado		
B	<i>Rhodomonas</i>	2	Diatomea pennal		
C	<i>Tetraselmis</i>	3	Diatomea central		
D	<i>Gymnodinium</i>	4	Prasinoficea		
E	<i>Skeletonema</i>	5	Primnesioficea		
F	<i>Phaeodactylum</i>	6	Criptoficea		
G	<i>Isochrysis</i>	7	Cloroficea		

**2** Con ayuda del glosario, relaciona, en el orden expuesto, las siguientes series de vocablos y conceptos:

- Autótrofo - Fotosíntesis - Clorofila - Cloroplasto
- Radiación solar - Espectro visible - Radiación azul
- Compuesto químico - nutriente - nitrato
- Reproducción - Reproducción celular - Reproducción asexual -Bipartición
- Reproducción sexual - gametos - fecundación - cigoto

## Aplicaciones

**1** Una población fitoplanctónica tiene una tasa de crecimiento de tres divisiones/día. Si la población inicial es de 20 células, ¿Cuál será al número de células al cabo de tres días, suponiendo una mortalidad 0 ?

**2** La curva de crecimiento de una población fitoplanctónica sigue una secuencia bien conocida: fase de retardo, exponencial, de transición, estacionaria y descendente. ¿Cuáles son, a tu juicio, las causas de que la población, tras la fase de crecimiento exponencial, se estabilice y luego disminuya?

**3** Actualmente se suelen clasificar los seres vivos en cinco grandes reinos (o seis, si se consideran independientemente los virus): Reino **móneras**, reino **protistas**, reino **hongos**, reino **metafitas** y reino **metazoos**. Señala algún representante en el plancton de cada uno de los reinos.

**4** ¿En cuáles de los reinos citados encontrarías representantes fitoplanctónicos?.

## Conoce tu entorno

**1** Los individuos fitoplanctónicos son, en su gran mayoría, microscópicos. Sin embargo, en algunos casos, las agrupaciones fitoplanctónicas alcanzan tal densidad de individuos que pueden observarse a simple vista. ¿Conoces alguna situación en que se produzca este fenómeno?

**2** La curva de crecimiento típica de una población de fitoplancton no es muy distinta de la curva de crecimiento de otras poblaciones. ¿Podrías indicar algún ejemplo?

**3** Consulta los prospectos de algún abono químico para acuarios. Anota los compuestos presentes en su fórmula así como los elementos constituyentes de esos compuestos. Comprueba si están todos los elementos esenciales citados en el apartado 3.2. de este capítulo.

## Contenido

### 1. Los medios de cultivo

- 1.1. Aguas de mar enriquecidas
- 1.2. Los medios sintéticos o artificiales
- 1.3. Ventajas e inconvenientes de los dos tipos de medios
- 1.4. Preparación de medios de cultivo
  - 1.4.1. Reservas primarias y secundarias de los componentes
  - 1.4.2. Preparación del agua de mar
- 1.5. Preparación de reservas y esterilización del medio
  - 1.5.1. Autoclavado
  - 1.5.2. Esterilización por microondas
  - 1.5.3. Esterilización por ultravioleta
  - 1.5.4. Esterilización por lejía
- 1.6. Manipulación y conservación de los medios y las reservas

### 2. Equipamiento para el cultivo de fitoplancton

- 2.1. Recipientes
  - 2.1.1. Tipos
  - 2.1.2. Materiales
- 2.2. Materiales de pesada y volumetría
- 2.3. Las cámaras de cultivo
  - 2.3.1. Control de la iluminación
  - 2.3.2. Control de la temperatura
  - 2.3.3. Control de la aireación
- 2.4. Bombas

### 3. Tipos de cultivo

El cultivo de fitoplancton es especialmente importante por dos razones: la primera es que permite realizar experimentos con diversas especies en condiciones controladas, lo cual lleva a que puedan conocerse mejor, tanto las especies individualmente como el fitoplancton en su conjunto. La segunda razón es que constituye la fuente principal de alimento para algunos cultivos industriales, especialmente de invertebrados marinos.

Los cultivos fitoplanctónicos para que sean útiles, especialmente para su uso como alimento, han de reunir dos características:

1. **Ser de crecimiento rápido**, ya que un cultivo que p. ej., se duplicara cada 10 días, sería de poca utilidad.

2. **Alcanzar elevadas concentraciones**, puesto que a concentraciones bajas, la manipulación de las altas cantidades de fitoplancton necesarias p. eje., en un criadero, para dar de comer a los moluscos u otros organismos, requeriría la manipulación de grandes volúmenes de agua, lo cual resulta imposible. Por otra parte, el problema de medir la cantidad de fitoplancton o de algunos de sus compuestos se haría tan difícil y complicado como hacerlo directamente en el agua de mar.

Para conseguir estas dos características hay que elegir: a) la especie, raza o clon que va a cultivar y b) las condiciones en las que se va cultivar.

Cuando las condiciones de cultivo se pueden fijar, puede elegirse cualquier especie, según nuestros intereses. Pero cuando no se pueden fijar, como es el caso de los cultivos al aire libre, debe adoptarse una solución de compromiso, eligiendo de las especies que crecen bien en esas condiciones, aquellas que mejor se ajusten a nuestras necesidades.

La selección de especies, razas o clones suele hacerse aislando dichas especies del medio natural (para lo que se emplean diversas técnicas) o bien, obteniendo las especies deseadas a través de las diversas colecciones de fitoplancton que existen en el mundo. Este segundo procedimiento es el más empleado por los cultivadores de moluscos y animales filtradores.

La selección de las condiciones de cultivo requiere el empleo de un medio de cultivo con mayor riqueza en nutrientes que el agua de mar y el mantenimiento de condiciones físicas adecuadas, de luz y temperatura fundamentalmente.

## 1 LOS MEDIOS DE CULTIVO

El medio representa el sustrato que soporta y condiciona el cultivo de fitoplancton. En el caso que nos ocupa, por lo tanto, consta de:

- a. Nutrientes y otras sustancias orgánicas e inorgánicas.
- b. Agua de mar.

## Preparación de reservas en el medio F/2 Guillard

Se hacen reservas de nitrato, fosfato y silicato con concentraciones 1000 veces más altas que las que hay en ese medio, y reservas de molibdeno, manganeso, cobre, cobalto y cinc un millón de veces más concentrados que el medio.

De los primeros se añade directamente 1 ml por cada litro de agua de mar. De los segundos, se añade 1 ml de cada uno a un litro de agua destilada y, después, a esta solución se le añade hierro y EDTA para dar un reserva llamado **secundario de metales**, del cual se vierte 1 ml a cada litro de medio.

## Medio de cultivo de fitoplancton F/2 Guillard

### Disoluciones de macronutrientes

- (1)  $\text{NaNO}_3$ .....7,5 g/100 ml agua destilada
- (2)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  .....0,5 g/100 ml agua destilada
- (3) \*  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  .....3,0 g/100 ml agua destilada

\* Los silicatos se emplean cuando se van a cultivar diatomeas.

### Disoluciones de trazas de metales

- (4)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....0,19 g/50 ml agua destilada
- (5)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....1,10 g/50 ml agua destilada
- (6)  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....0,50 g/50 ml agua destilada
- (7)  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  .....9,00 g/50 ml agua destilada
- (8)  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  .....0,31 g/50 ml agua destilada
- (9)  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .....4,36 g
- (9)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....3,15 g
- (9) Agua destilada.....hasta 800 ml

Dilución: 1 ml de (4), (5), (6), (7) y (8) en la disolución (9) y completar hasta 1 litro de agua destilada

### Disolución de vitaminas

- (10) Biotina.....1,09 mg/10,5 ml agua destilada
- (11) Cianocobalamina.....1,18 mg/10,5 ml agua destilada

Dilución: 1 ml (10), 1 ml (11), 20 mg tiamina hasta 100 ml de agua destilada.

**MEDIO DE CULTIVO:** 1 ml de (1), 1 ml de (2), 1 ml de (3), 1 ml de la disolución traza de metales y 0,5 ml de la disolución de vitaminas en 1 litro de agua de mar filtrada y esterilizada.

Los medios de cultivo que se emplean con más frecuencia son de dos tipos:

1. agua de mar enriquecida
2. medios totalmente artificiales

Los medios más usados son los primeros ya que resultan más baratos y fáciles de preparar.

### 1.1. AGUAS DE MAR ENRIQUECIDAS

Son aguas de mar limpias y filtradas para eliminar las materias que pudieran llevar en suspensión, a las que se añaden algunos compuestos que los organismos necesitan en cantidades grandes en relación a su concentración en el agua de mar.

Los enriquecimientos de agua con los principales nutrientes, como nitrógeno, fósforo, silicio y hierro, a veces dan buenos resultados, aunque lo más frecuente es que haya que añadir también otros compuestos que están en concentraciones más pequeñas en el mar y en los organismos como, p. ej., el molibdeno, cobre, zinc, cobalto o manganeso y aún otros, como los quelatantes, p. cje., EDTA o NTA, que evitan la toxicidad que pueden producir los elementos anteriores y que contribuyen a mantenerlos en disolución en el agua.

Este último grupo de compuestos puede añadirse a los medios de varias formas:

a) Poniendo concentraciones conocidas de cada uno, con lo cual el enriquecimiento se llama **definido**.

b) Añadiendo un extracto de suelo o de otro tipo, que contenga estos compuestos además de otros muchos y en concentraciones para nosotros desconocidas, por lo cual el enriquecimiento se denominará **indefinido**.

Los enriquecimientos definidos más empleados son los llamados **f/2 de Guillard**, el **ES de Provasoli** y el **Walne**. El indefinido más usado es el de **Erdschreiber**.

### 1.2. MEDIOS SINTETICOS O ARTIFICIALES

Los medios artificiales se fabrican a partir de agua bidestilada a la que se añaden los compuestos fundamentales del agua de mar más los correspondientes a un enriquecimiento muy completo. Los de uso más frecuente son los de **ASP de Provasoli**.

### 1.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS DOS TIPOS DE MEDIOS

Como se dijo anteriormente, se emplean más los medios de enriquecimiento que los sintéticos, si bien aquellos tienen como inconveniente que al usar como base grandes cantidades de agua de mar se hace necesario controlar constantemente la calidad del agua, ya que puede variar a lo largo del proceso por multitud de factores, desde por contaminación hasta por liberación de compuestos solubles por las propias poblaciones naturales de fitoplancton.

## Medio de cultivo de fitoplacton ES de Provasoli

### Disolución de nutrientes y trazas de metales

NaOH.....	4,6670 g
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O.....	3,0000 g
Na <sub>2</sub> gliceroPO <sub>4</sub> .....	0,6670 g
Na <sub>2</sub> EDTA.....	0,5530 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,3800 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O.....	0,2340 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O.....	0,0160 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O.....	0,0540 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,0073 g
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,0016 g

Agua destilada hasta 1 litro

Dilución: 10 ml de disolución por litro de cultivo.

### Disolución de Vitaminas

Tiamina HCl.....	0,1000 g
Vitamina B <sub>12</sub> .....	0,0020 g
Biotina.....	0,0010 g

Agua destilada hasta 1 litro

Dilución: 1 ml de disolución por litro de cultivo.

Por otra parte, los medios sintéticos permiten alterar con mayor facilidad su composición y, por tanto, ajustarla lo más posible a las características fisiológicas del plancton a cultivar.

Como inconvenientes de estos medios sintéticos, respecto de los enriquecidos, ya hemos citado su más alto precio y dificultad de preparación.

## 1.4. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

La preparación de los medios de cultivo es una labor que ha de hacerse cuidadosamente y, por ello, se eligen técnicas y métodos lo más sencillos y rápidos posible, que evitan el riesgo de que cualquiera de sus componentes se contamine con otras sustancias o sufra un tratamiento físico que altere sus características.

En la rutina del laboratorio, los compuestos a utilizar se mantienen almacenados en soluciones concentradas (**stocks o soluciones de reserva**), que se preparan con mucho cuidado para que no haya contaminación con otros compuestos.

En gran número de casos, estas reservas contienen un sólo compuesto pero, en otros contienen varios, lo cual reduce el número de adiciones que hay que hacer al agua del mar.

### 1.4.1. Reservas primarias y secundarias de los componentes

Para los compuestos que se añaden al agua en poca concentración, es posible hacer una serie de reservas llamadas **primarias**, con las que se preparan una o más **reservas secundarias**, que son las que realmente se añaden al agua de mar para hacer el medio.

Las reservas primarias, por tanto, se preparan pesando el compuesto de que se trate y disolviéndolo en agua destilada (preferiblemente bidestilada y desionizada) y los secundarios añadiendo los primarios a agua del mismo tipo.

Las reservas deben almacenarse en botellas que cierren herméticamente y preferiblemente de teflón o bien de vidrio de buena calidad, como el tipo Pyrex o el Durand.

### 1.4.2. Preparación del agua de mar

El otro componente de los enriquecimientos, el agua de mar, también ha de tratarse con sumo cuidado, cumpliendo las siguientes normas:

1. Recogerla de zonas lo más limpias posible.
2. Comprobar que la salinidad es la adecuada.
3. Almacenarla en recipientes que no sean tóxicos para las especies que se vayan a cultivar. En general, el vidrio es una buena elección.
4. Filtrarlas por filtros de poro de 0,45 µ para eliminar las partículas que lleva en suspensión.

## Tipos de medios de cultivo

AGUAS DE MAR ENRIQUECIDAS		SINTETICO
ENRIQUECIMIENTO DEFINIDO	ENRIQUECIMIENTO INDEFINIDO	
f2 GUILLARD		SERIE
ES de PROVASOLI	ERDSCHREIBER	ASP de
WALNE		PROVASOLI

La filtración puede hacerse con varios tipos distintos de filtros, según los empleemos para filtrar grandes o pequeños volúmenes de agua de mar y según el tamaño del poro requerido.

Para grandes volúmenes, los más usuales son los de filtro de bobina o de cartucho, que son filtros cilíndricos, de diferentes poros y materiales, incluidos en una carcasa a través de la cual circula el agua.

Normalmente los filtros de poros grandes, entre  $100 \mu$  y  $10 \mu$  e incluso hasta de  $1 \mu$  son de bobinas de algodón o de fibra sintética entrelazada. Los filtros de poro pequeño, entre  $0,45 \mu$  y  $0,22 \mu$ , son de fibra de vidrio o de membranas ésteres de celulosa. Ninguno de ellos es lavable, por lo cual deben tirarse una vez que se hayan colmatado.

Para pequeños volúmenes se usan filtros de membrana, que son pequeños discos, de 2,5 a 4,7 cm de diámetro, de ésteres de celulosa o de otros compuestos, que se colocan en equipos de filtración especiales a los que se acopla una bomba de vacío para acelerar la filtración. Los poros más frecuentes en estos filtros son de  $0,45$  y  $0,22 \mu$ .

## 1.5. PREPARACION DE RESERVAS Y ESTERILIZACION DEL MEDIO

Para que los cultivos no se contaminen con otras algas o con bacterias que los destruyan o hagan inservibles, el primer paso es esterilizar el medio de cultivo, es decir, matar todos los gérmenes contenidos en él.

Para conseguir la esterilización se emplean dos métodos fundamentales:

1. Esterilización del medio una vez preparado
2. Esterilización de todos los componentes del medio (reservas y agua de mar) y mezcla de éstos en condiciones estériles.

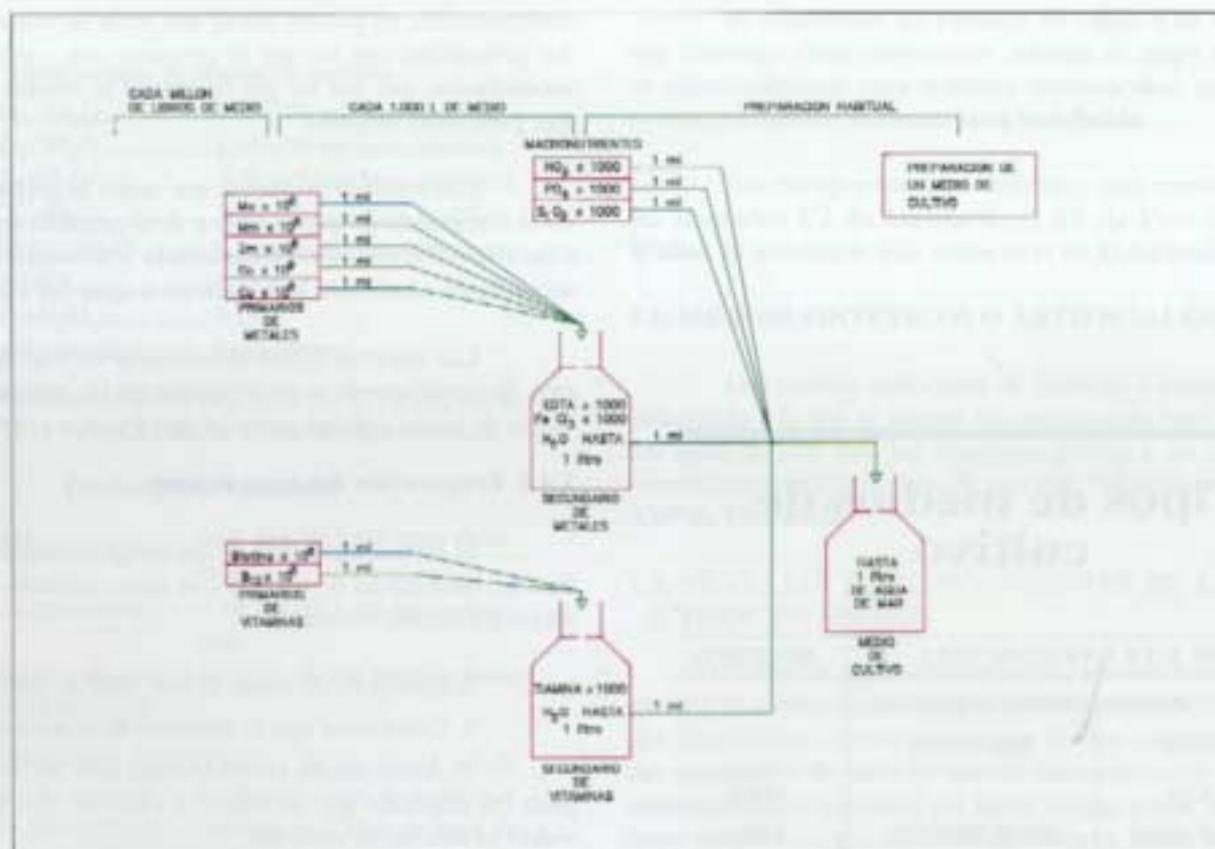
El método más aconsejable y empleado, es el segundo, porque altera menos las características físico-químicas del medio de cultivo.

La esterilización del medio de cultivo, o del agua y las reservas separadamente, puede hacerse por varios métodos. Los principales son:

- Autoclavado
- Tratamiento con microondas
- Tratamiento por Radiación Ultravioleta
- Tratamiento por lejía
- Pasteurizado, que es menos frecuente.

### 1.5.1. Autoclavado

El autoclavado consiste en poner el material que se quiere esterilizar a  $120^\circ\text{C}$  en una olla a presión o un autoclave y, mantenerlo en esas condiciones un tiempo determinado, que depende del tamaño y características de ese material.



Esquema de la preparación de los medios de cultivo.

Cuando se autoclava un líquido, el tiempo necesario para esterilizarlo es de, aproximadamente, 20 minutos para un litro y de 1 hora para 20 litros.

Una vez transcurrido ese tiempo, se baja la presión del autoclave a cero. Si se abre la salida de vapor del autoclave cuando la presión es mayor que cero. El líquido hierve muy intensamente y salta del recipiente que lo contiene, pudiendo dañar a la persona que opera con el autoclave.

Es frecuente que cuando se autoclave el medio de cultivo, parte de las adiciones que se hicieron precipiten, formando grumos que llevan, al menos, buena parte del hierro y fosfato, con lo que el valor del medio se anula o disminuye drásticamente.

Esta es una de las razones por las que es más conveniente el autoclavado o esterilización de los componentes del medio y del agua en recipientes separados, y después añadirlos en condiciones estériles.

Para realizar la adición (previamente esterilizados) de los componentes al agua de mar en condiciones estériles, lo aconsejable es realizar la operación en una cabina de flujo laminar, que es una cámara de cuyo frente (flujo laminar horizontal) sale hacia afuera un flujo de aire estéril que no permite que entre aire contaminado del exterior, por lo cual, siempre y cuando se tenga el cuidado de no realizar movimientos bruscos, puede trabajarse dentro en condiciones estériles.

Otro método empleado consiste en preparar el medio en una cámara o una pequeña habitación cerrada, pero con algo de ventilación por arriba, que esté muy limpia y en la que, previamente al inicio del trabajo de adición, se han encendido tubos ultravioletas que esterilizan las superficies. En estas cámaras o habitaciones, las bocas de todos los recipientes han de ser flameadas con un mechero Bunsen o un mechero de alcohol y hacer todas las operaciones cerca de la llama.

Naturalmente, todo el material a emplear tuvo que ser esterilizado previamente, por cualquiera de los métodos que estamos comentados o por calor seco en estufa.

### 1.5.2. Esterilización por microondas

Con un horno microondas, los métodos a seguir son los mismos que en el caso anterior, pero con la diferencia de que al ser la esterilización a menor temperatura y más rápida ( en un horno de potencia media, esterilizar un litro de agua requiere unos 10 minutos), en el caso de introducir el medio de cultivo completo se producen menos precipitados.

En la esterilización por microondas ha de tenerse especial cuidado de no usar ningún tipo de soporte o recipiente de metal y no introducir tapones con junta de goma u otros objetos que no resistan este tratamiento.

### 1.5.3. Esterilización por ultravioleta

Cuando una cantidad alta de luz ultravioleta incide sobre organismos, les produce la muerte. Esa cantidad puede lograrse de dos modos: con intensidades muy altas durante un corto período de tiempo o con intensidades más bajas durante más tiempo.

La técnica más frecuente consiste en la colocación en la tubería de agua de una o varias lámparas ultravioleta (UV) y regular el flujo para que esa luz tenga tiempo de matar todos o gran parte de los gérmenes presentes.

En el mercado existe una amplia gama de aparatos esterilizadores por ultravioleta, adaptados a las necesidades de la industria de cultivo fitoplanctónico, aunque no son difíciles de construir artesanalmente.

### 1.5.4. Esterilización por lejía

Para esterilizar con este producto es necesario tener el agua en algún recipiente muy grande, tales como bolsas de plástico, tanques o piscinas. Sobre el agua, se vierte una cierta cantidad de lejía y se deja durante algún tiempo para que surta el efecto esterilizador deseado. El tiempo de permanencia de la lejía dependerá de su concentración. Una vez que el agua ha sido esterilizada, se neutraliza la lejía con tiosulfato u otro producto, que no dañe los organismos a cultivar.

La lejía funciona como esterilizante porque al encontrarse en disolución produce átomos de Cl (cloro activo) que es muy destructivo para los seres vivos.

Existen otros compuestos que también producen cloro activo y que, por tanto, también pueden utilizarse.

## 1.6. MANIPULACION Y CONSERVACION DE LOS MEDIOS Y LAS RESERVAS

La manipulación del medio y de las reservas debe hacerse con las máximas precauciones para que no contaminen y debe trabajarse, por tanto, cuando sea posible, de la forma que ya indicamos para la preparación del medio. Las reservas deben mantenerse refrigeradas, con la excepción de las vitaminas que deben congelarse después de cada uso.

## 2 EQUIPAMIENTO PARA EL CULTIVO DEL FITOPLANCTON

Consta, fundamentalmente, de los siguientes elementos:

- Recipientes
- Materiales de pesada y volumetría
- Cámaras de cultivo
- Bombas

## 2.1. RECIPIENTES

Los recipientes empleados para el cultivo fitoplanctónico son muy variados, tanto en lo que se refiere a tipos y formas como en lo que se refiere a los materiales.

### 2.1.1. Tipos

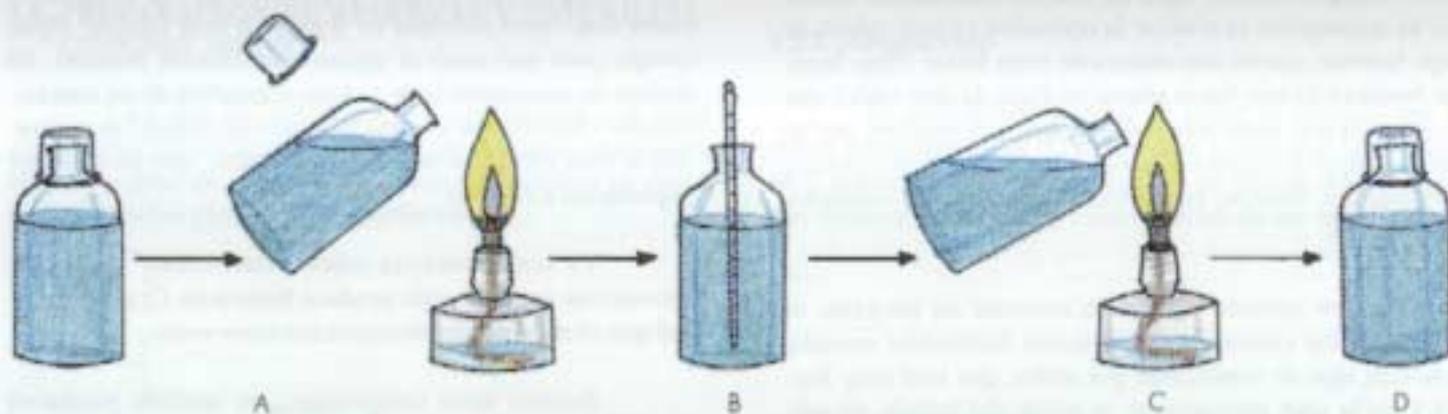
Los depósitos más usados son: tubos de ensayo, erlenmeyers, matraces o reactores, bolsas y tanques.

Para cultivos de pequeño volumen, que normalmente requieren muchos cuidados, como sucede p. eje., en el mantenimiento de las cepas, se usan tubos de ensayo con tapón de rosca, de presión e, incluso, de algodón. Hay que tener en cuenta, que siempre es necesario permitir el intercambio de aire entre el interior y el exterior del tubo, por lo que, cuando se usen tapones que no dejan poros, como los de rosca, hay que dejarlos sin apretar, para lo cual se cierran completamente y después se afloja entre 1/4 y 1 vuelta.

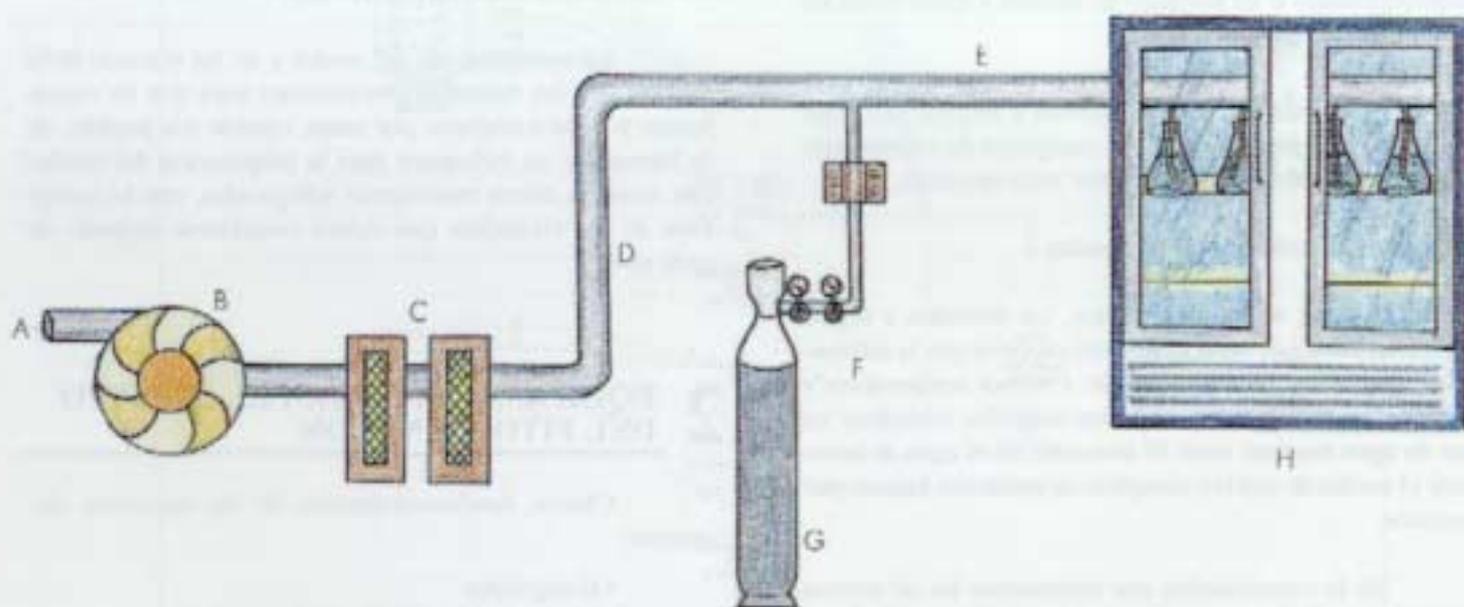
Para volúmenes entre 50 ml y 1 ó 2 litros, suelen usarse erlenmeyers del doble de capacidad que se llenan con medio de cultivo hasta la mitad de su volumen y quedan con una superficie de intercambio con el aire bastante grande, lo que favorece el paso del anhídrido carbónico al agua y evita que el fitoplancton deje de crecer por falta de este compuesto esencial.

Los tapones más usados en estos recipientes son los de rosca en los erlenmeyers pequeños, los vasos de precipitado colocados al revés en los más grandes, y los de algodón en cualquiera de ellos.

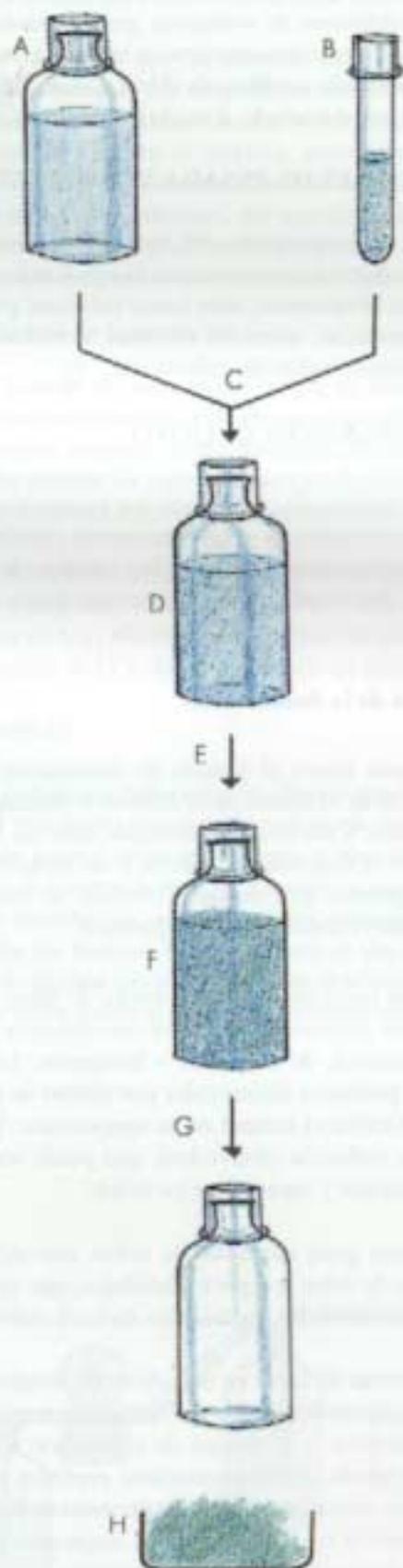
Los cultivos de mayores volúmenes necesitan que se burbujee aire o anhídrido carbónico a través de ellos y, por lo tanto, su forma es menos importante. Son muy usados tanto "balones" como todo tipo de botellas y reactores hasta de 30 litros.



**Trabajo a la llama.** A. Se destapa cerca de la llama. B. Se toma el volumen deseado con una pipeta estéril. C. Se pasa la boca del frasco por la llama. D. Se cierra.



**Instalación de aire y anhídrido carbónico en la unidad de cultivo fitoplanctónico.** A. Entrada de aire. B. Soplante. C. Filtros. D. Tubaría de aire a presión. E. Tubaría de un flujo de  $\text{CO}_2$ . F. Manómetro regulador. G. Botella de  $\text{CO}_2$ . H. Cámara de Cultivo.



**Cultivo por lotes.** A. Medio. B. Inóculo. C. Inoculación. D. Cultivo. E. Crecimiento. F. Cultivo concentrado. G. Cosecha. H. Cultivo utilizado.

Los tapones de estos recipientes deben tener al menos un paso para el aire que hay que burbujear, otro para su salida, y es conveniente disponer de un tercer paso para la toma de muestra por pipeteo. En muchas ocasiones, sobre todo cuando se trata de especies de crecimiento rápido y cuando los cultivos no se van a usar como inóculo de otros, se pueden tapar con papel de aluminio o con algún plástico para sellado de recipientes, como "Parafilm", a los que se hace un orificio para pasar las varillas de aireación. De todas formas es más aconsejable el uso de tapones que estos otros productos, ya que se reduce mucho el riesgo de contaminación por otras especies o bacterias.

En volúmenes aún más grandes (30 a 500 litros) se pueden emplear tanques cilíndricos o bolsas de plástico. Por encima de estos volúmenes, únicamente se usan tanques o piscinas especialmente diseñadas para el cultivo de fitoplancton.

### 2.1.2. Materiales

Los materiales empleados para la fabricación de recipientes de cultivo de fitoplancton son muy variados, aunque los más abundantes son los plásticos y los vidrios.

El vidrio se emplea, sobre todo, en recipientes pequeños, como tubos de ensayo y erlenmeyers y en menor medida en depósitos de más de 5 litros. Probablemente los mejores vidrios para el cultivo son los **Durand** o los **Pyrex**, que son borosilicatos ampliamente representados en el mercado, bajo gran número de marcas.

La principal ventaja de los vidrios es que resultan transparentes e incoloros, con lo cual no se modifica el tipo de luz que llega al cultivo, se reduce muy poco su intensidad, permite ver el estado del cultivo y comprobar visualmente la limpieza del recipiente una vez lavado. Además, es poco o nada tóxico para la mayor parte de las especies que se cultivan con destino a la alimentación de moluscos. Sus mayores desventajas son el precio, que puede resultar alto, y la facilidad de rotura.

Algunos plásticos, como el **policarbonato** o la **polisulfona**, especialmente el primero, pueden usarse en el mismo tipo de recipientes que el vidrio. Sin embargo, presentan el inconveniente de que, aunque son transparentes, sus paredes no son tan lisas como las del vidrio y es más difícil ver a su través. Particularmente, la polisulfona tiene un color amarillento y el policarbonato va perdiendo transparencia a medida que se expone a medios alcalinos (como el agua de mar), especialmente en caliente.

Algunas especies concretas pueden crecer mejor en alguno de estos plásticos que en recipientes de vidrio, pero otras, por el contrario, se ven perjudicadas. Por esta circunstancia, en ocasiones, se emplean otros materiales plásticos, como el **polietileno** o el **poliestireno**, pese a que pueden presentar problemas de toxicidad para muchas especies, no ser autoclavables y, en el caso del polietileno

no ser transparente. En cualquier caso, si las especies a cultivar toleran estos recipientes, el cultivo puede realizarse en ellos, bien comprándolos estériles, bien esterizándolos por un método diferente del autoclavado.

Los recipientes de volúmenes grandes pueden ser de muchos materiales, pero frecuentemente se emplean los fabricados con **poliester reforzado con fibra de vidrio**. Cuanto más tradicionales sean mejor será el resultado, al incidir más luz sobre el cultivo.

## 2.2. MATERIALES DE PESADA Y VOLUMETRIA

Para la preparación del medio de cultivo y su reparto en recipientes son necesarios diversos materiales de uso general en laboratorios, tales como balanzas, pipetas de vidrio o automáticas, matraces aforados, dosificadores de líquidos, preferentemente de émbolo, etc.

## 2.3. LAS CAMARAS DE CULTIVO

Las cámaras de cultivo son los lugares en los que se mantienen los cultivos y que conservan constantes las condiciones ambientales de estos. Hay cámaras de tamaño muy variado, desde habitaciones completas hasta otras tan pequeñas como una estufa de desecación.

### 2.3.1. Control de la iluminación

Algunas tienen el sistema de iluminación dentro, mientras que otras lo tienen en el exterior e iluminan a través de cristales. Casi siempre coincide que las cámaras grandes tienen la iluminación interior y las pequeñas exterior, lo que permite que, en estas últimas, se realice con mayor facilidad el control de la temperatura.

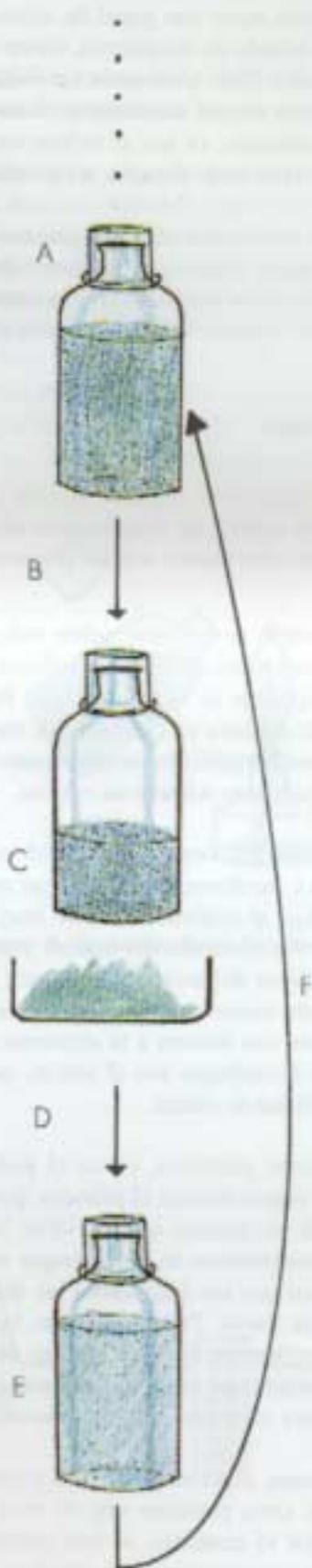
La luz suele aportarse por medio de tubos fluorescentes, ya que presentan menos inconvenientes que las bombillas normales, de tungsteno o halógenas. Los tubos fluorescentes producen menos calor por unidad de iluminación, lo que facilita el control de la temperatura. También emiten menos radiación ultravioleta, que puede ser dañina para el fitoplancton y reparten mejor la luz.

Existen gran variedad de tubos con diferentes características de color o espectro lumínico, que se pueden elegir dependiendo de las necesidades de cada cultivo.

El control de la luz en un cultivo de fitoplancton se realiza seleccionando el tipo de radiación a utilizar, el número de lámparas y el tiempo de exposición a las mismas. De este modo, pueden simularse períodos de día y noche, que son importantes para el crecimiento de algunas especies, si bien la mayor parte de las empleadas para alimentación de moluscos prefieren luz continua.

### 2.3.2. Control de la temperatura

Con el fin de que la temperatura se mantenga siempre en el rango seleccionado, su control ha de ser bastante



**Cultivo semicontinuo.** A. Cultivo concentrado. B. Cosecha parcial. C. Cultivo utilizado. D. Refiltrado. E. Cultivo diluido. F. Crecimiento.

exacto. Para ello se emplean termostatos que actúan sobre equipos de refrigeración del tipo de los que tienen las neveras o cámaras frigoríficas, combinados con calefactores que aseguren que la temperatura sea lo suficientemente alta cuando la temperatura exterior desciende mucho.

A pesar de que las cámaras de cultivo tienen un sistema para mezclar y homogeneizar el aire, incluso en las más pequeñas es frecuente encontrar diferencias importantes de temperatura en el interior, especialmente si hay estantes o cualquier otra estructura que reduzca el paso del aire a determinados rincones. En aquellos cultivos, en los que diferencias de un grado o dos puede tener cierta importancia, es necesario tener en cuenta este hecho.

### 2.3.3. Control de la aireación

Cuando el volumen del cultivo es mayor que 1 ó 2 litros, es necesario airearlo, a fin de que no se agote el  $\text{CO}_2$  que el fitoplancton consume en la fotosíntesis. Por ello, es necesario que las cámaras de cultivo dispongan de instalaciones para la entrada de aire enriquecido o no con anhídrido carbónico.

Estas instalaciones consisten en un sistema de conducción o tuberías, usualmente de PVC, que parten de un compresor de baja presión. En el circuito se suele incluir una toma regulada de  $\text{CO}_2$  desde una botella de anhídrido líquido.

## 2.4. BOMBAS

Cuando los cultivos son de volumen grande es necesario llenar los recipientes con agua, lo cual puede hacerse desde la conducción general de las instalaciones o bien desde depósitos, por medio de bombas de trasiego. También la cosecha de los cultivos y la reconducción de éstos hasta los estanques donde están estabulados los bivalvos, hacen necesario el uso de bombas de trasiego en algunos casos, y de bombas dosificadoras en otros, cuando se desea aportar el cultivo en cantidades controladas.

El manejo de cualquier tipo de bomba requiere que esté bien aislada del agua y que su manejo, al igual que el de los cables de la conducción eléctrica, se realice con sumo cuidado, dado el peligro que supone la corriente eléctrica, sobre todo cuando se trabaja con agua de mar, que es buena conductora.

Las bombas de trasiego empleadas en la sala de fitoplancton no deben ser de mucha velocidad y, en el supuesto de que la bomba tenga velocidad regulable, debe usarse a las más bajas. De este modo se evita la rotura de células del fitoplancton, que pudieran hacer aumentar la materia orgánica disuelta en el agua y disminuir la densidad del cultivo. Especialmente peligroso es el acúmulo de materia orgánica disuelta ya que propicia el rápido desarrollo de bacterias indeseadas que pueden afectar a los organismos que se alimentarían con el cultivo fitoplanctónico.

Este problema está muy reducido en las bombas dosificadoras, puesto que impulsan el líquido por medio de pistones que se mueven a baja velocidad. En el mercado existe una amplia gama de bombas dosificadoras, capaces de dosificar líquidos en un rango determinado de flujos, como p. ej., entre 1 y 10 litros/hora, lo que permite elegir las según las necesidades.

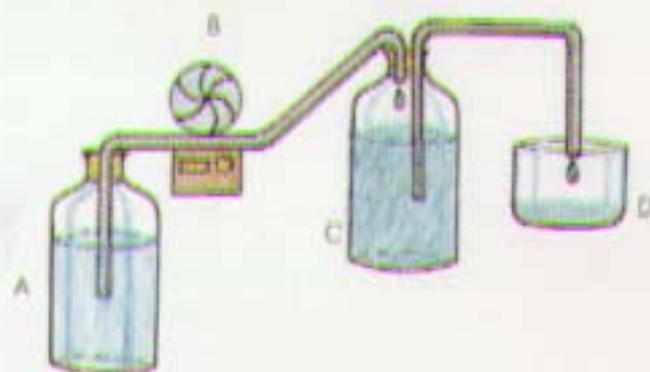
## 3 TIPOS DE CULTIVO

Considerando la forma en la que se cosecha el cultivo y la forma en la que se aporta el medio, pueden definirse tres tipos de cultivos fundamentales:

- Cultivo por lotes
- Cultivo semicontinuo
- Cultivo continuo

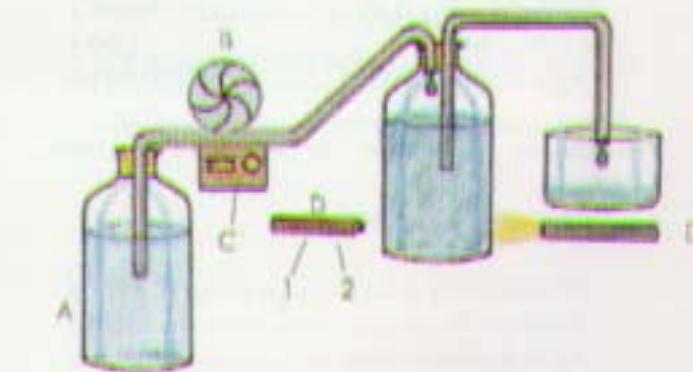
### Aplicaciones

El cultivo continuo puede ser de tipo *quimioestato* o *turbidostato*.



**Cultivo continuo quimioestato.** A. Medio de cultivo. B. Bomba. C. Cultivo. D. Cultivo utilizado.

El cultivo continuo puede ser de tipo *quimioestato* o *turbidostato*.



**Cultivo continuo turbidostato.** A. Medio de cultivo. B. Bomba. C. Controlador. D. Detector (1. Flujo luz; arranca la bomba. 2. Mucha luz; para la bomba). E. Emisor de luz.

En el cultivo por lotes, el medio se aporta de una sola vez al principio. Sobre el medio, se inocula el fitoplancton y se deja crecer hasta que llega a un punto determinado de la fase estacionaria. En este momento se cosecha la totalidad.

En el cultivo semicontinuo, cada cierto período de tiempo se cosecha una parte del cultivo y se añade un volumen igual de medio fresco para que el cultivo siga creciendo.

En el cultivo continuo, la cosecha se realiza constantemente o en períodos de tiempo muy cortos, al tiempo que se va adicionando el medio en un volumen igual al cultivo retirado.

En este tipo de cultivo, la velocidad a la que se añade el medio y, por tanto, la velocidad a la que se cosecha, es tal que mantiene constante la concentración. Hay dos formas fundamentales de controlar esa concentración del cultivo:

1. Aportar una cantidad limitada de un compuesto químico fundamental y dejar que el cultivo crezca a la velocidad a la que se aporta ese compuesto. El cultivo continuo que emplea este método, se denomina **quimiostato** o **quemostato**.

2. Medir la concentración del cultivo por medio de la luz que absorbe o dispersa y regular el aporte al medio y, por tanto, la cosecha, de modo que la luz absorbida sea constante. Dado que, en realidad, lo que estos cultivos mantienen constante es la turbidez, se les conoce con el nombre de **turbidostatos**.

En cualquier tipo de cultivo continuo hay que tener muy en cuenta la fisiología de la especie cultivada y es especialmente importante regular los flujos (en el caso de los quimiostatos) o las concentraciones (en el caso de los turbidostatos), de forma que las especies no entren en fase estacionaria, ya que de lo contrario, es relativamente fácil que el cultivo se malogre.

## Medio de cultivo para fitoplancton de WALNE (para volúmenes de hasta 30 l)

### Disolución de sales

FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O .....	2,60 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	0,72 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	67,20 g
EDTA .....	90,00 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O .....	40,00 g
NaNO <sub>3</sub> .....	200,00 g
Disolución de oligoelementos .....	2,00 ml
Agua destilada hasta .....	2,00 l

Dilución: 1 ml por litro de cultivo. Si se trata de diatomeas, se añadirá además 0,03 g/l de silicato sódico.

### Disolución de oligoelementos

ZnCl <sub>2</sub> .....	2,10 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O .....	2,00 g
(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·11H <sub>2</sub> O .....	0,90 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O .....	2,00 g
Agua destilada hasta .....	100,00 ml

Dilución: 1 ml por litro de la disolución de sales.

### Disolución de vitaminas

Vitamina B <sub>12</sub> .....	0,01 g
Vitamina B <sub>1</sub> .....	0,20 g
Agua destilada hasta .....	200,00 ml

Dilución: 0,1 ml por litro de cultivo.

## Autoevaluación

**1** ¿Qué son sustancias quelatantes? ¿Qué función desempeñan en los medios de cultivo de fitoplancton? ¿Cuáles son las más empleadas?

**2** Dada la definición, encuentra el término definido:

- Cámara empleada en trabajos de laboratorio de cuyo frente sale hacia afuera un flujo de aire estéril que no permite que entre aire contaminado del exterior
- Sal derivada del ácido sulfúrico empleada en la neutralización de la lejía
- Cultivo de fitoplancton continuo en el que la concentración se controla cuantificando la luz absorbida

## Conoce tu entorno

**1** Esencialmente, el cultivo de fitoplancton requiere los mismos elementos que la agricultura intensiva: luz,  $\text{CO}_2$ , semillas, sustrato y abono. Señala las diferencias o similitudes que, con respecto a estos elementos, pueden establecerse en el cuadro:

	CULTIVO DE FITOPLANCTON	CULTIVO AGRICOLA
Fuente de luz		
Sustrato		
Simiente		
Fuente de $\text{CO}_2$		

**2** Pregunta en una tienda especializada de productos agrícolas la composición química de un abono comercial y compárala con la de un medio de enriquecimiento definido y otro indefinido. ¿Qué conclusiones puedes deducir?

## Aplicaciones

**1** Elabora un listado del material, aparatos y sustancias necesarias para la preparación del medio Walne.

**2** Relaciona y define los pares de términos:

- Enriquecimiento del medio de cultivo - Abonado agrícola
- Enriquecimiento definido - Abono químico
- Enriquecimiento indefinido - Estercolado

# 3

## La dinámica de los cultivos

### Contenido

#### 1. Control del crecimiento

- 1.1. Contaje del número de células de un cultivo (recuento)
  - 1.1.1. Recuentos al microscopio
  - 1.1.2. Recuentos automáticos
  - 1.1.3. Otros métodos de contaje de fitoplancton

#### 2. Mantenimiento de los cultivos. Las colecciones

- 2.1. Inoculación sucesiva

#### 3. Control del estado de los cultivos

- 3.1. Contaminación con otras especies de fitoplancton
- 3.2. Contaminación bacteriana

Es evidente que para conocer el estado de un cultivo hay que seguir su evolución (crecimiento) y que, por lo tanto, es preciso disponer de algún método que permita cuantificar la biomasa de dicho cultivo.

### 1 CONTROL DEL CRECIMIENTO

Para seguir la evolución de un cultivo fitoplanctónico pueden usarse varios métodos, que pueden reducirse a dos técnicas fundamentales:

- Contaje del número de células presentes en un momento dado.
- Estima de la biomasa global en un determinado instante.

Para el primero de los métodos pueden emplearse varias técnicas que tienen en común el hecho de basarse en la técnica del muestreo, es decir, del recuento de células presentes en una, dos o más muestras significativas del cultivo a estudiar y posterior cálculo del número total de células en todo el cultivo o en una unidad de volumen (en este último caso, frecuentemente, el resultado se expresa en nº de células por mililitro).

#### 1.1. CONTAJE DEL NUMERO DE CELULAS DE UN CULTIVO ( RECUESTO )

En este caso, las técnicas empleadas más frecuentemente son:

- ° Recuento al microscopio.
  - Sobre hematocitómetro.
  - Con microscopio invertido (Utermöhl).
- Recuento automático.
  - Contador de pulso eléctrico (Coulter).
  - Contador automático mediante citómetro de flujo.

##### 1.1.1. Recuento al microscopio

Uno de los métodos más usados para el cálculo del número de células de un cultivo de fitoplancton es el de los recuentos microscópicos, que consisten en contar, con la ayuda de un microscopio, las células que hay en un determinado volumen del cultivo. Existen varias técnicas que se pueden emplear para hacer estos recuentos y la elección de una u otra depende de la concentración de células en el cultivo y del tamaño y tipo de éstas.

En este texto, consideraremos dos: el recuento microscópico sobre hematocitómetro y el recuento con microscopio invertido.

#### • Recuento sobre hematocitómetro

Con organismos pequeños y unicelulares o de cadenas cortas, el sistema de recuento al microscopio más empleado es el recuento con hematocitómetros, también llamados cámaras cuentaglóbulos.

Básicamente, las cámaras cuentaglóbulos son piezas de vidrio con tres plataformas, dos laterales y una central, ancha, que tiene una retícula grabada. Las dos plataformas laterales tienen más altura que la central (normalmente una décima de milímetro más) y en ellas se apoya una lámina de vidrio muy fina que se fija fuertemente con unas pinzas.

Con una pipeta Pasteur se deposita una gota de la muestra en la cámara, de modo que invada todo el área rayada. Una vez llenas las dos cavidades se cuenta toda o parte del área rayada y se determina la concentración de fitoplancton.

Una cámara cuentaglóbulos Neubauer, p. ej., tiene un volumen total de  $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,9 \mu\text{l}$ , por lo cual en muestras que tengan menos de 1,1 células/ $\mu\text{l}$  no encontraríamos ninguna célula en toda la cámara y, por tanto, esta técnica no es adecuada para estos casos. Si además tenemos en cuenta que deben contarse al menos 50 células, para que la variación entre varios recuentos de la misma muestra no sea muy grande, podemos concluir que las cámaras cuentaglóbulos funcionan mal con concentraciones más bajas que 55 cts/ $\mu\text{l}$  y por tanto hay que recurrir a otras técnicas, como, p. ej., la de Utermöhl.

#### • Recuento con microscopio invertido (Utermöhl)

Aunque esta técnica es poco utilizada en la industria se emplea habitualmente en estudios de fitoplancton natural o en cultivos cuyo número de células por unidad de volumen sea relativamente bajo.

Este método consiste en la utilización de cubetas especiales, que tienen el fondo de cristal muy fino, y dentro de las cuales se pone el agua, dejando que las células que hay en ella sedimenten durante un cierto tiempo, frecuentemente 24 horas o más. Una vez que las células se han sedimentado y, por lo tanto, están apoyadas sobre el cristal del fondo, se cuentan utilizando un microscopio invertido, que tiene los objetivos mirando hacia arriba, lo que permite ver el fondo de la cubeta.

Normalmente no se cuenta toda la cubeta sino una fracción de ella. La conversión del número de células contadas a la concentración que representa es muy fácil, ya que el área total del fondo de la cubeta corresponde a todo el volumen y por lo tanto a una fracción determinada de área corresponderá la misma fracción del volumen.

#### 1.1.2. Recuentos automáticos

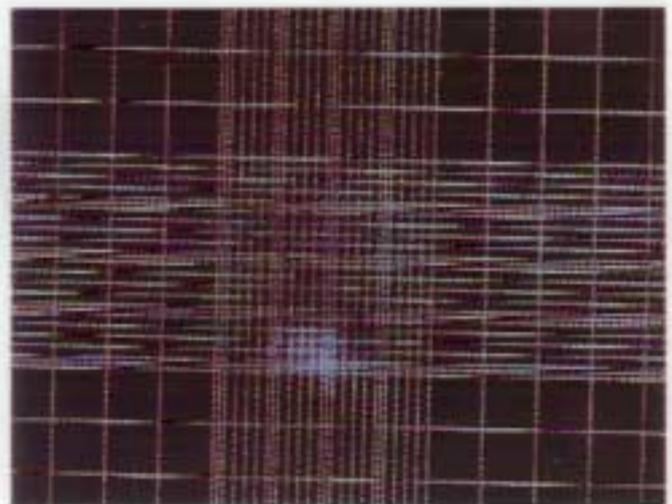
Los recuentos al microscopio, aunque ampliamente utilizados en la industria de cultivo, tienen el grave

inconveniente de ser laboriosos y lentos. Esta circunstancia impulsó la investigación y descubrimiento de nuevos métodos más exactos, sencillos y rápidos. Entre estas alternativas al recuento microscópico clásico, se encuentran los **recuentos automáticos**, que cuantifican la concentración de los cultivos mediante **contadores**, entre los que destacan dos modelos fundamentales: los contadores de tipo **Coulter** de pulso eléctrico y los **citómetros de flujo**.

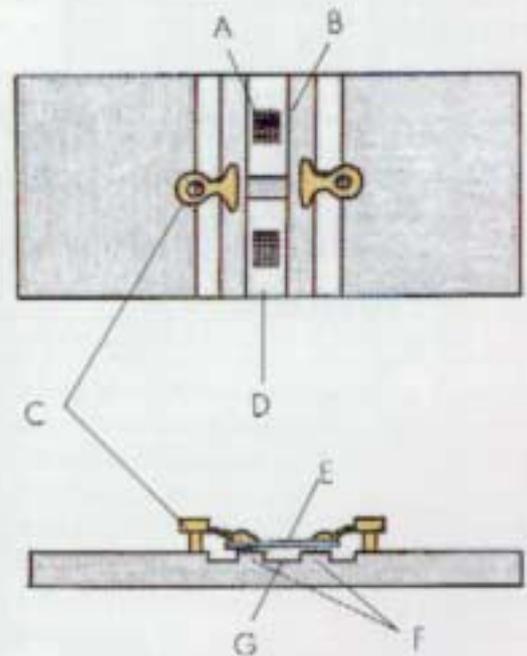
#### • Contadores de pulso eléctrico

Estos aparatos se basan en el hecho de que al pasar una partícula a través de un orificio en el que existe un campo eléctrico, se produce un cambio en la intensidad de la corriente proporcional, entre otras características, al tamaño de la partícula.

El recuento de los pulsos eléctricos que se producen al pasar un volumen determinado de agua por el orifi-



Área rayada de una cámara cuentaglóbulos Neubauer.



Hematocitómetro. A. Área rayada. B. Plataformas laterales. C. Pinzas. D. Fluido de Coulter. E. Lámina de vidrio. F. Plataformas laterales. G. Plataforma central.

## Descripción de área rayada de un hematocitómetro

Cada tipo de cámara cuentaglóbulos tiene un área rayada de diferente forma. El tipo más corriente es el **Neubauer**, que tiene una superficie rayada de 3 x 3 mm. Cada lado está dividido en 12 partes, por lo cual se forman 12 x 12 cuadrados de 0,25 mm de lado. Las 4 divisiones centrales de cada lado, se dividen a su vez, en 5 partes, dando lugar a una especie de cruz en la que los brazos están divididos en rectángulos de 0,25 x 0,05 mm y la parte central está dividida en cuadrados de 0,05 x 0,05 mm. Por último, la primera de cada una de las 5 divisiones que acabamos de describir, está dividida en dos, formando cuadrados y rectángulos más pequeños.

## Reinóculos en la inoculación sucesiva

La frecuencia de las transferencias o reinóculos para mantener en adecuadas condiciones las colecciones de cultivo, es muy variable y depende de numerosos factores, entre los que destacan: la especie que se colecciona y el tamaño del inóculo inicial empleado, además de la concentración de nutrientes en el medio, etc.

En general, por lo práctico que resulta a la hora de organizar el trabajo, los reinóculos se realizan tomando como base la semana, si bien cualquier otro criterio puede resultar adecuado.

## Estado fisiológico de los reinóculos

Antes de iniciar la inoculación ha de procurarse que los inóculos estén en buen estado fisiológico. Cuando un cultivo es viejo tiene muchas bacterias y lleva demasiado tiempo con escasez de nutrientes o con altas concentraciones celulares. Esto producirá un mal inóculo que, al ser transferido al medio fresco, probablemente morirá y no conseguirá formar un nuevo cultivo o, en el mejor de los casos, morirán muchas células liberándose gran cantidad de materia orgánica al medio, que aprovecharán las bacterias para crecer, dañando el fitoplancton.

Esto nos permite conocer no sólo el número de partículas total que hay en ese volumen, si no también, el número de partículas que hay para cada tamaño (los contadores más usados pueden distinguir más de 200 clases de tamaños), por lo que si conocemos el tamaño de las células que queremos contar podemos distinguirlas de cualesquiera otras partículas que pudiera haber en el agua.

### • Citómetros de flujo

Aunque especialmente caros, los citómetros de flujo son relativamente frecuentes los centros de investigación. Su funcionamiento se basa en pasar agua con fitoplancton a través de un flujo muy fino sobre el cual incide un láser y medir la dispersión de la luz del rayo mediante unos detectores. Por éste mecanismo se puede conocer el tamaño de las partículas, células incluidas, que hay en ese volumen de agua. Dado que en los citómetros de flujo también se mide la intensidad y tipo de fluorescencia, se puede distinguir con facilidad las células de fitoplancton de las que no lo son.

### 1.1.3. Otros métodos de contaje de fitoplancton

Otras técnicas empleadas para estimar la biomasa del fitoplancton no cuantifican el número de células sino la



*Microscopio invertido.*

biomasa total. Entre estos métodos alternativos destacamos los dos más conocidos y extendidos: el contaje por **espectrofotometría** y por **fluorometría**.

• La espectrofotometría es una técnica de medición de la absorción de luz de una longitud de onda determinada por un objeto.

Los cultivos de fitoplancton además de dispersar luz, la absorben, de forma que si hacemos pasar luz de una longitud de onda determinada a través de un cultivo parte de esta luz será absorbida y, por tanto, la luz que salga será tanto menor cuanto mayor sea el número de células que haya en el cultivo. Midiendo ese descenso de la luz a la salida del cultivo, podremos conocer la cantidad de células que hay en el medio.

En estas mediciones hay que tener en cuenta el hecho de que el fitoplancton tiene pigmentos (clorofilas y carotinoides) que absorben la luz de longitudes de onda determinadas y que, en consecuencia, la reducción de luz será mas fuerte cuando se usan esas longitudes de onda (665 nm para células verdes, sin carotinoides, y 430 nm para células marronáceas, con carotinoides) que cuando se usen otras.

• Las técnicas fluorométricas se basan en que la clorofila contenida en las células de fitoplancton, cuando recibe la luz azul, parte de ella la utiliza para la fotosíntesis y otra parte la pierde por diversos mecanismos. Entre esos mecanismos destaca la emisión de fluorescencia, es decir, la emisión de luz de longitud de onda más larga de la que recibió. De esto puede deducirse que cuanto más clorofila haya en el cultivo, más fluorescencia emitirá. Dicho de otro modo: la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de clorofila y ésta, a su vez, proporcional a la cantidad de fitoplancton.

La fluorescencia emitida se mide con aparatos especiales llamados **fluorómetros**, y las mediciones pueden hacerse directamente sobre los cultivos, sin dañar las células, o bien separando los pigmentos de las células, filtrando el agua y, posteriormente, colocando el filtro en acetona. En el primer caso la fluorescencia se denomina **in vivo** y en el segundo **extractiva**, ya que los pigmentos que la producen se "extraen" de las células con la acetona.

El primer procedimiento es más sencillo, pero más inexacto que el segundo, ya que la fluorescencia está en parte afectada por la forma en que los pigmentos están agrupados en las células y por el estado fisiológico de estas. En la fluorescencia extractiva esto, naturalmente, no sucede.



Contador tipo Coulter de pulso eléctrico

## 2 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS. LAS COLECCIONES

Las especies que se usan para cultivos experimentales o industriales han de mantenerse vivas y sin contaminaciones para poder usarlas cuando sea necesario. Esto se lleva a cabo con las denominadas **colecciones de cultivo**.

Existen grandes colecciones de fitoplancton en diversos lugares del mundo, pero lo normal es que cada empresa o centro de investigación mantenga una pequeña colección con las especies de uso habitual. Esto requiere una técnica de mantenimiento de los cultivos que, generalmente, es la **inoculación sucesiva**.

### 2.1. INOCULACION SUCESIVA

Esta técnica consiste en permitir que los cultivos crezcan hasta que lleguen casi a agotar los nutrientes y, en ese punto, tomar una pequeña cantidad de cultivo y ponerlo (**inoculación**) en un medio de cultivo nuevo rico en nutrientes. Este nuevo cultivo se deja crecer y cuando está a punto de agotar los nutrientes se comienza el proceso de nuevo.

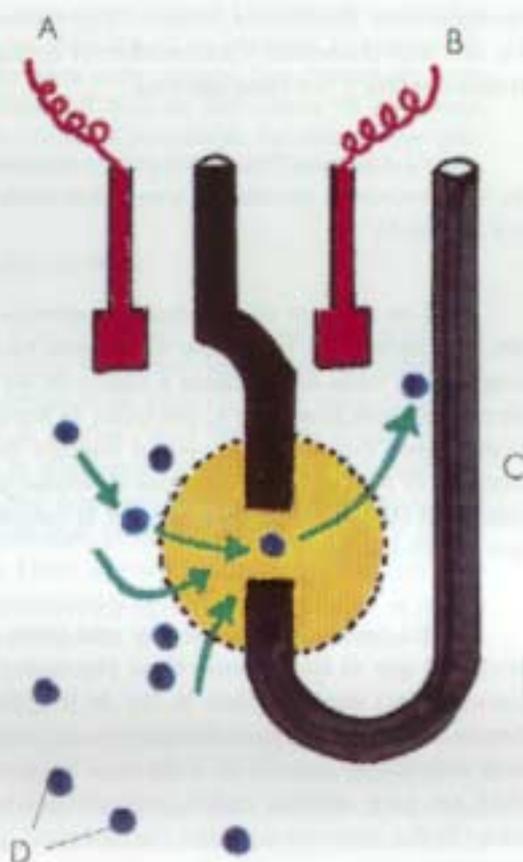
Con el objetivo de garantizar el buen desarrollo de los cultivos, esta técnica de la inoculación sucesiva, exige cumplir una serie de normas elementales que, en síntesis, podemos enumerar del siguiente modo:

- Control, lo más rigurosos posible, de la esterilización de todos los materiales y sustancias empleados.
- Control de la frecuencia de las transferencias o reinóculos y de las condiciones en las que se realiza para lo cual se han de seguir los mismos métodos y pasos descritos en la preparación de medios.
- Empleo de inóculos en buen estado fisiológico.
- Ajustar el tamaño del inóculo, según la especie de que se trate.
- Conveniencia de mantener duplicados.

## 3 CONTROL DEL ESTADO DE LOS CULTIVOS

Es absolutamente necesario controlar periódicamente el estado de los cultivos, especialmente las colecciones, por medio de exámenes al microscopio.

Aunque los cultivos y colecciones se realicen con sumo cuidado y atención, siempre hay riesgo de contaminaciones, sobre todo de contaminación con otras especies fitoplanctónicas no deseadas y de contaminación bacteriana.



Esquema funcionamiento de un contador tipo Coulter A. Electrodo externo. B. Electrodo interno. C. Tubo. D. Partículas en el electrodo.



Espectrofotómetro.

## Tamaño del inóculo

Antes de iniciar la inoculación es conveniente ajustar el tamaño del inóculo considerando varios factores:

- Diferentes especies requieren inóculos iniciales de distinto tamaño, por lo que será preciso considerar, en primer lugar, la especie objeto de cultivo.

- Los inóculos muy pequeños, es decir, con pocas células, pueden provocar la pérdida del cultivo por azar. Además son más sensibles a cualquier producto tóxico que pudiera albergar, pese a todos los cuidados, el medio.

- Los inóculos grandes llevan a que el medio se agote antes y, por tanto, a la necesidad de reinocular más frecuentemente, con el consiguiente riesgo. Por otro lado, estos inóculos de muchas células suelen llevar más bacterias que los pequeños, lo cual perjudica al fitoplancton.

Dada la dificultad de establecer unas normas generales que indiquen el tamaño ideal del inóculo, su determinación es una cuestión que depende más de la práctica y experiencia del investigador y cultivador, en cada lugar y circunstancia concretas, que de ninguna otra cosa.

## 3.1. CONTAMINACION CON OTRAS ESPECIES DE FITOPLANCTON

Para detectar que un cultivo fitoplanctónico está contaminado por otras especies, también fitoplanctónicas, son necesarias dos cosas:

- Conocer bien el aspecto de la especie que se cultiva, en diferentes condiciones fisiológicas.

- Hacer inspecciones frecuentes de los cultivos.

Cuando un cultivo se contamina con otra especie de fitoplancton, se recurre a varias técnicas para solucionar el problema. La más sencilla es utilizar el o los duplicados que deben existir. En caso de que los duplicados no pueden usarse, hay que proceder al aislamiento, para lo cual se emplean dos métodos fundamentales: las **diluciones seriadas** y el **aislamiento con micropipeta**.

La técnica de diluciones seriadas se basa en el hecho de que cuando un cultivo se va diluyendo cada vez más, llega un momento en que en todo el volumen queda solamente una célula y, por tanto, al multiplicarse ésta el cultivo resultante está libre de cualquier otra especie.

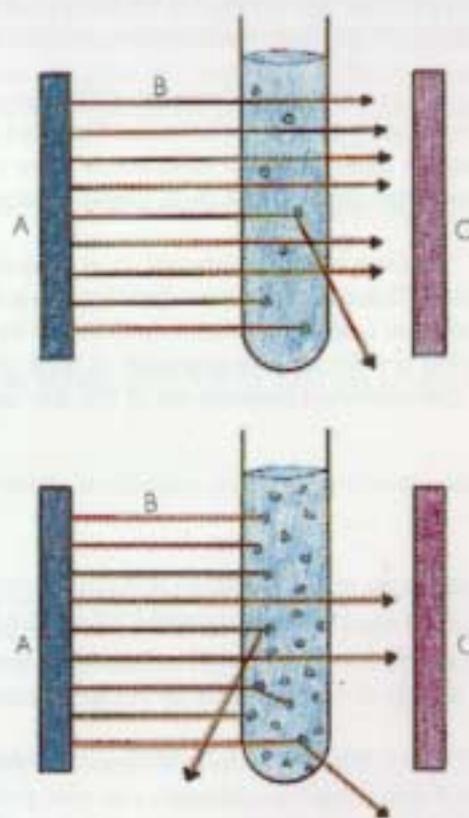
El aislamiento con micropipeta consiste en coger una sola célula con una pipeta muy fina, ya sea una pipeta Pasteur o una pipeta fabricada en el propio laboratorio estirando a la llama pequeños tubos de vidrio.

## Duplicados

En toda colección de fitoplancton es siempre aconsejable mantener, al menos, duplicados que han de mantenerse en instalaciones separadas para evitar pérdidas y limitar los riesgos. Para ello se emplean dos métodos fundamentales:

1. En cada transferencia se hacen dos series de cultivos nuevos que se almacenan en lugares diferentes.

2. Se hace la transferencia de tal forma que si la reinoculada no crece, hay tiempo para volver a reinocular del cultivo viejo antes de que se deteriore.



Base de la medición de biomasa con espectrofotometría. A. Emisor. B. Luz. C. Detector.

### 3.2. CONTAMINACION BACTERIANA

La contaminación bacteriana se produce cuando los cultivos no se manipulan como se debe o cuando se permite que entren en fase de senescencia. Cuando esta contaminación se produce, los cultivos se ponen turbios, con un color blanquecino y, en ocasiones, se aprecia la formación de grumos.

Si se llega a esta situación, hay que hacer, durante un tiempo, una serie de transferencias rápidas, no dejando que el fitoplancton crezca mucho.

En el caso de que no fuese suficiente, debe recurrirse a alguna de las técnicas descritas para eliminar la contaminación por otras especies fitoplanctónicas o, en último caso, hacer tratamientos con antibióticos que, en lo posible, deben evitarse y que, en algunos casos, incluso están prohibidos.



*El control periódico de los cultivos fitoplanctónicos es una tarea esencial para el cultivador.*

## Conservación de muestras de fitoplancton

En ocasiones no es posible contar las células en el momento o es necesario matarlas para poderlas contar. En estos casos se emplean soluciones conservantes que se añaden a las muestras de agua o cultivo. Estas soluciones matan los seres vivos que contienen, incluidas bacterias, y se combinan con algunas sustancias que contienen las células haciendo que estas se conserven mejor y no pierdan su estructura rápidamente.

Una de estas soluciones, utilizada muy frecuentemente, es la **Solución de Lugol**, que es una solución a base de Iodo y Ioduro que puede prepararse con facilidad en el propio laboratorio u obtenerse ya elaborado en cualquier suministrador de productos químicos para laboratorio. Para conservar las muestras con esta solución basta con añadir una o varias gotas, dependiendo del volumen de la muestra, hasta que toma un ligero color a cañac.

Otro buen conservante es el formaldehído o **formol**, aunque en algunas ocasiones las células que no tienen pared celular suficientemente fuerte estallan y, por lo tanto, se pierden. Para su uso en esta función, hay que añadir a la muestra una cantidad tal que la concentración final del formol esté entre el 2 y el 4% del volumen total. Casi siempre se comercializa en solución acuosa aproximadamente al 40% (60% de agua). Para calcular la cantidad a añadir, suponiendo que la concentración que queremos preparar sea al 4%, hay que resolver la siguiente ecuación:

$$\frac{V_f \times C_f}{V_m + V_f} = \frac{4}{100}$$

en la que  $V_f$  es el volumen de formol comercial (que no es puro y, por lo tanto, lleva agua),  $C_f$  es la concentración del formol en tanto por uno, es decir, en % dividido por 100). El producto de estas dos cantidades es el volumen de formol puro que contiene el volumen que echamos de formol comercial.  $V_m$  es el volumen de la muestra y la suma de éste con el de formol, nos da el volumen final de la muestra después de añadirle el formol.

Un compuesto similar al formol, el **gutaraldialdehído (GTA)** conserva mejor la forma de las células y muy raramente hace que exploten. Además, con este producto, muy a menudo las células flageladas conservan sus flagelos. Se suele emplear en concentraciones entre el 1 y el 2%, teniendo el preparado comercial una concentración del 25%, es decir, con un 75% de agua. Es un producto que debe manejarse con sumo cuidado ya que es más cancerígeno que el formaldehído.

### PREPARACION DEL HEMATOCTOMETRO PARA EL CONTAJE DE CÉLULAS

Cuando la lámina de vidrio está bien pegada a las plataformas laterales, se forman en éstas unos semicírculos o arcos de circunferencia de colores, irisados, llamados **anillos de Newton**. Para conseguir que estos anillos se formen hay que apretar sobre las pinzas fuertemente y moverlas hacia un lado y hacia otro. Si los anillos se forman es señal de que entre la lámina de vidrio y las plataformas laterales no hay prácticamente separación, por lo cual la distancia entre la plataforma central y la lámina es exactamente de 0,1 mm.

Una vez conseguido lo anterior, se procede a llenar las dos retículas de la cámara, una en la parte delantera y otra en la trasera del área central. Para ello, se toma con una pipeta Pasteur una muestra, cuidando de no sumergirla mucho y dejando que el agua suba por capilaridad. Acto seguido, se coloca la punta de la pipeta en el hueco que hay entre la lámina y la plataforma central de la cámara, dando un pequeño golpecito si es necesario, y se deja llenar todo el área rayada. Se repite la misma operación en la otra área rayada.

Si el llenado no ha sido lo suficiente rápido, hay que limpiar bien la cámara e iniciar todo el proceso nuevamente.

### CONTAJE DE CÉLULAS EN UN HEMATOCTOMETRO NEUBAUER

Para determinar la concentración de fitoplancton en el agua o cultivo hay que contar las células que hay en un volumen determinado de agua. Para ello, si contamos las células que hay en un número de cuadrados (cuya área conocemos), podemos saber que volumen estamos contando, ya que es el del paralelepípedo que tiene por base el área que contamos y por altura, la de la cámara, es decir, la distancia entre la plataforma central y la lámina de vidrio y que, en la mayor parte de las cámaras, es de 0,1 mm.

Así, p. ej., si contamos las células que hay en 1 sólo cuadrado grande (0,25 x 0,25 mm) estaremos contando las células que hay en un volumen de:

$$0,25 \times 0,25 \times 0,1 \text{ mm} = 0,00625 \text{ mm}^3 = 0,00625 \mu\text{l}$$

ya que el volumen del paralelepípedo correspondiente es igual al área de la base (0,25 x 0,25 mm) por la altura (0,1 mm).

Si hubiéramos contado las células que había en p. ej., 7 de estos cuadrados, tendríamos que multiplicar el volumen anterior por 7.

Si ahora dividimos el número de células contadas por el volumen correspondientes, obtendremos la concentración de células en células/ $\mu\text{l}$ . Como 1 ml tiene 1.000  $\mu\text{l}$ , para dar la concentración en células/ml habrá que multiplicar por 1.000.

#### EJEMPLO:

En la lectura de un cuadrado grande una cámara Neubauer se han contado 20 células. ¿Cuál es la concentración de células/ml del cultivo muestreado?

$$\text{Volumen correspondiente al área contada} = 0,00625 \mu\text{l}$$

$$\text{Concentración de células} = 20 : 0,00625 = 3.200 \text{ células}/\mu\text{l} = 3.200.000 \text{ células}/\text{ml}$$

## TÉCNICA DE LAS DILUCIONES SERIADAS

Como en los cultivos fitoplanctónicos concentrados el volumen en que hay una sola célula es muy pequeño no se puede aislar directamente, por lo que se recurre a diluir el cultivo tantas veces como sea necesario para conseguirlo.

Con un ejemplo, ilustraremos la técnica a emplear: supongamos que disponemos de un cultivo en el que hay 1000 células/ $\mu$ l, del que deseamos separar una sola célula. Si actuáramos directamente sobre ese cultivo, tendríamos que coger volúmenes de 1:1000  $\mu$ l para garantizar que separamos cultivos de una sola célula, lo cual resulta imposible.

Sin embargo, podemos coger 1 ml de ese cultivo y ponerlo en 10 ml de medio, con lo cual la concentración de células en los 10 ml será de:

$$(1/10) \times 1000 = 100 \text{ células}/\mu\text{l}$$

Repitiendo esta operación con el segundo tubo tendremos:

$$(1/10) \times 100 = 10 \text{ células}/\mu\text{l}$$

Repitiendo esta operación con el tercer tubo tendremos:

$$(1/10) \times 10 = 1 \text{ célula}/\mu\text{l},$$

y así sucesivamente hasta que en el sexto tubo habrá 1 célula por mililitro, por lo cual en el inóculo del séptimo tubo (que como hemos dicho al principio, tiene, al igual que los demás, un volumen de 10 ml) irá una sola célula. Al cabo de un tiempo, la mayor parte de los tubos de la última dilución contendrán un cultivo monoespecífico de la especie más abundante.

Otro método para hacer este tipo de diluciones consiste en contar primero el número de células que hay en el cultivo y hacer una o dos diluciones fuertes, como p. ej., 0,1 ml en 1 litro o en medio litro de agua, y después continuar con el método que acabamos de describir.

## AISLAMIENTO CON MICROPIPETA

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se colocan varias gotas de medio de cultivo sobre un portaobjetos.
2. Se toma una muestra muy pequeña del cultivo que se va a aislar y se pone en la primera gota. Se enfoca la gota con el microscopio y se trata de coger una sola célula con una nueva micropipeta.
3. Como generalmente, en este primer intento, no se consigue aislar una sola célula cogiéndose varias, se pasan a la siguiente gota, en la que se repite la operación anterior, despreciando la pipeta usada.
4. Cuando observamos que sólo queda una célula en la gota, se coge la célula con una nueva pipeta, se coloca en el tubo de cultivo y se deja crecer.

Para conseguir que las células entren en la micropipeta se puede recurrir a varios mecanismos. Uno de ellos se basa en el fenómeno de la capilaridad. Si se usa una pipeta seca, al entrar en contacto con el agua, el líquido asciende por capilaridad arrastrando con él las células. Otro método, más exacto y mejor que el anterior, consiste en poner algo de medio en la pipeta dejando que suba por capilaridad y, después, hacer que entren las células aspirando a través de un tubo de pequeño diámetro interno, conectado a la pipeta.

## Autoevaluación

**1** ¿A qué es debido el hecho de que las cámaras que sirven para contar células al microscopio reciban el nombre genérico de **hematocitómetros**?

**2** ¿Sería posible emplear una cámara cuentaglóbulos Neubauer para el conteo de organismos microscópicos formados por cadenas más o menos largas de células? ¿Por qué?

**3** Relaciona entre sí, las dos series de términos:

<b>A</b>	Espectrofotometría	<b>1</b>	Microscopio invertido		
<b>B</b>	Coulter	<b>2</b>	Dispersión de la luz de un láser		
<b>C</b>	Utermöhl	<b>3</b>	Neubauer		
<b>D</b>	Citómetro de flujo	<b>4</b>	Absorción de la luz		
<b>E</b>	Hematocitómetro	<b>5</b>	Cambios de intensidad de la corriente		

## Aplicaciones

**1** Observa al microscopio la superficie de una cámara cuentaglóbulos Neubauer. Con ayuda de los datos ofrecidos en el texto, realiza en papel milimetrado un dibujo del área rayada, a escala 100:1.

**3** ¿Cuál es el volumen de cada uno de los cuadrados formados en el área central de la cruz de una cámara Neubauer?

**2** Calcula el número de células de fitoplancton por mililitro que hay en un cultivo que, observado en una cámara Neubauer, da el siguiente conteo:

4 cuadrados grandes con 15 células cada uno

2 cuadrados grandes con 10 células cada uno

1 cuadrado grande con 5 células

**4** Si tuvieras que contar un cultivo de fitoplancton de densidad superior a 100.000 células/μl, ¿Qué problemas encontrarías? ¿Cómo lo solucionarías?

## Conoce tu entorno

**1** Son numerosas las actividades que requieren el permanente conteo de células. Entre ellas cabe destacar las realizadas en los laboratorios de análisis clínicos. Acércate a un hospital o laboratorio médico y trata de averiguar que técnicas usan y compáralas con las descritas en este texto.