

DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Chlorococcum sp.*, EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO

Tejas Bravo Gemma Giselle (1), Ayala Islas Alberto (2)

¹ [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [gisellebravo6394@hotmail.com]

² [Ingeniería Bioquímica, Coordinación Bioquímica, Irapuato, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [alayala@itesi.edu.mx]

Resumen

Las microalgas son de los organismos más antiguos del planeta y, hasta el momento se cree que existen más de 100,000 especies; se pueden encontrar en aguas dulces y saladas. Actualmente son consideradas como una fuente natural de gran interés para el desarrollo de una gran diversidad de investigaciones y proyectos biotecnológicos. Para el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo el aislamiento y cultivo de la microalga *Chlorococcum sp.*; las técnicas de dilución seriada y agotamiento en cajas petri permitieron su aislamiento y, una vez aislada, se cultivo en medio Bold basal medium (BBM) el cual es apto para algas de agua dulce; los nutrientes inorgánicos que este medio aporta facilita tener un cultivo axénico. Para el suministro de los nutrientes como el carbono y oxígeno se empleó un fotobiorreactor; durante el crecimiento se mantuvo un pH de 7, una temperatura ambiente (28 °C) y luz blanca. Se realizaron cinéticas de crecimiento mediante conteo celular y densidad óptica (absorbancia), lo que permitió determinar que *Chlorococcum sp.* muestra una fase exponencial después de los 10 días en condiciones normales.

Abstract

Microalgae are the oldest organisms on the planet and, to date it is believed that there are over 100,000 species can be found in fresh and salt water. Today they are considered as a natural source of great interest for the development of a wide variety of research and biotechnology projects. For the development of this work was carried out isolation and cultivation of microalgae *Chlorococcum sp.*. The techniques of serial dilution and depletion petri dish allowed its isolation and once isolated are growing in Bold's basal medium (BBM) the which is suitable for freshwater algae and inorganic nutrients it provides easy to have a axenic culture. A photobioreactor was used, which facilitates the supply of nutrients such as carbon and oxygen; during growth remained a pH of 7, a temperature (28 ° C) and white light. Growth kinetics were performed using cell count and optical density (absorbance), allowing determine *Chlorococcum sp.* it shows an exponential phase after 10 days under normal conditions.

Palabras Clave

Microalga; aislamiento; *Chlorococcum sp.*; fotobiorreactor.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de las microalgas.

Hoy en día no se conoce con exactitud quién fue el ancestro común de las microalgas, por lo que para su definición se toman en cuenta todas aquellas características que estas presentan y comparten, tales como la de ser microorganismos autótrofos, fotosintéticos que contienen distintos tipos de pigmentos como la clorofila lo que les da el color característico [1], dependen de agua o de un medio húmedo por lo que las podemos encontrar en agua salada, agua dulce o en el suelo, la mayoría pertenecen al dominio Eucariota, forman cadenas, colonias o cenobios, son parte del primer eslabón de la cadena trófica y su nutrición es por absorción iónica de compuestos inorgánicos y orgánicos como C, H, O, N, P, S, K, Ca, Fe y Mg y cantidades traza de Mn, B, Co, Cu, Zn y Mo [2].

Clasificación

Parámetros como la pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular son importantes para la clasificación de las microalgas, entre los tipos de microalgas están las algas azul-verdes, las algas verdes, euglenoideas, algas de color verde amarillo, dinoflageladas, cryptomonas, crisofitas, diatomeas, algas rojas y algas pardas, como se puede observar en la tabla 1 todas presentan clorofila a y β carotenos [3].

Aplicaciones

Las microalgas son microorganismos de los cuales el ser humano ha usado desde la antigüedad y que durante los últimos 50 años han sido un objeto de estudio para la investigación debido a su actividad biorremediadora de cuerpos de agua contaminados con metales pesados, también juegan un papel muy importante en la producción de biocombustibles, biofertilizantes, proteínas, toxinas y ácidos grasos [4], [5]. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000 [6]. El interés por este tipo de microorganismos surgió en Alemania en los años

cincuenta y sesenta al ser consideradas como una fuente abundante de proteína de bajo costo para la nutrición humana. En México los primeros estudios sobre este tipo de microorganismos fue a finales de los años setenta en el estado de Yucatán con las microalgas dulceacuícolas [2].

Tabla 1: Clasificación de las algas dulceacuícolas.

Tipos de algas (phylum)	Pigmentación	
	Clorofila	Carotenos
1. Azul-verdes (Cyanophyta)	a	β
2. Verdes (Chlorophyta)	a,b	α , β , γ
3. Euglenoideas (Euglenophyta)	a,b	β , γ
4. Verde amarillo (Xanthophyta)	a,C ₁ ,C ₂	α , β
5. Dinoflageladas (Dinophyta)	a,C ₂	β
6. Cryptomonas (Cryptophyta)	a,C ₂	α , β
7. Crisofitas (Chrysophyta)	a,C ₁ ,C ₂ ,C ₃	α , β , ϵ
8. Diatomeas (Bacillario-phyta)	a,C ₁ ,C ₂ ,C ₃	β , ϵ
9. Algas rojas (Rhodophyta)	a	α , β
10. Algas pardas (Phaeophyta)	a,C ₁ ,C ₂ ,C ₃	β , ϵ

Chlorococcum sp., es una microalga que puede ser ovoide, elipsoidal o esférica, presenta un cloroplasto parietal urceolado y uno o varios pirenoides, su reproducción puede ser asexual por zoósporas y aplanósporas formadas por sucesivas divisiones celulares y en ocasiones de forma sexual por fusión de isogametos de las zoosporas, pertenece a la familia Chlorococcaceae, orden Chlamyomonadales, clase Chlorophyceae, phylum Chlorophyta [7].

Cultivo de microalgas

Para llevar a cabo estudios e investigaciones con cualquier microalga en los campos antes mencionados es de gran importancia estandarizar

los métodos de cultivo que permitan disponer de suficiente biomasa, esto se puede lograr haciendo modificaciones de los factores limitantes que controlan la producción algal y de esta forma proveerle a la microalga las mejores condiciones para su crecimiento; entre los factores principales que actúan sobre la producción de la biomasa algal están: el medio de cultivo, la temperatura y la luz [8]. Comenzando con el medio de cultivo el cual es el que proporciona los nutrientes para el crecimiento; en este trabajo se lleva a cabo la modificación de la concentración de nitrógeno, el cual es uno de los nutrientes necesarios y de gran importancia para el desarrollo de estos microorganismos, se presenta la cinética de crecimiento de *Chlorococcum sp.*, cuando la concentración de nitrógeno aumenta así como también la cinética de crecimiento cuando la microalga se encuentra en condiciones normales.

Los resultados obtenidos permitirán realizar nuevas investigaciones relacionadas con la producción de bioproductos así como también aspectos genéticos de esta especie de microalga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr el aislamiento de la cepa de *Chlorococcum sp.*, se emplearon las técnicas de agotamiento en cajas petri realizando siembra por estría y diluciones 1:10, el medio que se utilizó fue Bold basal médium (BBM) estéril. Se incubó a 28 °C, luminosidad constante y pH de 7. Para la identificación de la microalga se llevó a cabo una identificación morfológica empleando un microscopio óptico y utilizando la guía de identificación "A Key to the More Frequently Occurring Freshwater Alga" de Bellinger y Sigeo [3] así como también artículos referentes a la identificación de microalgas.

Una vez aislada e identificada la cepa de *Chlorococcum sp.*, se procedió a la determinación de su curva de crecimiento; para ello se empleó un fotobioreactor el cual permite una alta eficiencia en el uso de luz y tasas adecuadas de transferencia de O₂ y CO₂, y de esta manera alcanzar una alta productividad de biomasa. Se llevaron a cabo 2 experimentos, el primero consistió en mantener las

concentraciones normales de nutrientes del medio BBM y para el segundo experimento se realizó una modificación suministrando el doble de nitrógeno. Se incubaron a temperatura ambiente (28°C), luminosidad constante y pH de 7. Para ambos experimentos el crecimiento de la microalga se estuvo monitoreando, realizando cinéticas de crecimiento mediante conteo celular haciendo uso de la cámara de Neubauer y por densidad óptica midiendo la absorbancia a 685 nm empleado un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Cary 50.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El medio BBM se puede considerar un medio apropiado para el crecimiento de *Chlorococcum sp.*, tal como reportaron Carvajal, Cadena y Molina (2013), comprobando que los nutrientes como las proporciones empleadas en la preparación del medio satisfacen el crecimiento de esta microalga.

El aislamiento de la cepa de *Chlorococcum sp.*, se logró después de 40 días aproximadamente mediante la técnica de agotamiento, el aislamiento empleando diluciones seriadas no fue posible ya que al observar las colonias presentes en la dilución 10⁻¹⁰ se pudo ver mediante morfología que no se encontraba un solo tipo de microalga por esta razón se optó por usar la microalga aislada en caja petri. La identificación se llevó a cabo gracias a las claves morfológicas de la guía de identificación, de manera macroscópica en las placas de petri se observaron colonias de color verde oliva, lisas y semiesféricas y el crecimiento celular se observó a lo largo del estriado, la Imagen 1 pone en manifiesto el resultado del aislamiento por agotamiento donde al observar al microscopio se pudieron observar células elipsoidales, esféricas, con un cloroplasto parietal y otras células que presentan más de un pirenoide así como también células en reproducción, los resultados obtenidos por Benavides, Silva, Sili y Torzillo (2008) al aislar la microalga *Chlorococcum infusioformis*, se pueden observar en la Imagen 2

donde se pueden ver células de 4.4-17 μm de ancho esféricas, los cloroplastos presentan una esfera cóncava con un poro lateral y el pirenoide se encuentra en una posición excéntrica, haciendo una comparación morfológica se pudo decir que la microalga que se había aislado pertenecía al género *Chlorococcum*, mas no que corresponde a la misma especie ya que para ello necesitaríamos realizar estudios a nivel genético.

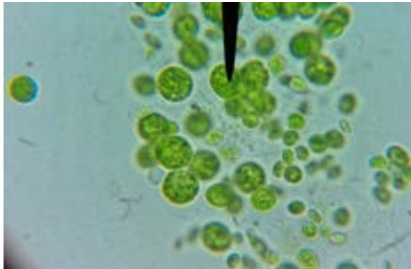


IMAGEN 1: Diferentes estadios de *Chlorococcum sp.*, 40x, células elipsoidales, células esféricas, células con el cloroplasto parietal urceolado, células con más de un pirenoide y células en reproducción.

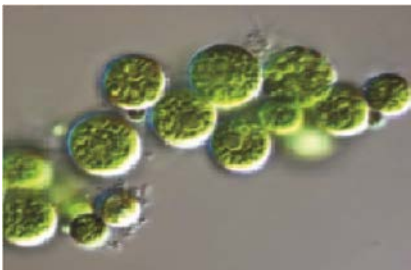


IMAGEN 2: Microalga *Chlorococcum infusionum* 100x.

El realizar cinéticas de crecimiento permitió ver aproximadamente el tiempo de reproducción como el comportamiento de la microalga en dos condiciones diferentes, aplicando dos métodos diferentes (conteo celular y absorbancia).

Para el primer experimento el medio de cultivo mantuvo las concentraciones normales de nutrientes, el monitoreo se llevo a cabo durante 19 días, en la Imagen 3 se puede ver que al realizar el conteo celular el crecimiento de la microalga presentó una fase exponencial después de los 10 días, al llevar a cabo la medición de absorbancia

se pudo ver el mismo comportamiento como se observa en la Imagen 4, se empezó a notar una fase exponencial después de los 10 días; en ambas graficas se observa que se presenta una fase de latencia de 6 días. En el segundo experimento la modificación en el medio de cultivo BBM aumentando el doble de la concentración de nitrógeno se tuvo una fase de latencia de 5 días y empezando a notar una mayor crecimiento a partir de los 9 días tal como se muestra en la imagen 5, cabe mencionar que el decrecimiento pudo ser por el suministro de medio debido a una evaporación de este en el fortobioreactor lo que provocó una dilución, al medir la absorbancia se pudo observar que la cantidad de clorofila, imagen 6, es mayor después de los 9 días, presentando una fase estacionaria después de los 12 días.

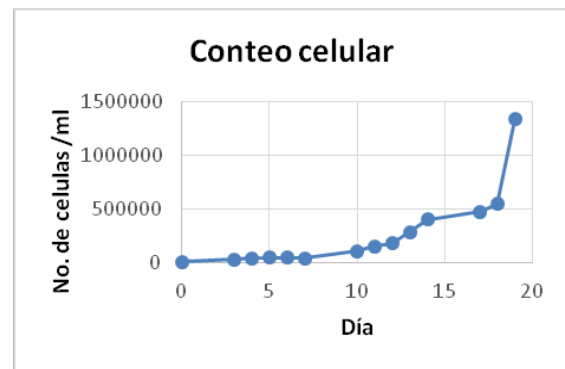


IMAGEN 3: Curva de crecimiento en función del número de células de *Chlorococcum sp.*, en medio BBM con concentraciones normales de nutrientes.

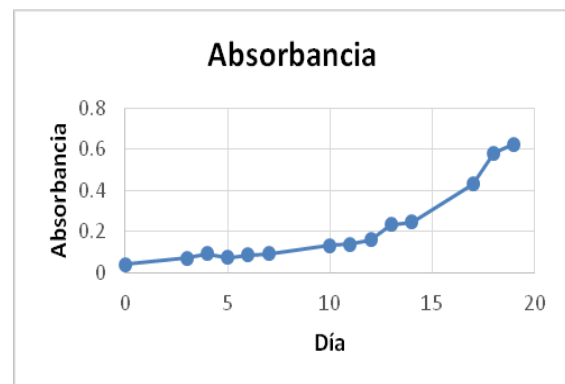


IMAGEN 4: Curva de crecimiento en función a la cantidad de clorofila presente en las células de *Chlorococcum sp.*, en medio BBM concentraciones normales de nutrientes.

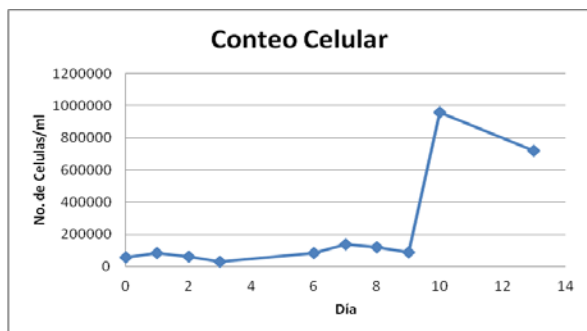


IMAGEN 5: Curva de crecimiento en función del número de células de *Chlorococcum sp.*, en medio BBM con doble de nitrógeno.

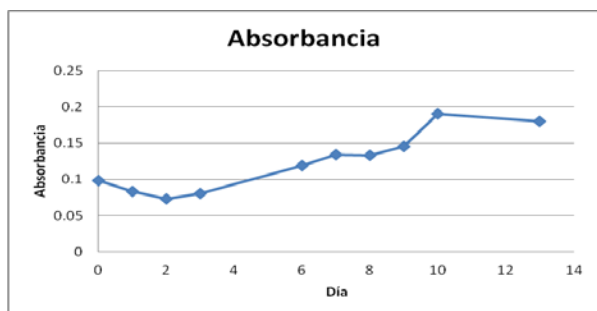


IMAGEN 6: Curva de crecimiento en función de la cantidad de clorofila presente en las células de *Chlorococcum sp.*, en medio BBM con doble de nitrógeno.

CONCLUSIONES

El aislamiento por agotamiento resultó eficaz para el aislamiento de *Chlorococcum sp.*, el uso de un fotobiorreactor permitió una mayor producción de biomasa y el medio de cultivo BBM con la doble concentración de nitrógeno no resultó un problema para el crecimiento de la cepa siendo más rápido su desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a mi asesor Alberto Ayala Islas por su ayuda y dedicación, a mis padres por ser mi fuente de motivación y a mis amigas Cynthia Pérez y Elizabeth Aguilera por su amistad y apoyo incondicional fuera y dentro del laboratorio.

REFERENCIAS

- [1] Ortigón, L., Freile, Y., & Robledo, D. (2011). Diversidad Vegetal Algas . *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán: Especies* , 162-164.
- [2] López, S. J., & Catzim, L. A. (2011). Microalgas dulceacuícolas. *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán* , 165-166.
- [3] Bellinger, E., & Sigee, D. (2015). *Freshwater Algae: Identification, Enumeration and use as bioindicators*. Wiley-Blackwell : University of Manchester, UK.
- [4] Montes, J. P., & Pulido, M. (1890). Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck. *Botanische Zeitung* , 47.
- [5] Arrieta, E. (2008). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, Volumen 14 No. 1* , 8-9.
- [6] Garibay, A., Vazquez, R., Sanchez, M., Serrano, L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de Microalgas. *Biotecnología Vol. 13 No. 3* , 38-41.
- [7] Morales, E., Romero, P., Gavilanez, F., Cadena, M., Molina, D., & Carvajal, A. (2013). Cultivo de una cepa carotenogénica de *Chlorococcum sp.* (Chlorophyta: Chlorococcales) aislada de rizosfera de Vicia faba (haba). *Acta Botanica Venezuelica* , 309-324.
- [8] Lanza, G., & Arredonde, J. L. (1990). *La acuicultura en México: de los conceptos a la producción*. México, D.F.: Instituto de Biología, UNAM .
- [9] Carvajal, A., Cadena, M., & Molina, D. (2013). cultivo de una cepa carotenogénica de *chlorococcum sp.* (chlorophyta: chlorococcales) aislada de rizosfera de vicia faba (haba). *acta bot. venez.* , 36 (2): 309-324.
- [10] Benavides, M., Silva, A., Sili, C., & Torzillo, G. (2008). Cyanoprocarýota y microalgas (Chlorophyceae y Bacillariophyceae) bentónicas dominantes en ríos de Costa Rica. 221-232.