

## PRESERVACIÓN DE *CYANOPHYCEAE* BAJO ACEITE MINERAL (\*)

Por DELIA R. DE HALPERIN (\*\*)

### INTRODUCCION

Una de las tareas inherentes al mantenimiento de una colección de cultivos, es la búsqueda y ensayo de nuevos métodos que aseguren una óptima conservación de las cepas con el menor número posible de repicados.

Con esa finalidad se ensayó la *preservación de algas azules bajo aceite mineral estéril*. Desde que Lumière y Chevrotier lo emplearon por primera vez en el año 1914 para conservar cultivos de bacterias, se utilizó con éxito en el mantenimiento de diversos microorganismos como lo atestigua la frondosa bibliografía al respecto (Morton et Pulaski, 1938; Buell et Weston, 1947; Henry, 1947; Perlman y colaboradores, 1955; Haynes y colaboradores, 1955; Hartsell, 1953 y 1956; Santa María Ledoehowski, 1956; Halperin y colaboradores, 1958; Fennell, 1960; etc.). Las ventajas de este método, puntualizadas por Morton et Pulaski en 1938, residen fundamentalmente en su simplicidad que lo hacen practicable en cualquier laboratorio dado que no requiere aparatos ni dispositivos especiales; las cepas no exigen tratamiento previo; los repicados no interfieren en la preservación del cultivo y asegura además una óptima conservación durante largos períodos de tiempo, sin modificación de las características culturales y bioquímicas.

En algas sin embargo, los antecedentes bibliográficos son muy escasos: W. J. Robbins y colaboradores (1953) mantuvieron cultivos de *Euglena* sp. durante 19 meses en medio nutritivo líquido cubierto con

---

(\*) Contribución Técnica N° 4 del Centro de Investigación de Biología Marina (I.N.T.I.).

(\*\*) Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.B. A., Moreno 963, Buenos Aires.

Miembro de la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Rep. Argentina.

una capa de aceite mineral a 15°C en la oscuridad, y durante 15 meses en las mismas condiciones culturales a 25°C e iluminación constante. Santa María Ledochowski (1956) ensayó la conservación de *Chlorella pyrenoidosa* Chick N° 252, en estrías de agar-Bristol-proteosa (Starr, 1960) recubiertas con vaselina líquida en dos condiciones: "Temperatura ambiente-luz difusa" y "Frío (3°C-6°C)-oscuridad" observando que la cepa se mantuvo viable durante 6 meses como máximo, solamente en la segunda de las condiciones citadas. L. Hedrick, según comunicación personal (1960), logró mantener una *Chlorophyta* incolora del orden de las *Chlorococcales*, *Prototheca zopfii* Krüger, en estrías bajo aceite mineral durante 5 años a la temperatura del laboratorio.

Estos ensayos son tan limitados en cuanto al número de especies algales involucradas, que en realidad no permiten llegar a conclusiones definitivas respecto a la eficacia del método seguido. Starr (1962) en la "Specialists Conference on Culture Collection" realizada en Canadá, llama la atención sobre el número reducido de trabajos encaminados a ensayar en las algas, los distintos métodos de preservación que resultan ventajosos en otros microorganismos.

Entre los métodos de conservación utilizados actualmente en algas, además de los medios de cultivo específicos óptimos para cada cepa —que no contemplan la frecuencia del transplante—, cabe mencionar el de la liofilización (Daily et McGuire, 1954; Watanabe, 1959; Holm-Hansen, 1964), así como la preservación en estado semi-húmedo sobre gravilla volcánica porosa (Watanabe, 1959) o en arena desecada (Venkataraman, 1961), a más de los pocos casos ya mencionados en los cuales se empleó la vaselina líquida. También se ha ensayado la conservación de algas a bajas temperaturas (desde -196°C hasta -10°C), con resultados muy diversos según las especies (Holm-Hansen, 1963; Whiltton, 1962).

Dada la simplicidad del método del aceite mineral hasta ahora eficientemente utilizado en el mantenimiento de hongos, levaduras y bacterias, y en vista de la escasa experiencia de su aplicación en algas, hemos considerado de interés la realización de este trabajo empleando un mayor número de especies pertenecientes a diversos géneros. Los resultados obtenidos indican la ventaja del uso de la vaselina líquida en la preservación de algas azules, si bien su eficacia varía con las distintas cepas ensayadas.

#### MATERIAL Y METODOS

A. CEPAS: Se ensayaron 8 cepas de *Cyanophyceae*, —7 en condición de cultivo uni-algal y 1 bacteriológicamente puro (N° 23)—, correspondientes a 8 géneros incluidos en 4 familias:

N° 42: *Oscillatoria brevis* Kützing (*Oscillatoriaceae*).

N° 52: *Microcoleus vaginatus* (Vauch.) (*Oscillatoriaceae*).

Nº 62: *Hydrocoleum heterotrichum* Kützing (*Oscillatoriaceae*).

Nº 23: *Nostoc muscorum* Agardh (*Nostocaceae*).

Nº 61: *Anabaena variabilis* (Kütz.) Born. et Flahault (*Nostocaceae*).

Nº 82: *Scytonema hofmannii* Agardh (*Scytonemataceae*).

Nº 92: *Microchaete diplosiphon* Gomont (*Scytonemataceae*).

Nº 72: *Calothrix parietina* (Näg.) Thuret (*Rivulariaceae*),

todas ellas provenientes de la Colección de Cultivos del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Halperin, 1963).

B. MEDIO DE CULTIVO: Las algas se cultivaron en tubos de ensayo sobre *vermiculita* (1) estéril utilizada como soporte físico (Halperin, i.c.), embebida con el medio nutritivo de Léfèvre-Jakob-Nisbet (1952) algo modificado:  $\text{NO}_3\text{K}$  cristalizado 0,200 gr;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  cristalizado 0,40 gr;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  0,30 gr;  $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$  cristalizado 0,30 gr;  $\text{Cl}_6\text{Fe}_2$  trazas; extracto de suelo 10 cc; agua destilada 1.000 cc. Esterilizar en autoclave 15 minutos a  $120^\circ\text{C}$  y agregar 1 cc de solución  $\text{A}_4$  de elementos menores (Arnon, 1938).

C. ACEITE MINERAL: Para recubrir los cultivos se utilizó vaselina líquida (2) incolora, neutra, de uso medicinal, que se esterilizó en horno Pasteur en tubos de ensayo a  $160\text{-}170^\circ\text{C}$  durante 1 hora. La experiencia indica que el aceite mineral evita la deshidratación del cultivo y reduce su crecimiento.

D. MÉTODO: Las cepas se sembraron en tubos de ensayo sobre *vermiculita* estéril embebida con el medio de cultivo en cantidad suficiente como para dejar una delgada capa sobrenadante, exponiéndolos a la luz de tubos fluorescentes de 40 W hasta obtener un crecimiento abundante. Luego se recubrieron con vaselina líquida estéril, procurando que ésta forme sobre la superficie del cultivo una capa de 2-3 cm de espesor.

Para cada cepa se ensayaron 3 condiciones:

- I. *Temperatura ambiente-luz difusa*
- II. *Temperatura ambiente-oscuridad*
- III. *Frío ( $4^\circ\text{-}8^\circ\text{C}$ )-oscuridad*

con los testigos correspondientes (sin cubrir con vaselina).

Por cada cepa y en cada una de las condiciones ensayadas, se hicieron 3 repeticiones con los testigos correspondientes sin aceite mineral.

(1) Granulado mineral; ver su composición química en The Merck Index of Chemicals and Drugs: 1092-1093, 1960.

(2) La vaselina líquida o aceite mineral es una mezcla de hidrocarburos líquidos de la serie parafínica, obtenidos del petróleo (Farmacopea Nac. Argentina, 1956; Grant, 1946).

Los *controles microscópicos* de los cultivos mantenidos bajo vaselina líquida se realizaron por observación directa al microscopio, anotando el aspecto, forma y color de los tricomas, presencia de acinetas, estado de germinación de las mismas, etc. Para los *controles de viabilidad*, las cepas se inocularon en el medio nutritivo líquido antes mencionado, exponiéndolas a la luz; la observación cualitativa del crecimiento se hizo a los 30, 60 y 90 días.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El ensayo se inició en diciembre de 1962; los resultados obtenidos a los 3 años de conservación se consignan en el cuadro adjunto.

Del análisis comparativo de los datos obtenidos en las 3 condiciones ensayadas, se concluye que la preservación a *Temperatura ambiente-luz difusa* es la más favorable, ya que 6 de las 8 cepas probadas (75 %) muestran viabilidad positiva a los 30 días, que se mantiene o se acrecienta a los 60 y 90 días.

En la mayoría de los cultivos con viabilidad positiva, el control microscópico indica la presencia de tricomas normales, a veces algo decolorados como en *Calothrix parietina* y además, en las especies que forman acinetas como *Nostoc muscorum* y *Anabaena variabilis*, muchas de ellas se encuentran en vías de germinación. Solamente en una cepa, —*Microcoleus vaginatus*—, se observa un escaso número de tricomas con aspecto normal. En los cultivos con viabilidad negativa (25 %), el control microscópico correspondiente revela que el material está completamente desintegrado (*Oscillatoria brevis* e *Hydrocoleum heterotrichum*).

En los cultivos mantenidos bajo aceite mineral y con viabilidad positiva a *Temperatura ambiente-luz difusa*, se observa un aumento de la masa algal que se va extendiendo en la profundidad de la vermiculita, disponiéndose siempre sobre las paredes del tubo de ensayo del lado más iluminado.

En la condición *Frío-oscuridad*, de las 8 cepas ensayadas, los controles de viabilidad muestran en un 62,5 % (5 cultivos) un crecimiento escaso a los 30 días que se mantiene o aumenta a los 60 y 90 días, pero sin alcanzar el desarrollo observado a *Temperatura ambiente-luz difusa*. Morfológicamente en estos cultivos, la mayoría de los tricomas aparecen contraídos, uno que otro solamente con aspecto normal (Nº 52, 92 y 72) o reducidos a masas de acinetas como en las cepas Nº 23 y 61.

Es de notar que en esta condición no se observa un aumento de la masa algal como a *Temperatura ambiente-luz difusa*, conservándose solo el crecimiento alcanzado en el momento de recubrir los cultivos con la vaselina líquida.

La condición *Temperatura ambiente-oscuridad* es la menos favorable para la conservación de las cepas; todos los cultivos con excepción de los que forman acinetas (Nº 23 y 61) no son viables. El control microscópico de los mismos revela la desintegración total del material.

Los testigos correspondientes a las 3 condiciones ensayadas (cultivos sin recubrir con aceite mineral) están completamente desecados al cabo de 3 años y su viabilidad es negativa a los 30 días; sin embargo en algunas de las cepas mantenidas a *Temperatura ambiente-luz difusa* y *Frío-oscuridad* se observa un crecimiento escaso a los 60 días.

Si bien en principio se podría pensar que los testigos de la condición *Temperatura ambiente-luz difusa* pueden representar en sí un medio de preservación adecuado, es de notar que la viabilidad de los mismos es muy inferior a la observada en los cultivos correspondientes mantenidos bajo aceite mineral.

### RESUMEN

Se ensayó la preservación bajo aceite mineral de 8 cepas de *Cyanophyceae*: *Oscillatoria brevis* Kützing; *Microcoleus vaginatus* (Vauch.) Gomont; *Hydrocoleum heterotrichum* Kützing; *Nostoc muscorum* Agardh; *Anabaena variabilis* (Kütz.) Bornet et Flahault; *Scytonema hofmannii* Agardh; *Microchaete diplosiphon* Gomont y *Calothrix parvifera* (Näg.) Thuret.

Las pruebas se realizaron en diferentes condiciones de luz y temperatura: *Temperatura ambiente-luz difusa*, *Temperatura ambiente-oscuridad* y *Frío* (4°-8°C)-*oscuridad*, con los testigos correspondientes sin recubrir con vaselina líquida.

Los resultados obtenidos a los 3 años de conservación indican que la condición *Temperatura ambiente-luz difusa* es la más favorable: un 75 % de las cepas ensayadas muestran viabilidad positiva a los 30 días, viabilidad que se mantiene o acrecienta a los 60 y 90 días. Correlativamente, el control microscópico de la mayoría de estos cultivos revela la presencia de tricomas normales y además, en las especies que forman acinetas, muchas de ellas aparecen en vías de germinación. Es de notar también, que sólo en esta condición se observa un aumento de la masa algal.

En los testigos correspondientes —cultivos sin recubrir con aceite mineral—, el material está completamente desecado al cabo de 3 años; su viabilidad es negativa a los 30 días y con indicios de un crecimiento escaso a los 60 días.

### SUMMARY

Eight strains of *Cyanophyceae* were preserved under mineral oil: *Oscillatoria brevis* Kütz.; *Hydrocoleum heterotrichum* Kütz.; *Microco-*

*leus vaginatus* (Vauch.) Gomont; *Nostoc muscorum* Ag.; *Anabaena variabilis* (Kütz.) Born. et Flah.; *Scytonema hofmannii* Ag.; *Microchaete diplosiphon* Gomont and *Calothrix parietina* (Näg.) Thuret. These strains were tested under three different conditions: *Room temperature-diffuse light*, *Room Temperature-darkness* and *Cold* (4°C-8°C)-*darkness*, together with their corresponding control cultures without paraffin oil.

According to the results obtained after 3 years of conservation, the most favourable condition is *Room temperature-diffuse light* since 75 % of the strains tested show positive viability after 30 days. This viability is maintained or increased after 60 and 90 days. The microscopical observation of most of these cultures shows normal trichomes besides akinetes in species in which these are usually found, many of them germinating. Another fact to consider is that only in this condition the algal mass increases.

The corresponding control cultures —not covered with mineral oil—, were absolutely dry. Viability was negative after 30 days and a poor growth was observed after 60 days.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

- ARNON, D. I., 1938. Micro elements in culture solution experiments with higher plants. *Am. J. B.* 25(5): 322-325.
- BUELL, C. B. and W. H. WESTON, 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collection of fungous cultures. *Am. J. B.* 34(10): 555-561.
- DAILY, W.-A. and J. M. MCGUIRE, 1954. Preservation of some algal cultures by lyophilization. *Butler Univ. Bot. Studies* 11:139-143, 1 fig.
- FARMACOPEA NACIONAL ARGENTINA, 1956. Codex Medicamentarius Argentino; 4, Ed.; Imprenta Central Minist. Asist. Social y Salud Pública, Buenos Aires.
- FENNELL, D. I., 1960. Conservation of fungous cultures. *The Bot Rev.* 26(1):79-141.
- GRANT, J., 1946. Hack's Chemical Dictionary. The Blakiston Co., Philadelphia, U. S. A.
- HALPERIN, D. R. de, A. E. DE PASTORIZA y E. ATLAS, 1948. Método para conservar levaduras esporógenas sin esporular. *Rev. Invest. Agrícolas* 12(1): 81-89.
- HALPERIN, D. R. de, 1963. Colección de Cultivos de Cianofíceas. *Darwiniana* 12(4): 559-567, 1 lám.
- HARTSELL, S. E., 1953. The preservation of Bacterial Cultures under Paraffin oil. *Appl. Microb.* 1(1): 36-41.
- HARTSELL, S. E., 1956. Maintenance of cultures under paraffin oil. *Appl. Microb.* 4(6): 350-355.
- HAYNES, W. C., L. J. WICKERHAM and C. W. HESSELTINE, 1955. Maintenance of cultures of Industrially important Microorganisms. *Appl. Microb.* 3(6): 361-368.
- HENRY, B. S., 1947. The viability of yeast cultures preserved under mineral oil. *J. Bact.* 54(2): 264.
- HOLM-HANSEN, O., 1963. Viability of Blue-Green and Green Algae after Freezing. *Phys. Plantarum* 16: 530-540.
- HOLM-HANSEN, O., 1964. Viability of lyophilized algae. *Can. J. Bot.* 42: 127-137.

- LEFEVRE, M., H. JAKŹB et M. NISBET, 1952. Auto et hétéro-antagonisme chez les algues d'eau douce. *Ann. St. Centr. Hydrob. Appl. Min. Agric.* 4: 5-198.
- LUMIERE, A. et J. CHEVROTIER, 1914. Sur la vitalité des cultures de gonocoques. *C. R. Acad. Sc. Paris* 158: 1820-1821.
- MORTON, H. E. and E. J. PULASKI, 1938. The preservation of bacterial cultures I. *J. Bact.* 35: 163-183.
- PERLMAN, D. y colaboradores, 1955. Symposium on the maintenance of cultures of microorganisms. *Bact. Rev.* 19(4): 280-283.
- ROBBINS, W. J., A. HBERVEY and M. E. STEBBINS, 1953. *Euglena* and vitamin B<sub>12</sub>. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 56: 818-830.
- STARR, R. C., 1960. The Culture Collection at Indiana University. *Am. J. Bot.* 47(1): 67-86.
- STARR, R. C., 1963. Culture Collection of Algae. "Specialists Conference on Culture Collections", August 27-28, 1962. Nat. Res. Council, Ottawa, Canadá.
- SANTA MARIA LEDOCHOWSKI, J., 1956. Sobre las técnicas de conservación de cultivos de microorganismos. *An. Inst. Nac. Invest. Agronómicas*, Madrid 5(2): 183-194.
- THE MERCK INDEX OF CHEMICAL AND DRUGS, 1960. Merck and Co. Rahway, N. Y.; 7th. Ed., U.S.A.
- VENKATARAOAN, G. S., 1961. A method of preserving blue-green algae for seeding purposes. *J. Gen. Appl. Microb.* 7(2): 96-99, figs. 1-9.
- WATANABE, A., 1959. Some devices for preserving blue-green algae in viable state. *J. Gen. Appl. Microb.* 5(3): 153-157, figs. 1-2.
- WHITTON, B. A., 1962. Effect of deep-freeze treatment on blue-green algal cultures. *Brit. Phycol. Bull.* 2(3): 177-178.

**Preservación de "Cyanophyceae" bajo aceite mineral. Control microscópico y viabilidad  
a los 3 años en las 3 condiciones ensayadas**

CEPAS:	TEMPERATURA AMBIENTE - LUZ DIFUSA						TEMPERATURA AMBIENTE - OSCURIDAD						FRIO - OSCURIDAD											
	CON VASELINA			TESTIGO (1)			CON VASELINA			TESTIGO			CON VASELINA			TESTIGO								
	C. M. (2)	C. V. (3)		C. M.	C. V.		C. M.	C. V.		C. M.	C. V.		C. M.	C. V.		C. M.	C. V.							
	a	b	c		a	b	c		a	b	c		a	b	c		a	b	c					
Oscillatoria brevis N° 42	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-
Microcoleus vaginatus N° 52	Algunos tricomas normales	±	+	++	Desecado	-	±	+	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-	Algunos tricomas normales	±	±	-	Desecado	-	±	±
Hydrocoleum heterotrichum N° 62	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-
Nostoc muscorum N° 23	Tricomas normales. Acinetas en germinación	++	++	++	Desecado	-	±	+	Acinetas	+	++	++	Desecado	-	-	-	Acinetas	±	+	+	Desecado	-	±	±
Anabaena variabilis N° 61	Tricomas normales. Acinetas en germinación	++	++	++	Desecado	-	±	+	Acinetas	+	+	+	Desecado	-	-	-	Acinetas	±	+	+	Desecado	-	±	±
Microchaete diplosiphom N° 92	Tricomas normales	+	+	++	Desecado	-	±	+	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-	Tricomas muy contraídos	±	±	±	Desecado	-	±	±
Scytonema hofmannii N° 82	Tricomas normales y muchos desintegrados	+	++	++	Desecado	-	±	+	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-	Tricomas contraídos y desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-
Calothrix parietina N° 72	Tricomas algo decolorados	++	++	++	Desecado	-	±	+	Tricomas desintegrados	-	-	-	Desecado	-	-	-	Tricomas contraídos muchos desintegrados	±	±	±	Desecado	-	±	±

Referencias: (1) Testigo = sin recubrir; (2) C. M. = control microscópico; (3) C. V. = control de viabilidad a los 30, 60 y 90 días (a, b y c respectivamente); (4) - = no se observa crecimiento; (5) ± = crecimiento escaso; (6) + = buen crecimiento; (7) ++ = crecimiento abundante.