

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 020 982**

21 Número de solicitud: 202330964

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

A01G 33/00 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

23.11.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.05.2025

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

13.08.2025

Fecha de concesión:

19.09.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

26.09.2025

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (90.00%)

Ctra. Sacramento s/n

04120 La Cañada de San Urbano (Almería) ES y

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL

HERRIKO UNIBERTSITATEA (10.00%)

72 Inventor/es:

MACÍAS DE LA ROSA, Adrián;

CERÓN GARCÍA, María Del Carmen;

LÓPEZ ROSALES, Lorenzo;

GARCÍA CAMACHO, Francisco;

SÁNCHEZ MIRÓN, Asterio y

SEOANE PARRA, Sergio

74 Agente/Representante:

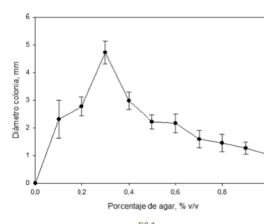
ESCUDERO PRIETO, Nicolás Enrique

54 Título: **MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS MICROALGALES EN UN MEDIO SEMISÓLIDO**

57 Resumen:

Método para la conservación de cepas microalgales en un medio semisólido.

La presente invención se refiere a un método de conservación de cepas microalgales en un medio semisólido a medio-largo plazo. Ventajosamente, el método de la invención comprende la realización de los siguientes pasos: (a) disponer un primer recipiente de cultivo, donde dicho recipiente contiene un medio de cultivo microalgal semisólido que comprende una concentración de agar entre 0,1-1,0 % v/v; (b) depositar una cepa microalgal sobre el medio de cultivo microalgal semisólido; y (c) incubar la cepa microalgal depositada sobre el medio de cultivo microalgal semisólido a una temperatura comprendida entre los 15-30 °C y bajo una irradiación incidente de 40-400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de entre 16:8 a 8:16 (luz: oscuridad) durante un tiempo entre 7-30 días.



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 3 020 982 B2

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS MICROALGALES EN UN MEDIO SEMISÓLIDO

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca en el campo de los procesos de conservación de microorganismos. Más concretamente, el objeto de la invención se refiere a un método para la conservación de cepas microalgales en un medio semisólido que prolongue la viabilidad de estas células para su posterior uso y crecimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos altamente eficientes en la fijación de dióxido de carbono, así como en la generación de materia orgánica ("biomasa") a partir de energía solar. Además, presentan una rápida tasa de reproducción en cultivo líquido (1-10 días), tolerancia a condiciones extremas, alto contenido lipídico (más del 50% en peso en algunos casos), bajos requerimientos de sustrato y espacio para su cultivo, plasticidad metabólica, capacidad de sintetizar y secretar algunos metabolitos, y posibilidad de manipulación genética.

Las excelentes propiedades de estos microorganismos han desencadenado un creciente interés en los campos de la bioingeniería, la biomedicina, y la biotecnología. En concreto, para la producción de biocombustibles, biofertilizantes, biocompuestos (ácidos grasos, pigmentos, vitaminas, antibióticos, etc.), nutracéuticos, y piensos para ganado y acuicultura, la depuración de aguas residuales, la absorción de CO₂, y el desarrollo de cosmética orgánica. Para que estos usos sean viables a escala industrial, se requiere, no solo una producción masiva que preserve la integridad genética y características funcionales de las microalgas, sino también que se descubran y valoricen un mayor número de especies. Ello acentúa la importancia de los métodos de preservación a largo plazo de líneas celulares puras, pues una alteración genética puede conducir a cambios en la productividad y bioactividad de la cepa de microalga en cuestión.

35 Aunque existen un amplio abanico de técnicas que permiten mantener viables a las células con el fin de que estén disponibles en un estado biológicamente activo en el futuro, en el

caso concreto de las microalgas, es un tema complejo. Esto se debe a la presencia de pared celular de algunas cepas, así como una fisiología específica casi para cada género según se adapten a entornos salinos, dulces o con escasos recursos hídricos.

- 5 El subcultivo en medio líquido es el método más primitivo para mantener cultivos de microalgas. Consiste en la transferencia periódica y secuencial de una alícuota de cultivo algal conteniendo células a un tubo o matraz que contiene medio líquido fresco diluido. Esta dinámica permite mantener las células viables durante largos periodos de tiempo, con un bajo coste tanto a nivel técnico como económico, pues únicamente se requiere
10 medio de cultivo fresco, matraces y un entorno aséptico. Sin embargo, este método aumenta el riesgo de contaminación microbiana del cultivo y de mutaciones en las microalgas, lo que genera cambios fenotípicos y aumenta la probabilidad de perder la bioactividad de interés. Por ello, el uso de este método debería restringirse al mantenimiento de cultivos a corto plazo (p. ej. como inóculos para el desarrollo de
15 experimentos puntuales), pero no para la preservación de las estirpes a largo plazo por los riesgos que conlleva.

- En 1954, Daily y McGuire introdujeron la liofilización como método de conservación de cepas microalgales a medio-largo plazo, consistente en la extracción del agua de las
20 células mediante sublimación. Con el paso de los años, se ha modificado para incluir tres fases: congelación, secado primario y secado secundario. Los cultivos se someten primero a temperaturas de alrededor de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la fase de congelación. Después, a vacío durante un máximo de 2 horas para inducir la sublimación y eliminar la humedad. Y, por último, se deshidratan aún más en la fase de secado secundario elevando la temperatura a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y
25 terminando con la inmersión en una atmósfera de gas inerte como el nitrógeno. Los cultivos conservados de esta manera son estables a temperatura ambiente y son altamente resistentes a la contaminación bacteriana y fúngica debido a su bajo grado de humedad. Además, el pequeño volumen requerido por los cultivos liofilizados permite utilizar los recursos de manera eficiente al reducir el espacio de almacenamiento, el uso
30 de energía, y los costes de transporte. Como desventajas, se ha observado que la viabilidad celular disminuye a medida que aumenta la duración del almacenamiento y que este método de preservación no es adecuado para microalgas con un alto contenido lipídico –posiblemente debido a la oxidación química o la actividad bacteriana– o flageladas, como es el caso de las haptófitas (*Haptophyta* o *Prymnesiophyta*), por tratarse
35 de células móviles y crecer en ambientes salinos.

Estas desventajas condujeron a la aplicación de la criopreservación en la conservación de cepas microalgales a medio-largo plazo. Este método consiste en someter y mantener un inóculo del cultivo microalgal a una temperatura muy reducida (comprendida entre -70 °C y -195 °C), generalmente en presencia de un agente crioprotector para evitar la formación de cristales de hielo que puedan dañar las células (glicerol, sacarosa, etc.). A estas temperaturas tan bajas, todos los procesos bioquímicos dentro de las células se detienen, dejando a las mismas en un estado de reposo. A diferencia de la liofilización, la criopreservación sí es aplicable a las microalgas flageladas, encontrándose varios ejemplos de ello en el estado de la técnica [véase Kihika, J.K., et al. Sci. Rep., 2022, 12 (1), p. 646; Rhodes, L., et al. Cryobiology, 2006, 52 (1), p. 152-156].

En base a este estado de la técnica, y dada la subida del coste de la energía eléctrica y la agudización de los efectos del cambio climático, surge la necesidad de desarrollar un método de conservación de cepas microalgales a largo plazo sostenible desde un punto de vista medioambiental, con un mínimo consumo de energía, coste y mano de obra sin que ello afecte a la viabilidad celular.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra diluciones seriadas de la microalga flagelada *C. rostralis* cultivada en placas Petri con 0,15% o 0,2% de agar y f/2 (30 PSU) como medio de cultivo para la obtención de colonias aisladas, donde las condiciones de cultivo para las placas Petri de la hilera superior son: (1) 0,15% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/1, (2) 0,15% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/10, (3) 0,15% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/100, (4) 0,15% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/1000, (5) 0,15% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/10000, y donde las condiciones de cultivo para las placas Petri de la hilera inferior son: (1) 0,2% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/1, (2) 0,2% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/10, (3) 0,2% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/100, (4) 0,2% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/1000, (5) 0,2% agar, medio f/2, 30 PSU, dilución: 1/10000.

La Figura 2 muestra el crecimiento en diámetro de *C. rostralis* cultivada en placas Petri con proporciones variables de agar técnico a 0,0% v/v, 0,1% v/v, 0,2% v/v, 0,3% v/v, 0,4% v/v, 0,5% v/v, 0,6% v/v, 0,7% v/v, 0,8% v/v, 0,9% v/v y 1,0% v/v, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método que permite mantener cepas microalgales, preferentemente flageladas, en medio semisólido con agentes gelificantes de manera que puedan ser viables para su posterior recuperación en medio líquido de cultivo. Dados los costes de la energía y la exigencia por encontrar procedimientos sostenibles que, además, prolonguen la viabilidad celular, este tipo de conservación de microalgas resulta una mejor alternativa que la criopreservación. De esta manera se evitan problemas por pérdida de viabilidad.

El método de la invención permite mantener el cultivo de microalgas durante tiempos prolongados mayores a los reportados en documentos del estado de la técnica, con una menor variabilidad de poblaciones y una reducción de la mano de obra y coste de dichos mantenimientos. Además, puede ser utilizado para el transporte a temperatura ambiente, y facilita la reproducibilidad de bioprocesos basados en microalgas, particularmente microalgas flageladas, al preservar la estabilidad metabólica original de las células.

Así, la presente invención se refiere a un método para la conservación de una cepa microalgal, caracterizado por que comprende la realización de los siguientes pasos:

- a) disponer un primer recipiente de cultivo, donde dicho recipiente contiene un medio de cultivo microalgal semisólido que comprende una concentración de agar entre 0,1-1,0% v/v;
- b) depositar una cepa microalgal sobre el medio de cultivo microalgal semisólido; e
- c) incubar la cepa microalgal depositada sobre el medio de cultivo microalgal semisólido a una temperatura comprendida entre los 15-30°C y bajo una irradiación incidente de $40-400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de entre 16:8 a 8:16 (luz: oscuridad) durante un tiempo entre 7-30 días.

Transcurrido el periodo de tiempo indicado en la etapa (c) (es decir, una vez transcurridos los 30 días), el método puede incluir opcionalmente una etapa (d), de tomar células adaptadas al cultivo en agar, resuspender en medio líquido y repetir la operación descrita en las etapas (a) a (c).

En un modo de realización de la invención, la cepa microalgal que se deposita sobre el medio de cultivo microalgal semisólido en la etapa (b) del método de la invención procede de un cultivo en suspensión, donde el cultivo en suspensión es un cultivo en suspensión de la microalga que se quiere conservar. En la etapa (b) el paso de depositar la cepa microalgal sobre el medio de cultivo semisólido se realiza por cualquier técnica o por

cualquier medio conocido para el experto en la materia, y adecuado para la formación de colonias individuales. Así, en modos particulares de realización de la invención, un volumen relativamente pequeño de líquido (por ejemplo, pero no limitado a, 0.1-1.0 mL) que contiene un número conocido o un número desconocido de microalgas se esparce
 5 sobre la superficie de una placa de agar, creando una placa esparcida, o se deposita de forma discreta en forma de gotas individuales.

En el ámbito de interpretación de la presente invención, se entenderá por “microalga” cualquier microorganismo unicelular procariota o eucariota capaz de realizar fotosíntesis
 10 oxigénica. Por tanto, las cianobacterias se considerarán incluidas bajo dicho término en la presente invención. En el ámbito de interpretación de la presente invención, se entenderá por “cepa microalgal”, al grupo de microalgas que pertenecen a la misma especie pero que comparten ciertas características genéticas que no se encuentran en otros miembros de dicha especie.

15

En una realización particular del método de la invención, la cepa microalgal depositada en el paso b) sobre el medio de cultivo microalgal semisólido es una cepa microalgal flagelada. En modos particulares de realización de la invención la microalga flagelada es una microalga haptófito. En modos particulares de realización de la invención, la microalga
 20 es una microalga del género que se selecciona del grupo que consiste en *Chrysochromulina*, *Chlorella*, *Chrysotila*, *Emiliania*, *Ankistrodesmus*, *Haematococcus*, *Pavlova*, *Scenedesmus*, *Amphidinium*, *Euglena*, *Coelastrum*, *Chlamydomonas*, *Odontella*, *Closterium*, *Dunaliella*, *Pediastrum*, *Oscillatoria*, *Tetraselmis*, *Rhodomonas*, *Desmodesmus*, *Prymnesium*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Isochrysis*,
 25 *Botryococcus*, *Arthrospira*, *Nitzschia*, y combinaciones de los mismos. En una realización particular del método de la invención, la microalga es una microalga del género *Chrysochromulina*. En modos particulares de realización de la invención, la microalga es una microalga de la especie que se selecciona del grupo que consiste en *Chlorella acuminata*, *Chlorella antarctica*, *Chlorella vulgaris* var. *autotrophica*, *Chlorella bacterioidea*,
 30 *Chlorella botryoides*, *Chlorella chlorelloides*, *Chlorella colonialis*, *Chlorella conglomerata*, *Chlorella ellipsoidea* f. *antarctica*, *Chlorella elongata*, *Chlorella faginea*, *Chlorella vulgaris* f. *globosa*, *Chlorella godinezii*, *Chrysochromulina acantha*, *Chrysochromulina adriatica*, *Chrysochromulina ahrengotii*, *Chrysochromulina alifera*, *Chrysochromulina andersonii*, *Chrysochromulina apheles*, *Chrysochromulina bergenensis*, *Chrysochromulina palpebralis*,
 35 f. *bisquamata*, *Chrysochromulina brachycylindra*, *Chrysochromulina camella*, *Chrysochromulina campanulifera*, *Chrysochromulina cyathophora*, *Chrysochromulina*

- cymbium*, *Chrysochromulina discophora*, *Chrysochromulina elegans*, *Chrysochromulina ephippium*, *Chrysochromulina fragilis*, *Chrysochromulina inornamenta*, *Chrysochromulina lanceolata*, *Chrysochromulina latilepis*, *Chrysochromulina leadbeateri*, *Chrysochromulina mactra*, *Chrysochromulina mantoniae*, *Chrysochromulina megacylindra*,
5 *Chrysochromulina microcylindra*, *Chrysochromulina chiton* var. *minuta*, *Chrysochromulina novae-zelandiae*, *Chrysochromulina orbiculata*, *Chrysochromulina pachycylindra*, *Chrysochromulina palpebralis* f. *palpebralis*, *Chrysochromulina papillata*, *Chrysochromulina parva*, *Chrysochromulina pelagica*, *Chrysochromulina planisquama*, *Chrysochromulina pontica*, *Chrysochromulina pringsheimii*, *Chrysochromulina*
10 *pseudolanceolata*, *Chrysochromulina pyramidosa*, *Chrysochromulina quadrikonta*, *Chrysochromulina rotalis*, *Chrysochromulina simplex*, *Chrysochromulina spinifera*, *Chrysochromulina strobilus*, *Chrysochromulina tenuispina*, *Chrysochromulina tenuisquama*, *Chrysochromulina thronsenii*, *Chrysochromulina tobinii*, *Chrysochromulina vexillifera*, *Amphidinium aculeatum*, *Amphidinium acutissimum*, *Amphidinium acutum*,
15 *Amphidinium adriaticum*, *Amphidinium akanensis*, , *Amphidinium aloxalodium*, *Amphidinium asymmetricum*, *Amphidinium aureum*, *Amphidinium belauense*, *Amphidinium bipes*, *Amphidinium boekhoutensis*, *Amphidinium caerulescens*, *Amphidinium carbunculus*, *Amphidinium carterae*, *Amphidinium celestinum*, *Amphidinium coeruleum*, *Amphidinium conradii*, *Amphidinium conus*, *Amphidinium corallinum*,
20 *Scenedesmus armatus* var. *major*, *Scenedesmus brasiliensis* var. *major*, *Scenedesmus lefevrei* var. *manguinii*, *Scenedesmus matebae*, *Scenedesmus acuminatus* f. *maximus*, *Scenedesmus quadricauda* var. *microspina*, *Scenedesmus quadricauda* f. *minor*, *Scenedesmus parisiensis* f. *minus*, *Scenedesmus mirificus*, *Scenedesmus monomorphus*, *Scenedesmus morzinensis*, *Scenedesmus multispina*, *Scenedesmus multistriatus*,
25 *Scenedesmus muzzanensis*, *Scenedesmus naegelii*, *Scenedesmus disciformis* f. *obciturus*, *Scenedesmus obliquus* f. *tetradesmoides*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis litoralis*, *Isochrysis maritima*, *Isochrysis nuda*, *Isochrysis zhanjiangensis*, *Arthrospira amethystina*, *Arthrospira ardissonaei*, *Arthrospira argentina*, *Arthrospira balkrishnani*, *Arthrospira brevis*, *Arthrospira miniata* var. *constricta*, *Arthrospira gomontiana* var. *crassa*,
30 *Arthrospira desikacharyi* var. *platensis*, *Arthrospira jenneri* var. *platensis*, *Arthrospira jenneri*, *Arthrospira joshii*, *Arthrospira khannae*, *Arthrospira laxissima*, *Arthrospira margaritae*, *Arthrospira massartii* var. *indica*, *Arthrospira massartii*, *Arthrospira miniata*, *Arthrospira pellucida*, *Arthrospira platensis* var. *tenuis*, *Arthrospira platensis* var. *non-constricta*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira santannae*, *Arthrospira skujae*,
35 *Arthrospira spirulinoides* f. *tenuis*, *Arthrospira tenuis*, *Chlamydomonas lundii*, *Chlamydomonas korschikoffii* var. *macrochloris*, *Chlamydomonas macroplastida*,

Chlamydomonas incerta var. *macropyrenoidosa*, *Chlamydomonas macropyrenoidosa*, *Chlamydomonas macrostellata* var. *gallica*, *Chlamydomonas macrostellata*, *Chlamydomonas macrostigma*, *Chlamydomonas globosa* var. *maculata*, *Chlamydomonas maderaspatana*, *Chlamydomonas madraspatensis*, *Chlamydomonas magnusii*,
5 *Chlamydomonas magurensis*, *Chlamydomonas pila* f. *maior*, *Chlamydomonas moewusii* var. *major*, *Chlamydomonas pseudopulsatilla* var. *major*, *Chlamydomonas manshurica*, *Chlamydomonas maramuresensis*, *Chlamydomonas marsupium*, *Chlamydomonas marvanii*, *Chlamydomonas matwienkoi*, *Chlamydomonas mediotigmata*, *Chlamydomonas melanospora* y combinaciones de las mismas. En modos particulares de realización de la
10 invención, la microalga del género *Chrysochromulina* es una microalga de la especie que se selecciona del grupo que consiste en *Chrysochromulina acantha*, *Chrysochromulina adriatica*, *Chrysochromulina ahrengotii*, *Chrysochromulina alifera*, *Chrysochromulina andersonii*, *Chrysochromulina apheles*, *Chrysochromulina bergenensis*, *Chrysochromulina palpebralis* f. *bisquamata*, *Chrysochromulina brachycylindra*, *Chrysochromulina brevifilum*,
15 *Chrysochromulina camella*, *Chrysochromulina campanulifera*, *Chrysochromulina cyathophora*, *Chrysochromulina cymbium*, *Chrysochromulina discophora*, *Chrysochromulina elegans*, *Chrysochromulina ehippium*, *Chrysochromulina ericina*, *Chrysochromulina fragilis*, *Chrysochromulina hirta*, *Chrysochromulina inornamenta*, *Chrysochromulina lanceolata*, *Chrysochromulina latilepis*, *Chrysochromulina leadbeateri*,
20 *Chrysochromulina mactra*, *Chrysochromulina mantoniae*, *Chrysochromulina megacylindra*, *Chrysochromulina microcylindra*, *Chrysochromulina chiton* var. *minuta*, *Chrysochromulina novae-zelandiae*, *Chrysochromulina orbiculata*, *Chrysochromulina pachycylindra*, *Chrysochromulina palpebralis* f. *palpebralis*, *Chrysochromulina papillata*, *Chrysochromulina parva*, *Chrysochromulina pelagica*, *Chrysochromulina planisquama*,
25 *Chrysochromulina polylepis*, *Chrysochromulina pontica*, *Chrysochromulina pringsheimii*, *Chrysochromulina pseudolanceolata*, *Chrysochromulina pyramidosa*, *Chrysochromulina quadrikonta*, *Chrysochromulina rotalis*, *Chrysochromulina simplex*, *Chrysochromulina spinifera*, *Chrysochromulina strobilus*, *Chrysochromulina tenuispina*, *Chrysochromulina tenuisquama*, *Chrysochromulina thronsenii*, *Chrysochromulina tobinii*, *Chrysochromulina vexillifera*, y combinaciones de las mismas. En una realización particular del método de la
30 invención, la microalga del género *Chrysochromulina* es la microalga *Chrysochromulina rotalis*.

Tal y como se define en el contexto de la presente invención, el término “medio de cultivo
35 microalgal semisólido” se refiere a cualquier formulación de nutrientes adecuada más un agente gelificante. Es decir, el término “medio de cultivo microalgal semisólido” se refiere

- a cualquier solución que comprende los nutrientes necesarios para promover y sustentar, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de microalgas, donde dicha solución se mezcla con un agente gelificante. En el contexto de la presente invención, el agente gelificante es preferiblemente agar, aunque también es posible usar, de manera no
- 5 limitante, otros agentes gelificantes tales como polisacáridos del ácido glucurónico con ramnosa y glucosa y grupos O-acetil, goma gellan (Phytigel™, Gelzan™), etcétera. La solución del medio de cultivo puede ser uno cualquiera de los medios de cultivo líquido microalgales divulgados en Andersen, R. A. *Algal culturing techniques*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005. A modo de ejemplo, los medios de cultivo f/2 (Guillard
- 10 & Ryther 1962, Guillard 1975), L1 (Guillard & Hargraves 1993) y/o variaciones de los mismos podrían ser adecuados para este uso, tales como f/2, L1, K, ALGAL, Walne, BG, TAP y MM-F. En el contexto de la presente invención, el medio de cultivo se puede utilizar en agua dulce (0-0,5 PSU), en agua salobre (0,5-30 PSU), o en agua salada (30-50 PSU), teniendo que adecuar la salinidad del medio de cultivo al tipo de microalga. Así, los valores
- 15 de PSU pueden variar entre 0 y 50, dependiendo de lo halófilas o no que sea la microalga de estudio deseada. En el contexto de la presente invención, el término "PSU" (unidades prácticas de salinidad) se refiere a la relación de la conductividad de una muestra de agua de mar con respecto a la de una solución estándar de cloruro potásico (KCl).
- 20 En una realización particular del método de la invención, se dispone un primer recipiente de cultivo que contiene un medio de cultivo microalgal semisólido que comprende una concentración de agar entre 0,1-1,0% v/v, de entre 0,15-0,8% v/v, o de entre 0,2-0,4% v/v. En modos particulares de realización, la concentración de agar en el primer recipiente de cultivo es de 0,10% v/v, de 0,15% v/v, de 0,20% v/v, de 0,25% v/v, de 0,30% v/v, de 0,35%
- 25 v/v, de 0,40% v/v, de 0,45% v/v, de 0,50% v/v, de 0,65% v/v, de 0,70% v/v, de 0,75% v/v, 0,80% v/v, de 0,85% v/v, de 0,90% v/v, de 0,95% v/v, o de 1,00% v/v. En un modo preferido de realización de la presente invención, la concentración de agar en el primer recipiente de cultivo es de 0,3% v/v.
- 30 En el contexto de la presente invención, el término "primer recipiente de cultivo" se refiere, sin estar limitado a, a una placa de Petri estándar, una placa Petri de pozo profundo, una placa Petri cuadrada, una placa Petri compartimentada, una placa multipocillo, un tubo de ensayo, o similar.
- 35 Tal y como se usa en el contexto de la invención, el término "irradiación incidente" o "radiación incidente" se refiere a la iluminación a la que son sometidas las células de la

cepa de microalga, donde la radiación incidente se puede producir en un amplio rango de longitudes de onda (350-1000 nm), teniendo en cuenta que las longitudes de onda en los que emita el foco luminoso debe ser luz fotosintéticamente aprovechable (400-700 nm). En el contexto de la invención, la iluminación bajo la que se incuba la cepa microalgal, en unidades PPFD (acrónimo inglés para Photosynthetically Photon Flux Density/ Densidad de flujo de fotones fotosintéticos), es de 40-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, de 50-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, de 60-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, de 70-150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, o de 80-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En modos particulares de realización, la iluminación, en unidades PPFD, es de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350, o 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En un modo particular de la invención, la iluminación, en unidades PPFD, es de 80-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En modos particulares de realización de la invención, la iluminación se aporta con tubos fluorescentes, tubos incandescentes de halogenuros metálicos, diodos emisores de luz (LEDs), o cualquier combinación posible de los mismos. Los LEDs pueden ser mono- o multi-color, en distintos formatos como luminarias, tiras o clústeres. En modos particulares de realización de la invención, la irradiación se aporta con tubos fluorescentes de 58W.

En el ámbito de interpretación de la presente invención, se entenderá por “fotoperiodo” la relación entre las horas de luz y de oscuridad a las que es expuesta la cepa microalgal en el método de la presente invención. En modos particulares de realización de la invención, el fotoperiodo está en el rango de entre 16:8 a 8:16 (luz: oscuridad), de entre 15:9 a 9:15 (luz: oscuridad), de entre 14:10 a 10:14 (luz: oscuridad), o de entre 13:11 a 11:13 (luz: oscuridad). En modos particulares de realización, el fotoperiodo es 16:8 (luz: oscuridad), 15:9 (luz: oscuridad), 14:10 (luz: oscuridad), 13:11 (luz: oscuridad), 12:12 (luz: oscuridad), 11:13 (luz: oscuridad), 10:14 (luz: oscuridad), 9:15 (luz: oscuridad), o 8:16 (luz: oscuridad). En un modo preferido de realización de la invención, el fotoperiodo es de 12:12 (luz: oscuridad).

En otra realización preferente de la invención, la temperatura de incubación en el paso c) del método de la invención es de entre 15-30 °C, de entre 15-25 °C, de entre 16-22 °C, o de entre 17-19 °C. En modos particulares de realización de la presente invención, la temperatura de incubación en el paso c) del método de la invención es de 15 °C, de 16 °C, de 17 °C, de 18 °C, de 19 °C, de 20 °C, de 21 °C, de 22 °C, de 23 °C, de 24 °C, de 25 °C, de 26 °C, de 27 °C, de 28 °C, de 29 °C, o de 30 °C. En una realización preferida del método de la invención, la temperatura de incubación en el paso c) es de 18 °C.

En modos de realización particulares de la presente invención, la incubación de la cepa microalgal durante la etapa (c) se lleva a cabo durante un tiempo de entre 7-30 días. En realizaciones particulares de la invención, la incubación de la cepa microalgal durante la etapa (c) se lleva a cabo durante un tiempo de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días.

En modos de realización del método de la invención, el método comprende adicionalmente:

- i. aislar y resuspender al menos una colonia microalgal amplificada durante la etapa (c) en un segundo recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo de mantenimiento para obtener un cultivo primario de microalgas;
- ii. preparar al menos un escalado sucesivo mediante la inoculación del cultivo primario en al menos un tercer recipiente de cultivo, para generar inóculo adecuado para el volumen final de al menos un fotobiorreactor;
- iii. inocular al menos un fotobiorreactor.

Las etapas i-iii del método se realizan preferiblemente bajo agitación constante, ya que la agitación constante favorece el intercambio de materia entre el medio y el aire y mejora la mezcla en el interior del cultivo.

En un modo concreto de realización del método de la invención, dicho método comprende adicionalmente:

- i. aislar y resuspender al menos una colonia microalgal amplificada durante la etapa (c) en un segundo recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo de mantenimiento para obtener un cultivo primario de microalgas; e incubar el cultivo primario de microalgas a una temperatura comprendida entre los 15-30 °C bajo agitación constante y una irradiación incidente de 40-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante un tiempo entre 5-10 días;
- ii. preparar al menos un escalado sucesivo mediante la inoculación del cultivo primario en al menos un tercer recipiente de cultivo, para generar inóculo adecuado para el volumen final de al menos un fotobiorreactor; e incubar el al menos un escalado sucesivo a una temperatura comprendida entre los 15-30 °C bajo agitación constante y una irradiación incidente de 40-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante un tiempo entre 5-10 días;

- iii. inocular al menos un fotobiorreactor; e incubar el cultivo en el fotobiorreactor a una temperatura comprendida entre los 15-30 °C bajo agitación constante y una irradiación incidente de 40-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante un tiempo entre 5-10 días;

5 En el contexto de la invención, el término “cultivo primario” hace referencia al cultivo inicial en volumen reducido (por ejemplo, pero no limitado a, 10-25 ml de medio de cultivo) al seleccionar una colonia individual crecida en una placa, antes de realizar un cultivo en mayor escala (por ejemplo, pero no limitado a, 50-2000 ml de medio de cultivo). En un modo de realización particular de la presente invención, el cultivo primario es un cultivo
 10 semilla. El término “cultivo semilla” proviene de la expresión original en inglés “seed culture” (o también “starter culture”). En el ámbito de interpretación de la presente invención, se entenderá por “medio de cultivo de mantenimiento” cualquier solución que contenga los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de temperatura e iluminación, el crecimiento de microalgas. En particular, dicho medio de
 15 cultivo de mantenimiento es apropiado para la realización de un cultivo primario o cultivo semilla (en inglés “starter culture”). Los medios de cultivo ya indicados anteriormente para el crecimiento de una microalga pueden ser adecuados para esta etapa del método de la invención. Así, a modo de ejemplo, los medios de cultivo f/2 (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975), L1 (Guillard & Hargraves 1993) y/o variaciones de los mismos podrían ser
 20 adecuados para este uso.

En el contexto de la invención, el término “segundo recipiente de cultivo” se refiere a un recipiente adecuado para un cultivo primario o cultivo semilla, como puede ser, sin estar limitados a, tubos de fondo cónico, tubos de fondo redondo, tubos de tipo Falcon™, o
 25 similar, en un volumen de entre 5-50 mL. Por otra parte, el término “tercer recipiente de cultivo” se refiere a recipientes adecuados para realizar el escalado desde el cultivo semilla, hasta el cultivo de producción. En este caso, los recipientes adecuados pueden ser, sin estar limitados a, matraces Erlenmeyer, en un volumen de entre 0,05-2,00 litros. Por último, el cultivo de producción se realiza en un fotobiorreactor o sistema de cultivo
 30 similar, de al menos, pero sin restringirse a, 10 litros, de al menos 20 litros, de al menos 50 litros, de al menos 100 litros, de al menos 1 000 litros, de al menos 10 000 litros, de al menos 100 000 litros, o incluso de volumen superior a los 100 000 litros. Así, los fotobiorreactores pueden ser de hasta centenas de m³. En este último caso, se trataría ya de reactores de producción para la multiplicación masiva de la microalga de interés.

35

Adicionalmente, se puede verificar la carga bacteriana mediante la siembra de una colonia microalgal amplificada durante la etapa (c), o mediante la siembra del cultivo derivado de la etapa i). Así, en un modo de realización de la invención, el método comprende la etapa de verificar la carga bacteriana mediante la siembra de una colonia microalgal amplificada durante la etapa (c), o mediante la siembra del cultivo derivado de la etapa i). La verificación de la carga bacteriana que pueda tener el cultivo se puede realizar en paralelo al procedimiento de escalado para la preparación del cultivo de producción en el fotobiorreactor. En un modo de realización de la invención, la verificación de la carga bacteriana se lleva a cabo mediante un conteo en agar nutritivo. La etapa de verificación se lleva a cabo en agar nutritivo, y no en agar estándar microbiológico, ya que el agar nutritivo favorece el crecimiento bacteriano y visibiliza la carga bacteriana presente en el cultivo. En modos particulares de realización de la presente invención, el agar nutritivo (https://es.wikipedia.org/wiki/Agar_nutritivo) comprende (en valores % peso/ volumen): 0,5% de peptona; 0,3% de extracto de carne/ extracto de levadura; 1,5% de agar; 0,5% de cloruro de sodio; agua destilada; pH casi neutro (6,8) a 25 °C. El agar nutritivo para el proceso de cuantificación y control de la carga bacteriana que pudiera contener el cultivo se prepara con una matriz de agua, donde el agua tiene el mismo grado de salinidad (en unidades prácticas de salinidad, PSU) que se utiliza para el cultivo de la microalga, de tal manera que no se pierdan las bacterias que deben crecer en este entorno halófilo concreto. El proceso de cuantificación y control de la carga bacteriana se puede realizar en estático en placas Petri o sistemas de cultivo similares, donde se puede llevar a cabo el conteo. En modos particulares de realización, el cultivo en estático en placas Petri o similar para el conteo de la carga bacteriana se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre los 15-30 °C y una irradiación incidente de 40-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante un tiempo entre 5-10 días

El método de la presente invención hace posible y viable reducir la carga bacteriana mediante el aislamiento de colonias específicas de microalgas por debajo de un límite o carga bacteriana deseada (umbral de carga bacteriana). Así, el método de la invención permite reducir la carga bacteriana en al menos un 10%, en al menos un 15%, en al menos un 20%, en al menos un 25%, en al menos un 30%, en al menos un 35%, en al menos un 40%, en al menos un 45%, en al menos un 50%, en al menos un 55%, en al menos un 60%, en al menos un 65%, en al menos un 70%, en al menos un 75%, en al menos un 80%, en al menos un 85%, en al menos un 90%, en al menos un 95%, en al menos un 98%, o en al menos un 99%, con respecto a la carga bacteriana en el cultivo microalgal inicial.

Todos los términos y modos de realización descritos anteriormente son aplicables a cualquier aspecto y modo de realización de la invención. De acuerdo con la presente invención, el término en singular “el”, “la”, “un”, “uno”, “una”, se refiere igualmente a su correspondiente en plural “los”, “las”, “unos”, “unas”, salvo que se desprenda del contexto que claramente el término se refiere a una especie en el singular. El término “comprende” o “que comprende”, tal y como se usa en el presente documento, también describe “consiste en” o “que consiste en” de acuerdo con la práctica de patentes generalmente aceptada.

EJEMPLOS

La siguiente invención se describe por medio de los siguientes ejemplos, que deben interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención. A título de ejemplo se ensaya la microalga *Chrysochromulina rotalis*, partiendo del cultivo *Chrysochromulina rotalis* BMCC18 proporcionado por la colección vasca de cultivos de microalgas de la Universidad del País Vasco en medio líquido y mantenido como cultivo primario en agitación orbital en un matraz Erlenmeyer con un volumen de 25 mL con el medio de cultivo microalgal f/2 (Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol. 8: 229-239), contenía carga bacteriana observable bajo microscopía óptica, cuya concentración fue inicialmente establecida en 7×10^5 UFC/mL. Con el fin de asegurar la obtención de cultivos monoespecie para la cepa microalgal se realizaron cultivos en placas de agar salinas (PSU 30) con medio de cultivo microalgal f/2 (Guillard, 1962), donde se realizaron diluciones seriadas del cultivo hasta obtener colonias únicas y separadas de *C. rotalis*. Se inocularon 9 “gotas” de cultivo primario de *Chrysochromulina rotalis* BMCC18 por placa y se observó el crecimiento en diámetro de las colonias microalgales con el paso del tiempo. Tras 3 semanas de cultivo en una cámara termostatzada a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminación tipo ON/OFF realizada en un ciclo de 12:12 (luz: oscuridad) con tubos fluorescentes de 58W que aportaron $100 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, se tomaron fotografías desde un punto de vista de la planta de la placa y se midió el valor del diámetro de cada colonia crecida (Fig. 1). Estas colonias se mantuvieron durante un mínimo de 2 semanas en una cámara termostatzada a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminación tipo ON/OFF realizada en un ciclo de 12:12 (luz: oscuridad) con tubos fluorescentes de 58W que aportaron $100 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Semanalmente, se eliminaba la acumulación de agua formada en el interior de la placa y se repicaban los cultivos mensualmente sobre medio fresco.

Uno de los factores a solventar durante el mantenimiento de este microorganismo en placas Petri con agar fue el porcentaje de este gelificante, ya que a medida que se aumenta su proporción, se obtiene un medio más sólido, lo cual perjudica e imposibilita la

5 viabilidad de estas microalgas flageladas, llegando a ocurrir su inactivación por la rotura o pérdida de los flagelos. Algunos estudios indican que ciertas bacterias regulan la densidad en el número de sus flagelos en presencia de entornos viscosos. Es por ello por lo que, este valor tuvo que ser optimizado con el fin de mejorar la longevidad y viabilidad de las células microalgales mantenidas en placas Petri f/2 solidificadas. Así, la Figura 2 muestra

10 el crecimiento en diámetro de las colonias de *C. rostralis* provenientes del cultivo primario de *Chrysochromulina rostralis* BMCC18, cultivadas en placas Petri de 90 mm que contenían el medio de cultivo microalgal salino (PSU 30) f/2 semisólido en diferentes concentraciones de agar técnico microbiológico desde 0,1 a 1%. De acuerdo con los resultados obtenidos, la concentración óptima de agar es 0,3%, ya que su consistencia permite la gelificación

15 del medio manteniendo una textura porosa y vítrea. Asimismo, la carga bacteriana fue finalmente establecida en $3,7 \times 10^5$ UFC/mL, lo que supuso una reducción de un 50% de la carga bacteriana. Concentraciones de agar por debajo de 0,3%, presentaban un crecimiento del diámetro de las colonias disminuido en toda el área de la placa (principalmente a 0,1% de agar). Aunque en estos valores se presentaba mayor

20 crecimiento, no son tan eficaces como valores de 0,3% de agar ya que se buscaba una superficie fácil de transportar y que mantuviese la estructura del gel, adquiriendo los geles a concentraciones de agar por debajo de 0,3% una textura casi líquida. Por el contrario, porcentajes mayores a 0,3% de agar mostraban un comportamiento restrictivo respecto a la motilidad de las microalgas de la cepa *Chrysochromulina rostralis* BMCC18, dando como

25 resultado un menor diámetro de las colonias formadas.

En el caso de otras especies de microalga, algunos estudios han sido capaces de separar dos cepas de especies microalgales diferentes, *Chlamydomonas* y *Chlorella*, mediante el empleo de una concentración de agar del 0,45% [véase Banerjee, C. et al. Indian J.

30 Microbiol., 2012, 52, 710-712]. Bajo esta concentración de gelificante, las microalgas flageladas de agua dulce *Chlamydomonas* son capaces de moverse y dividirse en el agar por fototaxia, lo que indica la posibilidad de las microalgas flageladas de agua dulce *Chlamydomonas* para moverse y dividirse en porcentajes de agar dentro del rango definido en la presente invención.

35

Por otro lado, algunas investigaciones profundizan en la capacidad de generar alelopatía (influencia de un químico segregado por un organismo a otro) causada por diversas especies de microalgas marinas (*Scenedesmus quadricauda* y *Chorella vulgaris*) cuando se cultivan en sistemas semisólidos como el agar utilizando el cultivo en placas [véase

- 5 Chan, A. T., et al. Mar. Biol., 1980, vol. 59, p. 7-13]. Ello asevera la capacidad de difusividad en el medio de diversas moléculas excretadas de forma extracelular y que difunden e inhiben el crecimiento de otras microalgas en dicho medio semisólido, lo cual da indicios de su potencial para aislar líneas celulares microalgales de interés.
- 10 Finalmente, se ensayó la viabilidad de las colonias de *Chrysochromulina rotalis* BMCC18 conservadas por el presente método. Para ello, se eligió una placa Petri de un cultivo de conservación de acuerdo con la invención, donde la placa contiene medio de cultivo microalgal f/2 (30 PSU) semisólido con una concentración de agar de 0,3% y se procedió a su escalado hasta cultivo en un fotorreactor. Para ello, se picaron varias colonias
- 15 microalgales sembradas en la placa Petri y se resuspendieron en el medio de cultivo de mantenimiento (Tabla 1) en matraces Erlenmeyer de 50 mL de capacidad con un volumen de trabajo del 50% (es decir, 25 mL) a 18 ± 1 °C con una irradiación incidente de $80-100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

20 **Tabla 1.** Composición del medio de cultivo de mantenimiento.

	Medio de cultivo	
	Compuesto	f/2
Macronutrientes	NaNO ₃	8.82×10^{-4}
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.81×10^{-4}
	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	1.06×10^{-4}
Micronutrientes	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.17×10^{-5}
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.17×10^{-5}
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.10×10^{-7}
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7.65×10^{-8}
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	4.20×10^{-8}
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.93×10^{-8}
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.60×10^{-8}
Vitaminas	Tiamina·HCl (B1)	2.96×10^{-7}
	Biotina (H)	2.05×10^{-9}
	Cyanocobalamina (B12)	3.69×10^{-10}

El medio definido en la tabla 1 difiere del medio divulgado por Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther (Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8(2): 229-239) en que el medio de la presente invención presenta una concentración de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de 1.81×10^{-4} M, frente a una
5 concentración de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de 3.62×10^{-5} M, de tal manera que la relación nitrógeno/fósforo es 5. Los demás componentes permanecen inalterados.

A partir de aquí, se realiza una fase de escalado sucesivo mediante la inoculación de matraces Erlenmeyer con un volumen de 500 mL de medio de cultivo f/2 a 30 PSU con un
10 volumen en torno al 10% del volumen final de un cultivo microalgal que ha llegado a fase estacionaria al agotar nutrientes. Dichos matraces se someten a agitación constante entre 5-10 días en una cámara termostatzada a 18 ± 1 °C e iluminación tipo ON/OFF realizada un ciclo de 12:12 (luz:oscuridad) con tubos fluorescentes de 58 W que aportaban $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Este proceso se continúa para incrementar el volumen final una vez que el
15 crecimiento de la microalga se detiene por ausencia de nutrientes, hasta llegar a generar suficiente inóculo con el que inocular los fotobiorreactores de ensayo, dependiendo del volumen final de dichos fotobiorreactores de ensayo.

Asimismo, se cuantificó la carga bacteriana que pudiese contener el cultivo a través de la
20 siembra en placas Petri de agar nutritivo comercial para microbiología Panreac 500 g [413792] (ISO 6579, ISO 10273, ISO 19250) con una matriz de agua salada (30 PSU). El conteo se realizó por diluciones seriadas y contaje visual de unidades formadoras de colonias (UFC).

REIVINDICACIONES

1. Método para la conservación de una cepa microalgal, caracterizado por que el método comprende la realización de los siguientes pasos:
 - a) disponer un primer recipiente de cultivo, donde dicho recipiente contiene un medio de cultivo microalgal semisólido que comprende una concentración de agar entre 0,1-1,0% v/v;
 - b) depositar una cepa microalgal sobre el medio de cultivo microalgal semisólido, donde la cepa microalgal es una cepa de microalga flagelada; e
 - c) incubar la cepa microalgal depositada sobre el medio de cultivo microalgal semisólido a una temperatura comprendida entre los 15-30°C y bajo una irradiación incidente de 40-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de entre 16:8 a 8:16 (luz: oscuridad) durante un tiempo entre 7-30 días.
2. Método según la reivindicación 1, donde la microalga flagelada es una microalga haptófito.
3. Método según la reivindicación 2, donde la microalga haptófito es la microalga *Chrysochromulina rotalis*.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la temperatura de incubación en el paso c) es de entre 15-25 °C, preferiblemente de entre 16-22 °C, más preferiblemente de entre 17-19 °C
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el fotoperiodo es de entre 14:10 a 10:14 (luz: oscuridad), preferiblemente de 12:12 (luz: oscuridad).
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde en el paso a) se dispone un primer recipiente de cultivo que contiene un medio de cultivo microalgal semisólido que comprende una concentración de agar de entre 0,15-0,5% v/v, preferiblemente de entre 0,2-0,4% v/v, más preferiblemente de 0,3% v/v.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que, transcurrido el tiempo indicado en la etapa (c), comprende adicionalmente una etapa de aislar y resuspender al menos una colonia microalgal incubada durante la etapa (c) en medio de cultivo microalgal semisólido y repetir la operación descrita en las etapas (a) a (c).

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la cepa microalgal que se deposita sobre el medio de cultivo microalgal semisólido en la etapa (b) procede de un cultivo en suspensión.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde dicho método comprende adicionalmente:
 - i. aislar y resuspender al menos una colonia microalgal amplificada durante la etapa (c) en un segundo recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo de mantenimiento para obtener un cultivo primario de microalgas;
 - ii. preparar al menos un escalado sucesivo mediante la inoculación del cultivo primario en al menos un tercer recipiente de cultivo, para generar inóculo adecuado para el volumen final de al menos un fotobiorreactor;
 - iii. inocular al menos un fotobiorreactor.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dicho método comprende adicionalmente una etapa de verificar la carga bacteriana mediante la siembra de una colonia microalgal amplificada durante la etapa (c), o mediante la siembra del cultivo derivado de la etapa i).

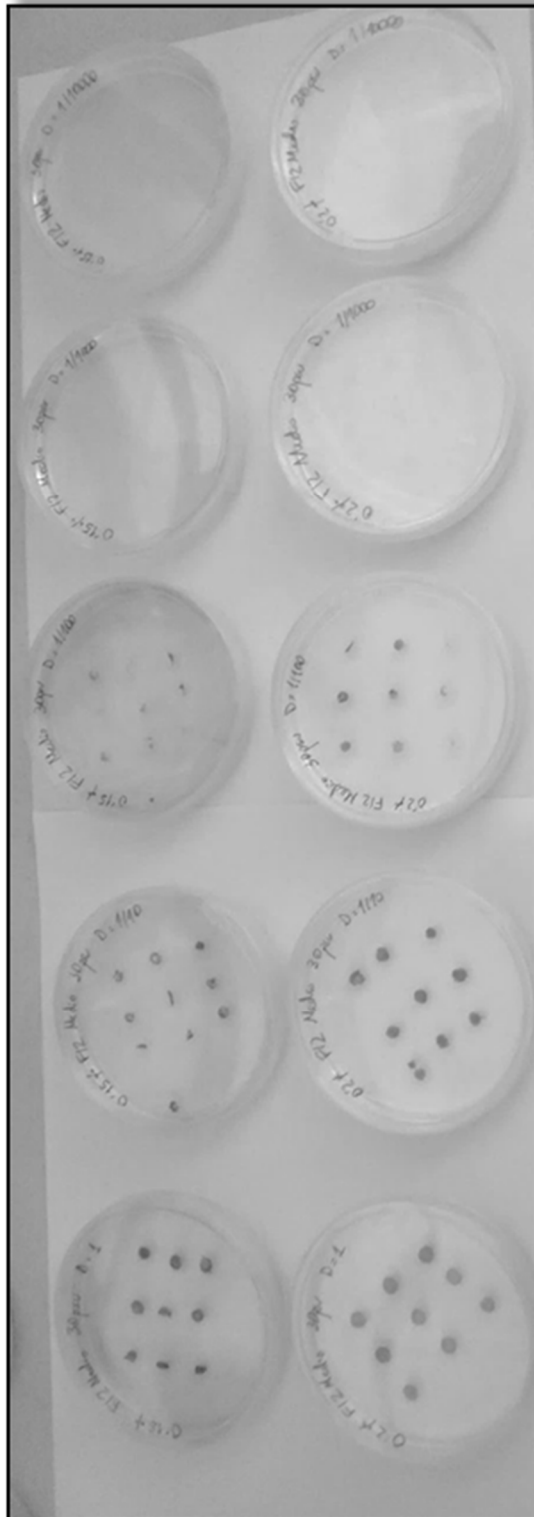


FIG. 1

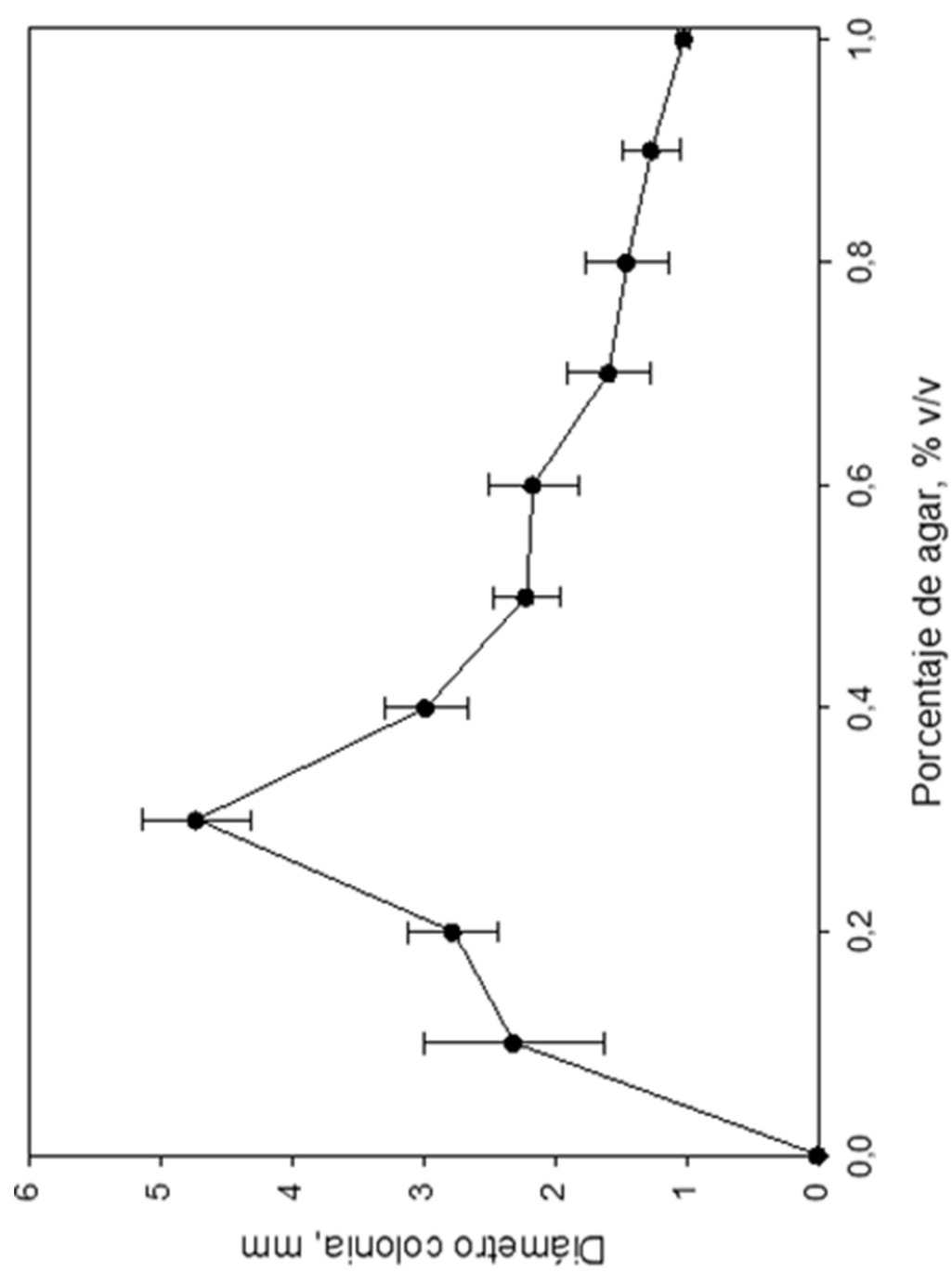


FIG. 2