



MANUAL DE CULTIVO DE MACROALGAS PARDAS:

Desde El Laboratorio Al Océano



Universidad
ARTURO PRAT
del Estado de Chile

Macroalgas Pardas



El presente documento técnico es una guía de trabajo práctico para la producción de plántulas de macroalgas pardas de las especies *Lessonia trabeculata* y *Lessonia nigrescens* a desarrollarse en hatchery o invernadero. Este fue concebido en el marco del proyecto “PROGRAMA DE MANEJO, CULTIVO Y REPOBLAMIENTO PARA LAS ALGAS PARDAS EN LA REGIÓN DE TARAPACÁ” financiado por el Fondo de Innovación para la Competitividad Regional (FICR) – Gobierno Regional de Tarapacá.

La producción de macroalgas pardas en hatchery o invernadero tiene como propósito respaldar el establecimiento de futuros planes de repoblamiento y/o cultivo en la zona costera de la región de Tarapacá. Esto cobra relevancia si se quiere mantener el patrimonio genético y asegurar la producción futura de algas pardas, ante la posible pérdida de las poblaciones hoy presentes ya sea por la ocurrencia de eventos naturales como “el Niño” o incrementos en la demanda de estos recursos, que generan por una parte mortalidades naturales importantes o bien incremento de la actividad extractiva, que podría amenazar la abundancia y disponibilidad de las algas pardas en las costas de la I Región de Tarapacá.

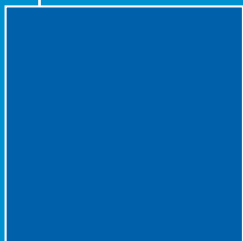
Las especies *Lessonia trabeculata* y *Lessonia nigrescens* son las especies de algas pardas más importantes en términos de volumen y biomasa que ocurren en las costas de la I Región, formando praderas de grandes extensiones, en el litoral rocoso. También es posible encontrar en algunas bahías bosques de menores dimensiones de *Macrocystis pyrifera*, especie que también tiene importancia comercial. *L. trabeculata* es característica de la zona submareal y *L. nigrescens* de la zona intermareal. Los 3 recursos antes mencionados son explotados comercialmente en la zona norte de Chile desde la década de 1970. Históricamente han sido recolectados en forma manual producto de varazones y acopiados en sectores costeros por recolectores (as) de orilla o algueros (as) para ser comercializadas como producto seco o molido.

Este manual de cultivo entrega información sobre el manejo de algas reproductivas, inducción artificial a la esporulación, liberación de esporas y posterior desarrollo de gametofitos y esporofitos en invernadero o hatchery. Se describen las metodologías de cultivo partiendo por el tratamiento necesario para la liberación de esporas, incubación en medios enriquecidos que permiten la germinación y desarrollo posterior hasta obtener plántulas libres o fijadas a sustratos. A pesar de la aparente simplicidad del procedimiento existen factores tales como iluminación, temperatura, nutrientes, movimiento del agua, factores bióticos y manejo de los cultivos, los cuales en una compleja interacción pueden ser responsables del éxito o fracaso del cultivo masivo.

La presente contribución fue generada en un trabajo conjunto entre el Departamento de Ciencias del Mar y el Laboratorio de Algas del Instituto de Ciencia y Tecnología de la Universidad Arturo Prat de Iquique y Puerto Montt. Este documento resume los resultados de cultivo obtenidos durante el desarrollo del proyecto Programa de Manejo, Cultivo y Repoblamiento de Algas Pardas, desarrollado entre los años 2010 y 2011.

El presente Manual está dirigido especialmente a los pescadores artesanales de la I Región de Tarapacá, a estudiantes en formación, a entusiastas ficólogos del norte de Chile, a empresas privadas, institutos de formación técnica y a todos los profesionales y técnicos interesados en desarrollar una actividad de desarrollo con algas pardas.

Iquique, Septiembre 2010



Autores

Marcela Avila L.
Carlos Merino P.
Karen Guissen S.
Maria Inés Piel W.

Colaboradores

Elio Segovia M.
Milton Avilés L.
Paulina Plaza J.
Pedro Pizarro F.
Natalia Trigo R.
Bianca Bottareli G.
Francisco Figueroa R.

Fotografías

Maria Inés Piel
Karen Guissen
Julian Caceres

Registro de Propiedad Intelectual N° 212093

Universidad Arturo Prat. Av. Arturo Prat S/N. Campus Huayquique. Iquique
Instituto de Ciencia y Tecnología, Universidad Arturo Prat. Ejercito 443. Puerto Montt

Índice de Contenidos

1. Introducción	7
2. Biología, distribución, e importancia comercial	8
2.1 Identificación de las especies	8
<i>Lessonia nigrescens</i>	8
<i>Lessonia trabeculata</i>	10
<i>Macrocystis pyrifera</i>	11
2.2 Pesquería de las algas pardas	11
2.3 Cadena productiva del Alga Parda	12
3. Reproducción y ciclo de vida.	13
3.1 Fase esporofítica (asexual)	13
3.2 Fase gametofítica (sexual)	13
4. Fico Hatchery: Requerimientos y condiciones para el cultivo.	15
4.1 Equipamiento e instrumental	15
4.2 Tratamiento de agua de mar	16
4.3 Esterilización de recipientes de cultivo	16
5. Procedimiento de inducción a la esporulación	19
5.1 Colecta de material reproductivo	19
5.2 Liberación de esporas	22
6. Procedimiento de primera fase de cultivo: Pre-cultivo	23
6.1 Pre-cultivo en cuerdas	23
6.2 Pre-cultivo en suspensión	24
7. Procedimiento segunda fase de cultivo: Cultivo en el mar	28
8. Agradecimientos	31
9. Glosario	32
10. Referencias	33

Macroalgas Pardas

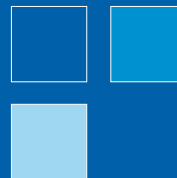


Las algas pardas se agrupan en la división Phaeophyta, que se caracteriza por reunir un gran número de especies, que presentan diversas morfologías, que van desde algas filamentosas de estructura sencilla hasta algas que pueden alcanzar varios metros de longitud y con estructuras muy complejas. Su color pardo (verde amarillento a parduzco) se debe a la presencia de una xantofila, un pigmento que protege de la luz del sol, llamado fucoxantina, que enmascara el color de las clorofilas a y c, de los betacarotenos y otras xantofilas. Como sustancias de reserva tienen polisacáridos, siendo el principal la laminarina, y carecen por completo de almidón. Las paredes de las células están compuestas por celulosa y ácido algínico.

En Chile se han descrito aproximadamente 60 géneros y 140 especies de algas pardas (Santelices, 1989). Los “huiros”, son un grupo de algas pardas de gran tamaño del orden Laminariales que se encuentran solo en aguas marinas y principalmente predominan en aguas frías en ambos hemisferios. Se caracterizan por formar agrupaciones similares a bosques denominadas huirales (Vásquez, et al., 2001). Uno de los roles ecológicos más importantes de estas especies es dar refugio, alimento y ser lugar de asentamiento de un ensamble de especies marinas (invertebrados y algas), por lo que este grupo de algas es considerado como especies bio-ingenieras de ecosistemas. Los ambientes intermareales y submareales rocosos de la zona norte de Chile están dominados por huirales que se distribuyen de forma continua en el litoral rocoso, su distribución es solo interrumpida por la presencia de playas arenosas en la línea costera.

Los huiros (fig. 1) tienen importancia económica, puesto que son utilizados como alimento de abalones y erizos y para la extracción de alginatos, polisacáridos que son utilizados ampliamente en la industria como viscosantes y emulsionantes y más recientemente en la elaboración de biocombustibles.

Fig. 1. Fotografía del alga parda intermareal *L. nigrescens*



Sabías que en las algas pardas del orden Laminariales (como *Lessonia* y *Macrocystis*), se distinguen tres partes: disco adhesivo, estipes y frondas.

El disco adhesivo o “grampón” permite mantener unida el alga al sustrato

Las frondas son similares a las hojas y los estipes a los tallos.

Esta sección contiene información sobre la biología, taxonomía, distribución, importancia económica y aplicaciones de las especies presentes en las costas de la I Región de Tarapacá y aspectos relevantes de la pesquería. El litoral de la Región se caracteriza por tener en su mayoría frentes expuestos al oleaje, playas arenosas y roqueríos intermareales y submareales. Las poblaciones de algas pardas se distribuyen en estos roqueríos formando densas poblaciones que dominan en cobertura y biomasa la franja intermareal-submareal. La morfología de estas algas permite que ellas alberguen en sus discos numerosas especies de invertebrados cuyo número y riqueza puede incrementarse a medida que aumenta el tamaño de la planta. Por otra parte tanto los estipes como las frondas también pueden ser hábitat para especies de fauna y flora, características del intermareal, tanto en sus fases larvarias, como juveniles y adultos.

2.1 Identificación de las especies

Lessonia nigrescens

Nombre científico: *Lessonia nigrescens* Bory 1826

Nombre común: Chascon, huiro negro

Clase: Phaeophyceae

Orden: Laminariales

Familia: Laminariaceae

Genero: *Lessonia*

Especie: *L. nigrescens*



Descripción

Algas de color verde pardusco o casi negro, de tamaño intermedio crecen en la zona intermareal-submareal formando densos cinturones (Fig. 2). Es la especie más abundante en biomasa y cobertura en esta zona, crece en roqueríos expuestos al oleaje. Crecen fijas al sustrato rocoso por un disco macizo del cual emergen estipes cilíndricos en la base que luego se aplanan formando las frondas divididas dicotómicamente. Estas, de forma lineal a lineal-lanceoladas de 1 a 5 cm de ancho con márgenes lisos a veces finamente dentados. Durante todo el año es posible observar en la superficie de las frondas manchas oscuras de tamaño variable que corresponden a soros esporangiales maduros. El disco de fijación sirve de hábitat y refugio a numerosas especies de invertebrados y algas. *L. nigrescens* alcanza tamaños de hasta 3 a 4 m de longitud, el disco basal puede tener hasta 50 cm de diámetro.



Macroalgas Pardas

Distribución geográfica

La especie tiene amplia distribución en el Hemisferio Sur. En Chile se distribuye desde Arica hasta Tierra del Fuego. En la Región de Tarapaca se observa su presencia en forma continua a lo largo del litoral rocoso en la zona intermareal, formando un cinturón de ancho variable desde 2 metros hasta aproximadamente 15 metros de ancho. Su distribución se extiende hasta el centro de Perú (Santelices, 1989).

Importancia comercial: El huiro negro es comercializado seco y picado para ser utilizado como materia prima para la producción de alginatos.

Lessonia trabeculata

Nombre científico: *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices 1986

Nombre común: Huiro palo

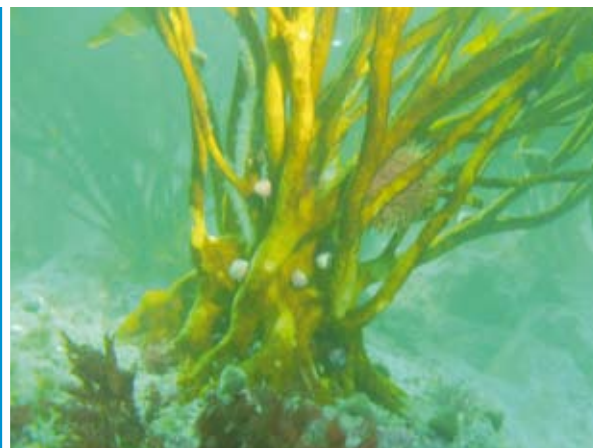
Clase: Phaeophyceae

Orden: Laminariales

Familia: Laminariaceae

Genero: *Lessonia*

Especie: *L. trabeculata*



Descripción

Algas de color café a café claro, con forma de arbusto, de hasta 2,5 m de alto. Crece en ambientes submareales y forma bosques en áreas expuestas y semi-expuestas. Se fijan al sustrato por un disco irregular, no macizo, conformado por hapterios fusionados de hasta 20 cm de diámetro. De allí emergen estipes aplanados que se ramifican dicotómicamente conformando frondas que se continúan dividiendo igual. Las frondas muy planas de forma lanceolada, anchas, con márgenes lisos y a veces denticulados. Al igual que en la especie *L. nigrescens*, es posible observar a lo largo del año soros esporangiales en las frondas, los cuales se observan como manchas oscuras prominentes de tamaño variable en la superficie.

Distribución geográfica

De acuerdo a Hoffmann y Santelices (1997), la especie se distribuye desde Antofagasta a Puerto Montt. En este manual se reporta por primera vez la presencia de la especie en las costas de la Región de Tarapacá, desde la localidad de Pisagua (23,61°S; 70,38°W) hacia el sur.

Importancia comercial: el huiro palo es comercializado seco y picado para ser utilizado como materia prima para la producción de alginatos

Macrocystis pyrifera

Nombre científico: *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh 1820.

Nombre común: Huiro, sargazo, canutillo

Clase: Phaeophyceae

Orden: Laminariales

Familia: Laminariaceae

Género: *Macrocystis*

Especie: *M. pyrifera*



Descripción:

Plantas erectas de gran tamaño de color pardo amarillento, crecen sobre sustratos duros, rocas y forman bosques submarinos, su tamaño puede alcanzar hasta 45 m. Se adhieren firmemente al sustrato por un disco basal de fijación macizo, de sus márgenes emergen numerosos hapterios ramificados, los cuales son parecidos a raíces. Del disco basal nacen los estipes, erectos y cilíndricos y se ramifican unilateralmente, a intervalos regulares, presentan flotadores en la base de las frondas. Las frondas son equivalentes a hojas, son largas y angostas de superficie rugosa y márgenes levemente dentados.

Distribución geográfica:

Se encuentra en el Hemisferio Sur, en las costas de todo Chile desde el Norte de Perú hasta la Patagonia, también se encuentra en Sudáfrica, sur de Australia y la Costa Atlántica, en el Hemisferio Norte, se distribuye desde Baja California hasta Alaska. Esta especie es poco frecuente en las costas de la I Región ocurre en poblaciones discretas en localidades relativamente protegidas del oleaje, desde la localidad de Ojanasca (19,6° S) hasta Chipana (21°20° S) , durante todo el año.

La pesquería de *Macrocystis pyrifera* forma parte de la llamada pesquería de algas pardas que también incluye a los recursos *Lessonia nigrescens* (huiro negro) y *Lessonia trabeculata* (huiro palo). En relación a *L. nigrescens* y *L. trabeculata*, *M. pyrifera* es extraída en menor escala en la región de Tarapacá. La extracción y recolección de estas algas en la zona norte del país, es efectuada exclusivamente por pescadores artesanales y recolectores (as) de orilla.

Importancia comercial: Especie utilizada para la extracción de alginatos y como alimento para abalones en cultivo.

2.2 Pesquería de las algas pardas

En los últimos años ha existido una demanda creciente por las algas pardas, tanto a nivel nacional como internacional (USA, Europa, Asia) por tener una importante cantidad de ácido alginico en sus células el que puede ser extraído y ser utilizado como alginato en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética, estimulantes de crecimiento y textil entre otras, más recientemente han sido usadas como alimento en cultivo de abalones y erizos.

Entre las algas pardas, la de mayor importancia en términos de volumen extraído en Tarapacá es la especie, *Lessonia nigrescens* (huir negro) este recurso es cosechado entre la I, II, III, IV, V, VI y VIII regiones por pescadores artesanales y recolectores de orilla. Según el Anuario de Estadística de Pesca (SERNAPESCA 2010), el esfuerzo total para ese año fue de 271.251 toneladas húmedas. La I Región de Tarapacá aporta a este total con 24.460 toneladas, correspondiendo esto al 9% del total. Debido a este incremento en la explotación, el año 2005 las autoridades debieron implementar medidas de administración como vedas y pesca de investigación con el objetivo de proteger el recurso.

Las medidas de protección de este recurso han permitido establecer un registro de los volúmenes extraídos, la mantención del recurso en el tiempo y el desarrollo de una actividad económica que tiene gran importancia social, ya que, es una fuente de ingresos importante para los algueros, recolectores de orilla y buzos artesanales.

2.3 Cadena productiva del Alga Parda

Las algas son recolectadas por pescadores artesanales y algueros (as), en la costa producto de varazones, se secan y en algunos casos son picadas para luego ser comercializadas (Fig. 3). Para la producción del “alga picada seca”, que es el producto de la recolección de las algas varadas en la playa, o extraídas de áreas autorizadas, existe una secuencia de pasos, los cuales se mencionan brevemente a continuación:

1. Recolección del alga, ya sea varada en la orilla, o recolectada de áreas autorizadas.
2. Las algas son secadas al sol en playas o roqueros.
3. Transporte a plantas picadoras, desde zonas de secado, y de estas plantas a lugares de comercialización.
El producto picado puede tener diferente tamaño, luego es ensacado y enviado a comercializadoras en otras regiones del país o con destino a exportación.
4. Ensacado y envío a comercializadoras en otras regiones del país o con destino a exportación.

Fig.3 Cadena Productiva de algas pardas



Las tres especies de algas pardas consideradas en el capítulo 1 del presente Manual, presentan un ciclo de vida heteromórfico, donde ocurre alternancia de generaciones de una fase microscópica (gametofito) con un fase macroscópica (esporofito).

3.1 Fase esporofítica (asexual)

El esporofito ($2N$), corresponde a la fase macroscópica que es el alga que se colecta en la playa o en los roqueros, constituye la fase asexual macroscópica. En los esporofitos la mayoría de las frondas presentan estructuras reproductivas denominadas soros esporangiales, que contienen los esporangios (Fig. 4). Los soros se disponen en bandas longitudinales medianas, en ambas caras de la lámina, son fácilmente reconocibles porque presentan una coloración más oscura que el resto de la fronda a su vez, son prominentes. Los esporangios son microscópicos tienen forma de saco y contienen en su interior numerosas esporas que son móviles. Las esporas tienen una forma alargada y dos flagelos en uno de sus extremos, una vez que son liberadas de los esporangios, germinan formando un tubo de germinación, esto ocurre aproximadamente dentro de las primeras 48 horas.

Fase gametofítica (sexual)

Las esporas recién germinadas por divisiones mitóticas forman los gametofitos dióicos, los cuales son microscópicos de pocas células. Se estima que aproximadamente el 50% de las zoosporas liberadas formarán gametofitos masculinos y el otro 50% formará gametofitos femeninos. En condiciones ideales de cultivo (temperatura adecuada, nutrientes, e iluminación) a los 15 días de cultivo, es posible diferenciar bajo el microscopio, ambos sexos. Es característico que los gametofitos masculinos estén formados por numerosas ramificaciones y células muy pequeñas, mientras que los femeninos tienen células de mayor tamaño y presentan menor número de ramificaciones (Fig. 4). Los gametofitos masculinos forman en los extremos de las ramificaciones los gametos que se denominan anteridios, los cuales se observan como células pigmentadas de forma triangular. Por otra parte los gametofitos femeninos, de muy pocas células 2 o 3 inician la formación de ovocélula. Esta última es fácil de distinguir puesto que una célula vegetativa pierde su contenido, el cual es vaciado a la ovocélula que es de forma redondeada (Figura 5). Después de este periodo se produce la fecundación y germinación del cigoto ($2N$) dando origen a un embrión diploide que corresponde al esporofito.

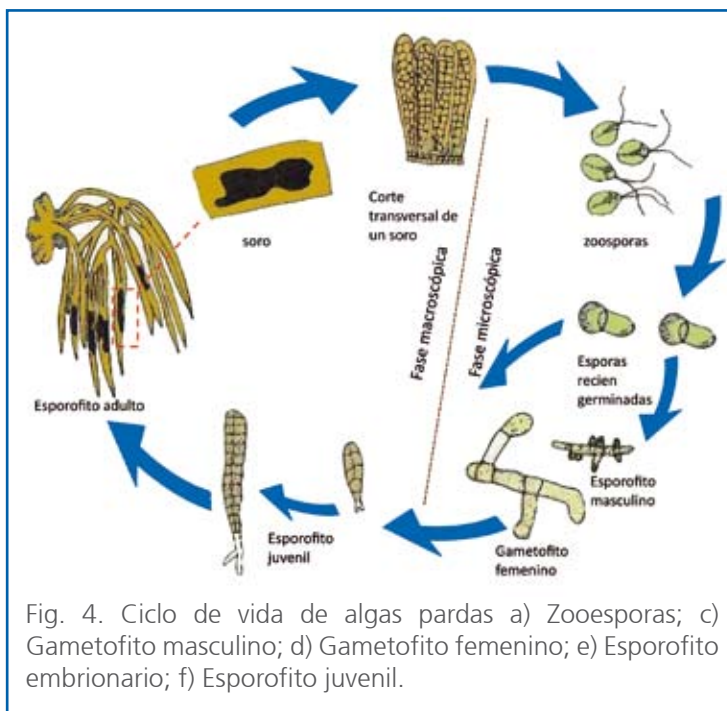


Fig. 4. Ciclo de vida de algas pardas a) Zoosporas; c) Gametofito masculino; d) Gametofito femenino; e) Esporofito embrionario; f) Esporofito juvenil.

El estudio de los factores que afectan la liberación de las zoosporas, su germinación y crecimiento ha permitido que hoy se conozca el desarrollo temprano de esta fase del ciclo y su alternancia con la fase foliosa que es el esporofito (Avila et al., 1985). Este desarrollo de conocimientos sobre aspectos reproductivos, ecológicos y su biología básica son pilares fundamentales para establecer las bases para el cultivo comercial y masivo de estas especies.



Fig. 5 Fotografía ovocélulas en gametofitos femeninos
(fotografía Maria Ines Piel)

4.1 Equipamiento e instrumental

Para producir plántulas de macroalgas el fico-hatchery debe contar con un laboratorio (Fig. 6) con los siguientes recursos materiales:

- Espacio cerrado con temperatura controlada (Laboratorio de al menos 25 m2).
- Disponibilidad constante de agua de mar filtrada y esterilizada con UV de buena calidad.
- Sistema de Iluminación fluorescente (equipos de 2 x 40W).
- Sistema de tratamiento de agua de mar (Filtros mecánicos y esterilizador Ultravioleta).
- Equipo de esterilización para recipientes menores y medios de cultivo (Autoclave)
- Estufa de secado
- Instrumentos de observación fina (Microscopio y Lupa estereoscópica)

Por otra parte el laboratorio deberá contar con las siguientes condiciones:

Condiciones de asepsia y limpieza del lugar

Control de posibles focos de contaminación

Acceso restringido al área de cultivo

Zona de lavado con facilidades de agua corriente, detergente neutro y destilador de agua para enjuagado de los materiales (vidrio y plástico) antes de su uso.

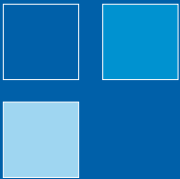


Fig. 6: Laboratorio general



4.2 Tratamiento de agua de mar

El agua de mar constituye el medio en donde se desarrollarán los estados de vida temprano y juvenil de las algas por lo tanto se requiere que la calidad de ésta sea óptima. La presencia de contaminación biológica (bacterias, hongos o protozoos) o contaminación química en el agua de mar influirá notoriamente el desarrollo del cultivo. Por lo tanto es preciso aplicar un tratamiento al agua afluyente para mejorar su calidad. Así una vez bombeada el agua el tratamiento de ésta contempla primero la filtración mecánica mediante el uso de mangas con aberturas de 100, 50, 25 y 10 μm (Filtros Cintropur®). Posteriormente el agua se filtra a 1 y 0,45 micras con filtro de cartucho CUNO® y finalmente el agua se expone a radiación ultravioleta UV por ejemplo con un equipo Rainbow Lifegard® QL-120 (Fig. 7).

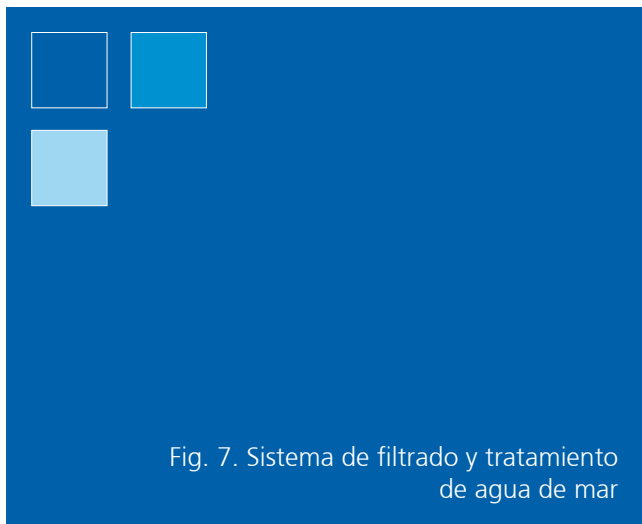


Fig. 7. Sistema de filtrado y tratamiento de agua de mar



4.3 Esterilización de recipientes de cultivo

En la primera etapa de cultivo los recipientes deben estar estériles. Para tal efecto se someten al proceso de autoclavado. Los materiales, tanto de vidrio como de plástico, deben ser manufacturados para resistir las condiciones de presión y temperatura a la que son expuestas en el interior del autoclave.

El material de vidrio (matraces, botellas, pipetas, etc.) de menor volumen, previamente lavado y enjuagado, se envuelve con papel kraft y luego se coloca en una estufa de secado a 180°C por 2 horas. Posteriormente el material se retira de la estufa y se deja enfriar a temperatura ambiente y colocan los tapones quedando listo para su posterior llenado (Fig. 8).



Fig. 8. Secuencia de manejo de matraces en estufa de secado.

Una vez realizado este paso se agrega el agua de mar previamente tratada (filtrado final a $0,45\ \mu$ e irradiada con luz ultravioleta) a cada recipiente y se introducen al equipo autoclave. La esterilización en la autoclave se realiza a 121°C de temperatura, 15 PSI de presión y por un tiempo de 20 minutos (Fig. 9).

Posteriormente se retiran las botellas desde la autoclave y se guardan en una cámara de transferencia (Fig. 10) en oscuridad por 24 horas. La cámara de transferencia posee una lámpara ultravioleta de 40 watts la cual se activa por 15 minutos para irradiar el material almacenado en ésta previo a su posterior manejo (adición de nutrientes e inoculación).

Los recipientes de mayor volumen por ejemplo botellones de 20 litros se esterilizan directamente.



Figura 9



Figura 10



Fig. 9. Autoclave

Fig. 10. Cámara de Transferencia

Macroalgas Pardas



5.1 Colecta de material reproductivo maduro

Para inducir a la esporulación se requiere disponer de material biológico reproductivo maduro. El material reproductivo se recolecta mediante buceo e inmediatamente se debe almacenar bajo condiciones de humedad, oscuridad y de baja temperatura ($< 10^{\circ}\text{C}$). El contenedor puede ser una caja de poliestireno provisto de bolsas de congelamiento (gel-pack) o bien un contenedor térmico tipo cooler. El transporte al laboratorio debe ser lo más rápido posible evitando la exposición del alga al aire y al sol.

Las frondas reproductivas son fácilmente distinguibles, ya que, sobre la superficie de la hoja aparecen sectores de mayor pigmentación las cuales representan las zonas de concentración de esporas. Estos sectores de concentración de esporas se denominan "soros", como se indico en la descripción de las especies (Fig. 11).

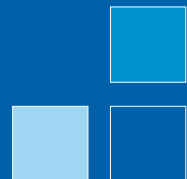
Una vez que arriban las algas a laboratorio se debe proceder a la selección cualitativa de las frondas con mejor aspecto reproductivo. Se separan aquellos trozos adecuados y se lavan copiosamente con chorros de agua dulce para eliminar los epifitos adheridos sobre su superficie. Los epifitos son normalmente diatomeas bentónicas, protozoos, copépodos, (muchos de los cuales no son vistos a simple vista), etc.



Fig. 11. Hoja reproductiva



Fig. 12. Lavado de hoja seleccionada



Posteriormente los trozos de frondas lavados se enjuagan dos o tres veces con agua de mar estéril filtrada a $0,45\ \mu\text{m}$ (Fig. 12). Finalmente se secan y se dejan sobre un trozo de papel absorbente por un tiempo de 12 horas en oscuridad.

Transcurrido este periodo los trozos de frondas se cortan con un bisturí o tijera en pequeños fragmentos de 2 por 2 cm (Fig. 13) y se depositan en una cubeta que contiene agua de mar estéril y enriquecida con medio nutritivo (Solución Provasoli).



Fig. 13. Corte de frondas reproductivas acondicionadas

El medio Provasoli es un medio nutritivo cuya función es aportar los elementos macro y micro-nutricionales que permitirán el desarrollo y crecimiento de los estados tempranos y posteriores del alga. En la tabla 1 se entrega un listado de los componentes de este medio de cultivo (Tabla 1).

Tabla 1.- Composición de la solución stock para preparar Medio Provasoli (Mc Lachlan, 1973)

Soluciones*	Gramos para 1 litro
Solución A	
NaNO ₃	2.33
Glicerol Fosfato Na x 5H ₂ O	0,33
Solución B	
H ₃ BO ₃	0,19
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,006
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,0273
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0036
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0008
Titriplex III	0,16
Solución C	
Titriplex III	0,1
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	0,122
Solución D	
Vitamina B 12	0,00006
Tiamina	0,0033
Biotina	0,00033
TRIS Buffer	3,33
pH 7,8-8,5	

*Preparar cada solución en 500 mL con agua destilada o bidestilada tibia y agitando

La solución stock se prepara con agua destilada o bi-destilada tibia y agitando. El pH se regula a 7,8-8,5 con Ácido Clorhídrico 5N. Para preparar el medio de cultivo se adiciona la solución stock a una razón de 10-20 ml por cada litro de agua de mar. El medio se debe esterilizar en autoclave a 120 Lib y 121°C por 15 minutos y luego se debe almacenar en oscuridad y en frío.

5.2 Liberación de esporas

La liberación de esporas ocurrirá después de la re-hidratación de las frondas y se evidencia por la aparición de coloración en el agua, de color amarillo-verdoso, alrededor de los fragmentos de frondas. La liberación de esporas se puede comprobar mediante la observación de muestras del agua en el microscopio. Las esporas (zoosporas) poseen flagelos los cuales le otorgan a la célula una capacidad de movimiento que se extiende por 24 a 48 horas.

Una vez que ha ocurrido una suficiente liberación de zoosporas se procede a retirar los fragmentos de frondas desde el recipiente conservando solamente las zoosporas. Las suspensión de zoosporas colectadas se vierte en volúmenes conocidos en bolsas plásticas estériles (fig. 14).



Fig. 14. Acopio y almacenamiento de zoosporas

El Pre-cultivo inicial se puede realizar mediante dos modalidades a) Pre-cultivo en cuerdas o b) Pre-cultivo en suspensión.

6.1 Pre-cultivo en cuerdas

En esta modalidad se utiliza cabo de material sintético (PE o PP) de 3 mm de diámetro como sustrato de fijación. El cabo se enrolla ordenadamente sobre un bastidor construido con tubería de PVC (Fig. 15). El bastidor se sumerge en un recipiente (cubeta) que contiene agua de mar fresca, estéril y enriquecida con medio nutritivo. Posteriormente se vierte la suspensión acuosa de zoosporas sobre la superficie del bastidor y el sistema se deja en reposo sin realizar mayor manejo por un periodo de 10 días, con fotoperiodo de 16:8 (luz: oscuridad), temperatura de 17°C e iluminación de 1800- 2000 lux. Al cabo de este periodo las zoosporas deberían haber evolucionado a gametofitos microscópicos (masculinos y femeninos) los cuales por fecundación han dado origen a esporofitos que se adherirán sobre las cuerdas. Después de este lapso, se realiza la renovación de agua de mar fresca, estéril y enriquecida con una frecuencia cada 7 días.

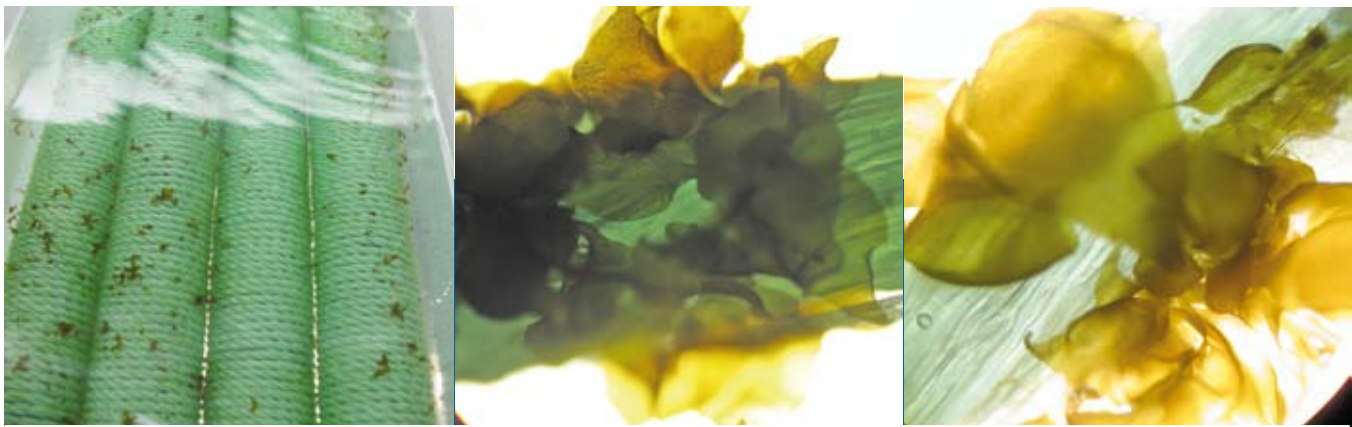
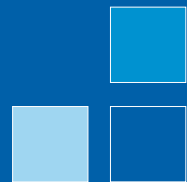


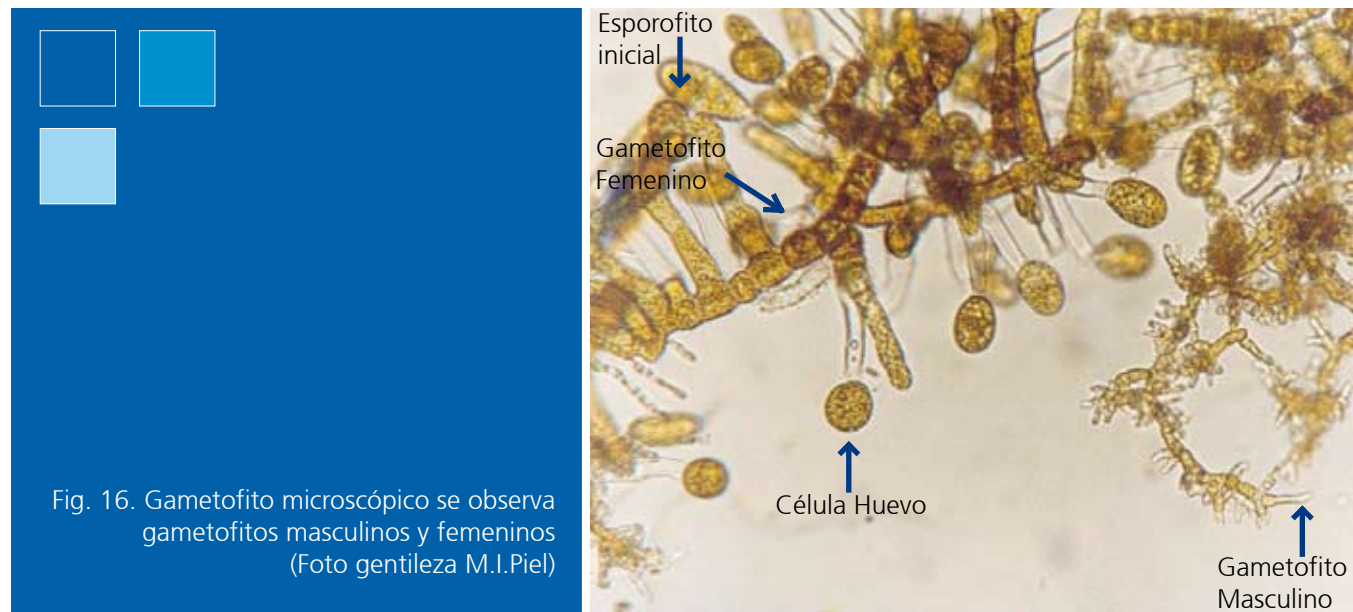
Fig. 15. Esporofitos de cultivo fijados sobre cuerda.



6.2 Pre-cultivo en suspensión

En esta modalidad las zoosporas colectadas se mantienen en las bolsas plásticas quedando inmóviles por un periodo de 7 a 10 días a la espera que germinen y los gametofitos se fijen a las paredes de la bolsa plástica. Durante esta fase las condiciones ambientales que deben brindarse son: Fotoperiodo: 16 horas luz y 8 horas oscuridad; Temperatura: 15°-17°C; Iluminación: 2000 lux $\approx$ 40 μ mol fotones m⁻²seg⁻¹.

Transcurridos los primeros 10 días, se vacía el agua de cada bolsa y luego se desprenden los gametofitos recién germinados, que se han fijado a la pared de la bolsa, realizando movimientos suaves, que permitan su desprendimiento pero, al mismo tiempo que no los dañe. Los gametofitos durante esta fase inicial deberían haberse desarrollado y diferenciado en gametofitos masculinos y femeninos (Fig. 16).



Los gametofitos recolectados (Fig. 17a) se transfieren mediante pipeteo a otra bolsa nueva conteniendo agua de mar fresca, estéril y enriquecida con medio nutritivo. En esta etapa se podrían efectuar cruzamiento dirigidos de gametofitos de diferente procedencia (Westermeier et al 2006, 2007) El sistema se mantiene realizando renovación de agua y nutrientes cada 7 días hasta que se compruebe la presencia de esporofitos tempranos (Fig. 17b) de aproximadamente 300 micras de longitud. Una vez asegurada la presencia de esporofitos por observación microscópica, el cultivo se transfiere a matraces o botellas de 2 litros dotadas de agitación constante mediante inyección de aire.

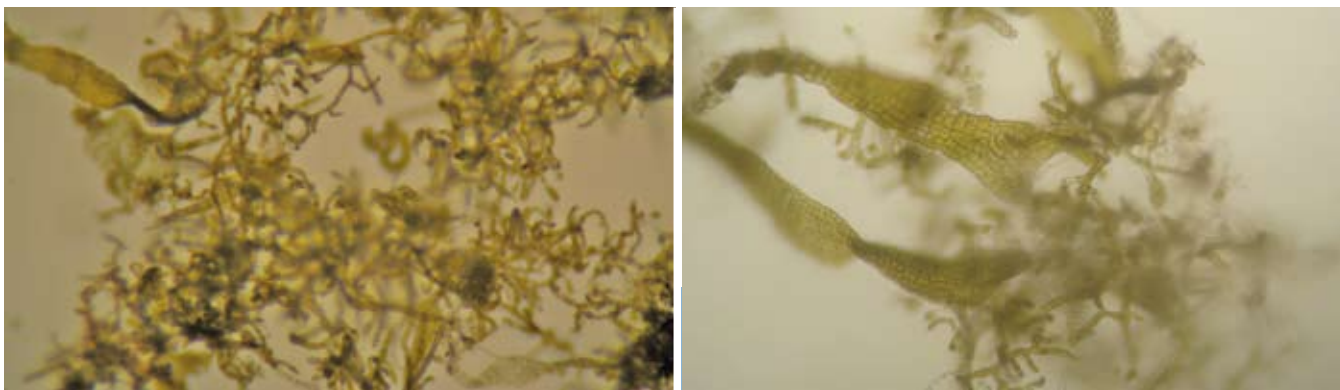


Fig. 17. Gametofitos(a) y Esporofitos iniciales (b) en cultivo.

El cultivo de esporofitos en suspensión se maneja realizando renovación de agua y nutrientes cada 7 días (Fig. 18) y manteniendo las condiciones ambientales (Fotoperiodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad; Temperatura: 15-17 °C; Iluminación: 1800 – 2000 lux $\approx$ 37 μ mol m⁻²s⁻¹).



Fig. 18. Esporofitos en Pre-cultivo suspendido

De acuerdo al crecimiento que experimenten los esporofitos y del incremento en densidad que es directamente dependiente del tamaño de la planta es que el cultivo debe escalarse a volúmenes mayores de 5 a 20 litros. En esta etapa de escalamiento del cultivo se deben mantener constantes las condiciones de agitación, de temperatura, iluminación y enriquecimiento nutritivo a fin de favorecer el crecimiento de los esporofitos (Fig. 19).

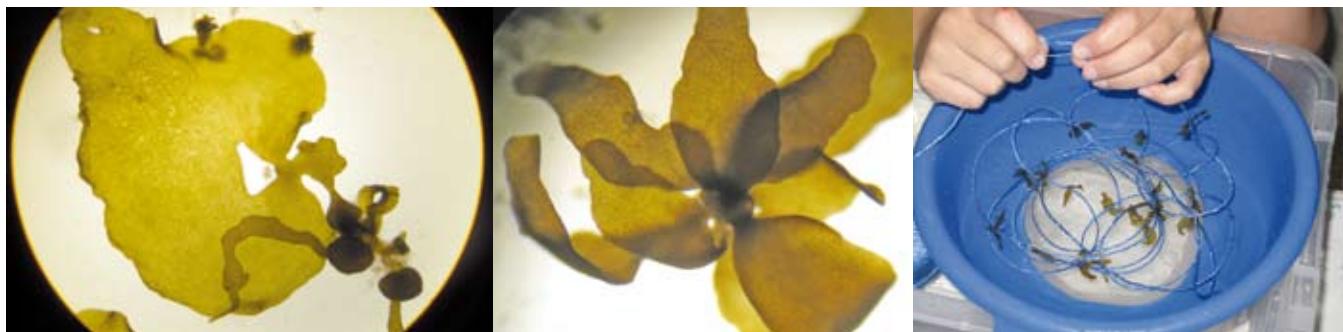


Fig. 19: Esporofitos desarrollados en cultivo (3 meses aproximadamente)

El proceso de pre-cultivo se puede escalar a volúmenes mayores en estanques de fibra de vidrio (Kalwalls). Estos estanques son de geometría cilíndrico recto con una razón diámetro: alto de 1:4 y su volumen útil es de aproximadamente 160 litros. Durante esta fase de crecimiento los esporofitos son sensibles a las condiciones de cultivo impuestas y pueden registrarse procesos necróticos en los bordes de las frondas por efecto de intensidades no adecuadas de luz y agitación. Asimismo la densidad debe vigilarse constantemente dado que la absorción de nutrientes ocurre a una tasa bastante rápida por lo cual el agotamiento de nutrientes puede afectar el crecimiento. En esta fase, o antes, el medio nutritivo Provasoli puede ser reemplazado por abono foliar por ejemplo Bayfolan® el cual rinde buenos resultados como fertilizante.

Posteriormente las plántulas obtenidas en laboratorio pueden ser encordados individualmente a trozos de cuerdas, los cuales a su vez se amarran en otros cabos de mayor diámetro y se trasladan al mar, para ser instalados en líneas madre de sistema de cultivo, tipo long-line, donde continuarán su proceso de crecimiento en ambiente natural.

A microscopic view of macroalgae fragments, showing various shapes and textures. The fragments are primarily yellowish-brown with some darker, brownish areas. They have irregular, elongated shapes, some with a more rounded, leaf-like appearance and others more elongated and thin. The texture appears granular or reticulated. The background is a light, off-white color.

Macroalgas Pardas

Después que las plántulas alcancen un tamaño de 2 cm (Fig. 20 a) promedio salen a un sistema de flujo continuo y se mantienen en estanques de 500 L, con un recambio diario de agua de mar pre-filtrada (hasta 1 μ m). Después de una semana en estas condiciones de cultivo, se duplica el tamaño de las plántulas facilitando su manejo. A continuación, se encordan y se instalan en líneas de cultivo en el mar para su desarrollo y crecimiento (Fig. 20b).

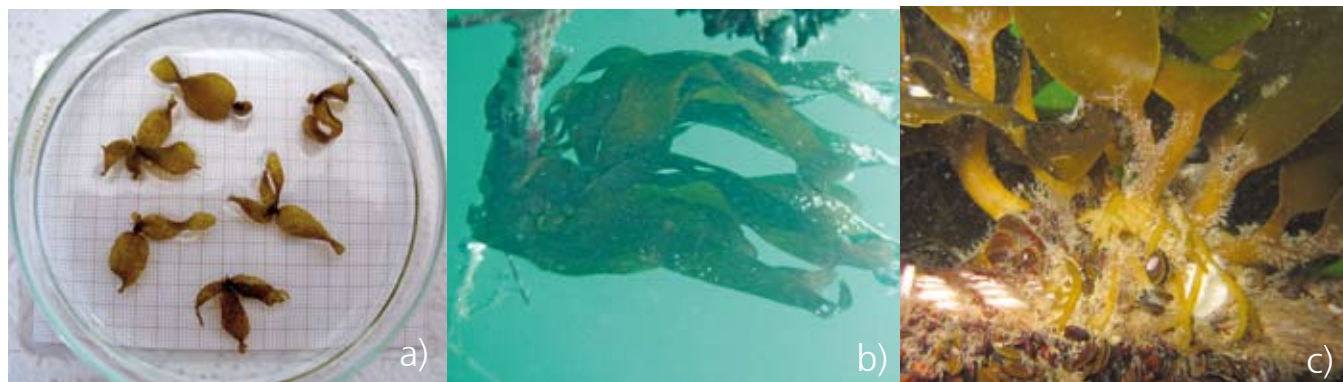


Fig. 20 a) Esporofitos de 2 cm listos para ser trasladados a un sistema de flujo continuo; b) Esporofito de > 40 cm en línea de cultivo; c) Detalle del disco de fijación de esporofitos de *Lessonia trabeculata* cultivada en líneas suspendida

Después de 4 meses en el mar se alcanzan tamaños que superan los 40 cm de longitud y se observa en los discos de fijación, que al igual que en las praderas naturales, estos albergan numerosas especies de fauna y flora. (Fig. 20c).

Las técnicas descritas en el presente Manual, se resumen en la figura 21, estas podrán ser usadas para la producción masiva de esporofitos de algas pardas en la I Región de Tarapacá. Los esporofitos de tamaño >2 cm podrán ser trasladados en líneas al mar estableciendo cultivos en sistemas de long line o bien, la metodología de esporulación podrá ser utilizada para liberaciones masivas de esporas en zonas costeras con fines de repoblamiento. Este trabajo será exitoso para los usuarios de la pesquería de algas pardas, solo si se cuenta con el trabajo cooperativo de los integrantes de las agrupaciones de pescadores o alqueros de las zonas costeras de la I Región interesados en la explotación y manejo sustentable de los recursos algales. En consecuencia estas tecnologías descritas pueden ser herramientas útiles que contribuyan al manejo sustentable de las algas pardas del borde costero de la Región de Tarapaca.

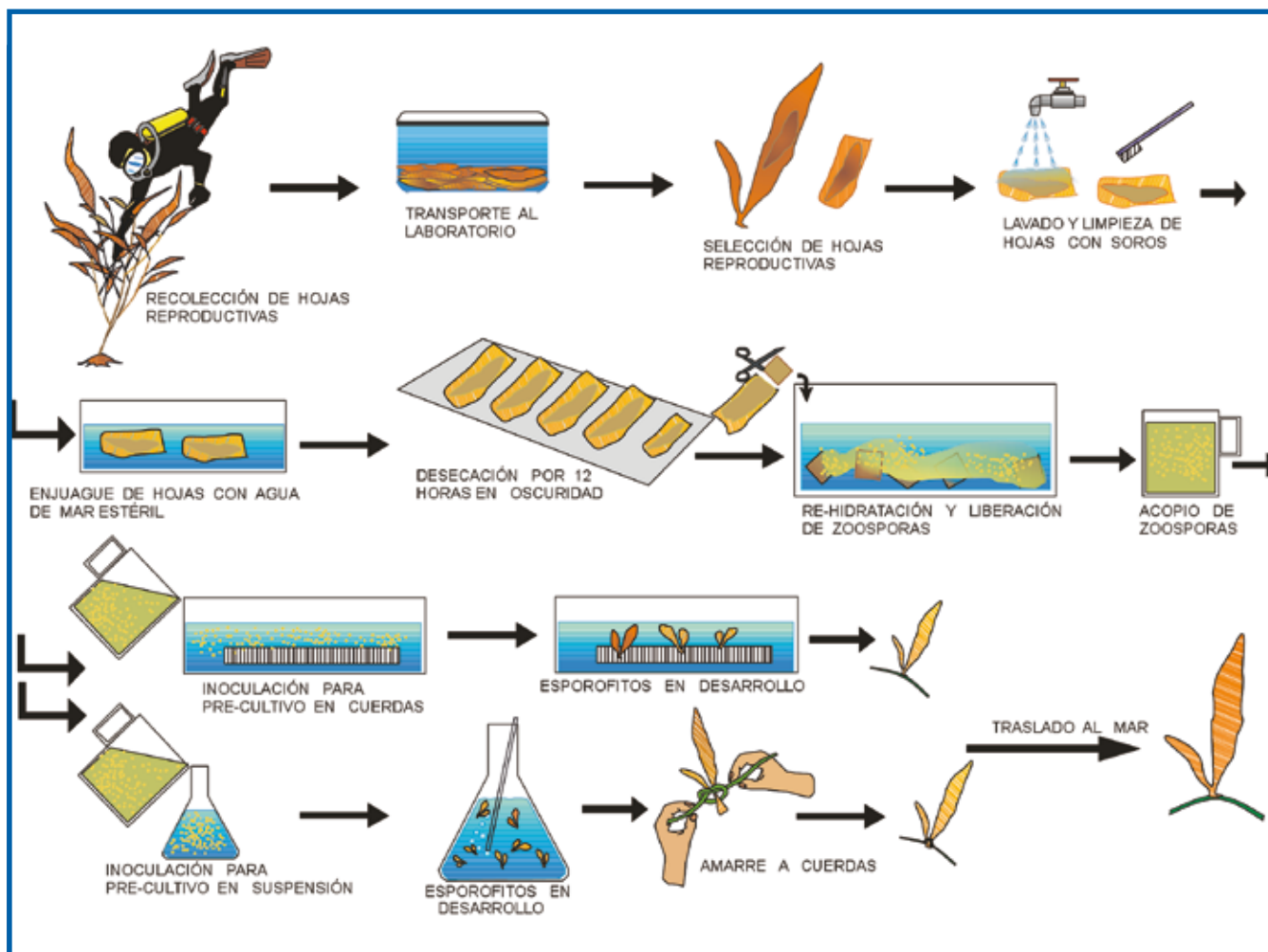


Fig. 21. Resumen esquemático del procedimiento de producción de macroalgas pardas en laboratorio.



Macroalgas Pardas



Agradecimientos

El equipo de investigadores que llevo a cabo el proyecto “Programa de manejo, cultivo y repoblamiento para las algas pardas en la región de Tarapacá” quiere dejar constancia de su agradecimiento a los miembros del gobierno regional de Tarapacá, presidido por los intendentes señor Miguel Silva Rodríguez y señora Luz Ebensperger Orrego quienes juntos a su cuerpo de consejeros regionales y técnicos evaluadores no sólo tuvieron la visión y voluntad de apoyar el desarrollo de las dos fases que tuvo este estudio sino que estuvieron permanentemente preocupados del avance e impacto que podía tener especialmente en el sector pesquero artesanal de la región. También queremos destacar la participación activa y permanente del señor Marco Soto Díaz, director zonal de pesca de las regiones de Antofagasta, Tarapacá e Arica y Parinacota, quien no solo nos llamó a tomar esta necesidad de investigación aplicada sino que nos invitó a participar en la “mesa de algas” constituida por el sector público, privado y pescadores artesanales, para exponer periódicamente los avances del proyecto y poder discutir sus resultados y dar aplicación práctica a estos.

Nos parece también relevante dejar apuntado nuestro reconocimiento y especial agradecimiento a los jóvenes investigadores que participaron como ayudantes tesis y técnicos en el hatchery de producción de plántulas que instauró este proyecto. Ellos no solo pusieron su fuerza impetuosa y juvenil en la búsqueda de los resultados sino que también tuvieron la agudeza de generar nuevas propuestas que se transformaron en nuevo conocimiento científico, lo que es garante de la formación profesional que ellos recibieron como biólogos marinos e ingenieros en Pesca y Acuicultura en nuestra Universidad Arturo Prat.

Alginatos: sustancia química proveniente de las algas pardas, con la capacidad de gelificar. Son usados como gelificantes, estabilizantes, espesantes, entre otros

Aerociste: flotador, estructura llena de aire (algas pardas)

Dicotómico: dividido o ramificado en 2 partes iguales

Dioico: que llevan estructuras reproductivas femeninas y masculinas en individuos distintos.

Esporofito: fase diploide de un ciclo de vida.

Estipe: porción engrosada, cilíndrica de un talo, de la que nacen otras estructuras, tales como láminas.

Especie ingeniera: son organismos que “directa o indirectamente modifican la disponibilidad de recursos para otras especies mediante un cambio físico de las condiciones bióticas y/o abióticas”.

Epifito: Especie que vive sobre otra planta sin alimentarse o dañar a ella.

Fronδας: el talo erecto de un alga. Generalmente se usa para referirse a formas no filamentosas.

Gametangio: célula en que se forman los gametos.

Gametofito: plantas microscópicas en que se originan los gametangios; fase haploide en la alternancia de generaciones

Hapterio: porción del disco de adhesión que parece raíz más grueso que un rizoides

Heteromorfo: tipo de ciclo de vida en que una de las fases es diferente en estructura y tamaño a la otra fase.

Ovocelula: célula sexual femenina, algas pardas

Pedicelo: soporte en forma de tallo delgado; en algunas algas pardas y rojas, una célula única que soporta esporangios o gametofitos

Plántula: algas en sus primeros estadios de desarrollo después de la germinación.

Poliqueto: Clase de gusanos anélidos, predominantemente marinos y unisexuales, de cuerpo cilíndrico, con branquias, anillos provistos de numerosas cerdas llamadas quetas y una región cefálica diferenciada con ojos y tentáculos.

Soro: conjunto de células reproductivas, superficiales o dentro de órganos especializados, como conceptáculos o nematecios.

Zoosporas: espora móvil provista de flagelos en algas verdes y pardas

Algabase, 2010. www.algabase.org

Algaspardas, 2010. www.algaspardas.cl;

Avila, M., Hoffmann, A., y Santelices, B. 1985. Interacciones de temperatura, densidad de flujo fotónico y fotoperíodo sobre el desarrollo de etapas de etapas microscópicas de *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminariales). Revista Chilena de Historia Natural. 58: 71- 82.

Hoffmann, A y Santelices, B. 1997. Flora marina de Chile Central. Ediciones Universidad Católica de Chile . 434pp.

McLachlan, J. 1973. Growth media- marine. In Stein, J.R. (ed) Handbook of phycological methods. Cambridge University Press. New York 25-51.

Santelices B. 1989. Algas Marinas de Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile. 399 pp.

Sernapesca, 2010. www.sernapesca.cl

Vásquez J. & A. Vega. 2004. Ecosistemas marinos costeros del Parque Nacional Bosque Fray Jorge. En: F. A. Squeo, J.R. Gutierrez, I.R. Hernandez (Eds) Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge. 13: 235-252. Ediciones Universidad de La Serena, Chile.

Vásquez, J. Fonck E. & A Vega. 2001. Diversidad, abundancia y variabilidad temporal de ensambles de macroalgas del submareal rocoso del norte de Chile. En: Alveal, K y T. Antezana (eds) Sustentabilidad de la biodiversidad : un problema actual, bases científico técnicas, teorizaciones y proyecciones: 351-365. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Westermeier R. , D. Patiño, M.I.Piel, I. Maier y D.G. Müller (2006) A new approach to Kelp Mariculture in Chile: Production of free – floating Sporophyte seedlings from Gametophyte Cultures of *Lessonia trabeculata* and *Macrocystis pyrifera*. Aquaculture Research 37: 164-171

Westermeier R., D. Patiño & D. G. Müller (2007). Sexual compatibility and hybrid formation between the giantkelp species *Macrocystis pyrifera* and *M. integrifolia* (Laminariales, Phaeophyceae) in Chile. J Appl Phycol (2007) 19:215–221





MANUAL DE CULTIVO DE MACROALGAS PARDAS

Desde El Laboratorio Al Océano

Programa de Manejo, Cultivo y Repoblamiento para las Algas Pardas en la
Region de Tarapacá

Fondo de Innovación Competitiva (Fic) - Gobierno Regional de Tarapacá

Universidad Arturo Prat

Departamento de Ciencias del Mar - Campus Huayquique. Iquique
Laboratorio de Algas. Instituto de Ciencia y Tecnología. Puerto Montt



Universidad
ARTURO PRAT
del Estado de Chile

