

CULTIVO DISCONTINUO DE *Chlorella* sp. EN MEDIOS ENRIQUECIDOS CON EL EXUDADO GOMOSO DE *Acacia macracantha*

Antonio Vera¹, Maritza Martínez², Kerstin Morillo¹ y Sadieth Montes¹

¹Laboratorio de Microbiología y Ecología, Centro de Investigaciones Biológicas.

TeleFax: (58-261) 7597422, E-mail: ajvera68@latinmail.com,

ajvera68@intercable.net.ve

²Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales.

TeleFax: (58-261)7596269 Facultad de Humanidades y Educación,

Universidad del Zulia, Apartado 526, 4001 -A. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

Resumen

Se evaluó el cultivo discontinuo de *Chlorella* sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*. Se emplearon cuatro medios de cultivo, por cuádruplicado (I = ALGAL, II = exudado gomoso, III = ALGAL + exudado gomoso + fosfato y IV = exudado gomoso + fosfato), a una concentración de 4 mM de Nitrógeno: 0,2 mM de fosfato. Los bioensayos se mantuvieron con aireación constante y pH entre 7-7,5. Las curvas de densidad celular indican que la cinética de crecimiento depende de la composición de los medios de cultivo. El crecimiento, en los sustratos I, III y IV, no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$). La microalga desarrolló una velocidad de crecimiento menor y una fase exponencial más larga en los medios III y IV, en contraste con lo observado en el sustrato I. La relativa alta densidad celular de *Chlorella* sp. en los medios III y IV, en comparación con el medio I, se podría vincular con el aporte de carbohidratos (galactosa, arabinosa y ramnosa), de nitrógeno del exudado gomoso de *A. macracantha* y con la capacidad enzimática de la microalga. El crecimiento en el tratamiento II se mantuvo constante durante el ensayo, sin presentar fase exponencial, y exhibió una marcada clorosis. La incorporación de fosfato inorgánico a la goma favoreció el crecimiento en el tratamiento IV, indicando que este macronutriente es un factor limitante del mismo, el cual podría originar una disminución en la síntesis de clorofila. Los resultados obtenidos podrían tener aplicación en la acuicultura comercial. Se concluye que los nutrientes de los medios III y IV son asimilados por *Chlorella* sp., lo cual sugiere el uso de estos sustratos alternativos, enriquecidos, de fácil obtención y relativamente económicos.

Palabras clave: *Acacia macracantha*, *Chlorella* sp., cultivo discontinuo, exudado gomoso, medios.

BATCH CULTURE OF *Chlorella* sp. IN MEDIA ENRICHED WITH *Acacia macracantha* GUM EXUDATE

Abstract

Batch culture of *Chlorella* sp. was evaluated in media enriched with *Acacia macracantha* gum exudate, using four culture media with 4 replicas each (I = algae, II = gum exudate, III = algae + gum exudate + phosphate, and IV = gum exudate + phosphate), and a concentration of 4 mM of Nitrogen:0.2 mM of phosphate. Experimental materials were maintained with constant aeration and a pH between 7-7.5. Cellular density curves indicate that growth dynamics depend on the culture media composition. In substrates I, III and IV, no significant differences ($p < 0.05$) in growth were found. In media III and IV, the microalgae exhibited a slower growth rate and a longer exponential phase, whereas opposite results were obtained in medium I. The relatively high cellular density in media III and IV when compared to medium I, could be linked to the carbohydrates (galactose, arabinose and ramnose) and the nitrogen content supplied by *A. macracantha* gum exudate, as well as the enzymatic capacity of this microalgae. Growth of *Chlorella* sp. in medium II remained constant during the experiment, lacked an exponential phase, and exhibited marked chlorosis. Incorporation of inorganic phosphate in the gum exudate favored growth (medium IV), suggesting that this macronutrient is a limiting growth factor and may cause a decrease in chlorophyll synthesis. Results obtained with these media could be applied in commercial aquaculture. Conclusions are that nutrients in media III and IV are assimilated by *Chlorella* sp., recommending use of these enriched, easily obtained and relatively economical alternative substrates.

Key words: *Acacia macracantha*, batch culture, *Chlorella* sp., gum exudate, media.

Recibido: 29 Abril 2004 . Aceptado: 19 Julio 2004

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas revisten gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial. En tal sentido, se han utilizado los cultivos discontinuos por su relativo fácil manejo para determinar la cinética de crecimiento y los parámetros que influyen en el desarrollo poblacional de las microalgas (Abalde *et al.* 1995). Sin embargo, el uso de los medios de cultivo sintéticos ha incrementado sustancialmente el valor económico para la producción de la biomasa de estos microorganismos (González *et al.* 1999).

Recientemente se ha ensayado el uso de sustratos alternativos y no convencionales como medios de cultivo, destacando: fertilizantes agrícolas, residuales pesqueros, gas oil y exudados gomosos para el crecimiento y desarrollo de *Isochrysis aff. galbana* var. *tahitiana*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp. *Prototheca zopfii* y *Chlorella* sp. (González et al. 1999, Romero et al. 2001, Vigna et al. 2002 y Vera et al. 2002). Se destaca que a partir de estos medios innovadores se han obtenido resultados comparables y superiores a los correspondientes a los medios sintéticos.

Los exudados gomosos se definen como productos complejos, muy solubles en agua, excretados por algunas plantas como respuesta a estímulos externos estresantes tales como: heridas mecánicas o invasión por insectos u hongos (Babu y Shah 1987). Químicamente se consideran sistemas heterogéneos constituidos por una fracción glucídica mayoritaria (AG), y otro componente minoritario, en el cual se encuentra involucrada una fracción proteica (AGP) (Randall et al. 1989).

Acacia macracantha (Mimosaceae), especie ampliamente distribuida en los bosques secos tropicales, produce un exudado gomoso claro y muy soluble en agua, constituido por galactosa, arabinosa y ramnosa, y con un contenido proteico de 31,12 % (Martínez et al. 1992, Martínez et al. 1996).

Se ha ensayado con éxito el uso de los exudados gomosos de yabo (*Cercidiun praecox*), cedro (*Cedrela odorata*) y mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) como medios de cultivo para hongos patógenos; y del exudado gomoso de úveda (*Acacia tortuosa*) para determinar el crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. (Mesa et al. 1997, Rodríguez et al. 1997, Vera et al. 2002).

El objetivo de este trabajo es evaluar el cultivo discontinuo de *Chlorella* sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*.

MATERIALES Y MÉTODOS

ORIGEN DE LAS MUESTRAS

La cepa de *Chlorella* sp. se recolectó en la Represa de Tulé, estado Zulia, Venezuela. El exudado gomoso de *A. macracantha* se obtuvo a partir de las heridas mecánicas (cortes), practicados a nivel del tronco, de individuos localizados en el Municipio Jesús Enrique Losada, estado Zulia, Venezuela, durante la época de sequía (diciembre-marzo) y bajo las condiciones de un bosque seco tropical. El material se colectó 15 días después de realizados los cortes; se secó en una estufa ventilada a 40 °C, y se almacenó, en

recipientes de vidrio cerrados herméticamente, bajo condiciones de laboratorio hasta su uso en el ensayo.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio I (ALGAL). La composición del medio algal (Fábregas *et al.* 1985), se muestra en la Tabla I. Los componentes del medio ALGAL, macronutrientes y micronutrientes, se disolvieron por separado, en agua destilada. Se mezclaron ambas fracciones, para preparar una solución madre equivalente a 200 mM NO₃⁻; 10 mM PO₄⁻³; a partir de la cual se obtuvo una disolución de nutrientes correspondiente a 4 mM NO₃⁻ : 0,2 mM PO₄⁻³.

TABLA 1. Composición del medio ALGAL^a.

Iones ^b	Oligoelementos	
	Sales	mg/L
Zn ⁺²	ZnCl ₂	13,6
	ZnSO ₄	28,7
Mn ⁺²	MnCl ₂ -4H ₂ O	19,79
	Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	24,2
Co ⁺²	CoCl ₂ ^c	1,65
	CoCl ₂ -6H ₂ O ^c	2,31
Cu ⁺²	CuSO ₄ -5H ₂ O	2,49
Fe ⁺³	Citrato férrico	670
Vitaminas		
Tiamina		350
Biotina		50
B ₁₂		30
Macronutrientes		
Elementos	Sales	mg/L ^d
Nitrógeno	NaNO ₃	1700
Fósforo	NaH ₂ PO ₄	156

^a Fábregas *et al.* (1985) ^b Acomplejados con EDTA ^c cualquiera de las dos sales ^dequivalente a 200:10 mM de N:P.

Medio II (Exudado gomoso de *A. macracantha*). Los parámetros analíticos del exudado gomoso de *A. macracantha* se presentan en la Tabla II (Martínez *et al.* 1992, Martínez *et al.* 1996). La preparación del medio II se basó en el contenido de nitrógeno del exudado de *A. macracantha*, equivalente a 4,98 % (Martínez *et al.* 1996).

TABLA 2. Parámetros analíticos de la goma de *Acacia macracantha*^a

Parámetros	
Rendimiento, %	66
Humedad, %	14,24
Ceniza, % ^b	3,70
Rotación específica, grados ^b	-11,7
Nitrógeno, % ^b	4,98
Proteína, % (N x 6.25) ^b	31,12
Peso equivalente, g ^b	790
Acidez, % ^{b,c}	22
Composición de azúcares neutros, % ^{b,c}	
Galactosa	43
Arabinosa	30
Ramnosa	5

^a Martínez *et al.* (1992, 1996). ^b Corregidos para peso seco.

^c Considerando que toda la acidez proviene de los ácidos urónicos.

El exudado gomoso (1,3494 g) se disolvió completamente en agua destilada (1200 mL) a temperatura ambiente. Se filtró a través de un tamiz de gasa y papel Whatman N° 1, y se obtuvo una solución 4 mM de Nitrógeno.

Medio III: (ALGAL + Goma + Fosfato). El medio III se preparó con el aporte de 2 milimoles de NO_3^- : 0,1 milimoles PO_4^{-3} del medio ALGAL, una fracción del exudado de *A. macracantha* (0,6747 g), equivalente a 2 milimoles de Nitrógeno, y la adición de fosfato diácido de sodio (0,012 g), correspondiente a 0,1 milimoles PO_4^{-3} . La solución resultante se aforó a 1200 mL, con una relación 4:0,2 mM de Nitrógeno: Fosfato.

Medio IV: (Goma + Fosfato). El exudado gomoso de *A. macracantha* (1,3494 g $\circ$ 4 mM de nitrógeno) y el fosfato diácido de sodio (0,024 g $\circ$ 2 mM PO_4^{-3}) se disolvieron, por separado, en agua destilada. Las soluciones se mezclaron y se enrasó a 1200 mL, resultando la relación nitrógeno: fosfato requerida.

Las fracciones de los medios de cultivo se esterilizaron, separadamente, a 15 Pa (libra por pulgada cuadrada) de presión y a 121°C durante 15 minutos.

BIOENSAYOS

Se llevó a cabo un bioensayo de acondicionamiento que permitió aclimatar la cepa a las

condiciones de cada uno de los medios de cultivo utilizados; a partir de estos sustratos se tomaron los inóculos iniciales de 1×10^6 cel/mL.

El bioensayo definitivo se desarrolló en cultivos discontinuos, a un volumen de 300 mL, por cuadruplicado y a una relación 4: 0,2 mM de Nitrógeno: Fosfato. El crecimiento de *Chlorella* sp., se determinó a través de recuentos celulares interdiarios durante 24 días, y los bioensayos se repitieron una vez.

Los cultivos se mantuvieron a $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, iluminación lateral $49 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}$, suministrada por lámparas fluorescentes de 40 w, con fotoperíodo de 12:12 h luz/oscuridad., pH 7-7,5 y aireación constante.

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

La densidad celular se estimó mediante recuento celular en las dos cámaras de un hematocitómetro con rayado de Neubauer BAECO, a través de un microscopio óptico Olympus, un contador manual, y la aplicación de la fórmula: $\text{N}^{\circ} \text{ cel/mL} = (\text{N}^{\circ} \text{ células contadas} / \text{N}^{\circ} \text{ de cuadros contados}) \times 10^4$.

La velocidad de crecimiento se calculó, en fase logarítmica, mediante la ecuación: $\mu = (\ln X_1 - \ln X_0) / (t_1 - t_0)$, y el tiempo de duplicación se determinó según la fórmula: $t_d = \ln 2 / \mu$. Se aplicó una análisis de varianza a través del programa STATGRAPHICS versión 7,0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de la densidad celular de *Chlorella* sp. indican que la cinética de crecimiento depende de la composición de los medios de cultivo (Fig. 1). El crecimiento en los sustratos I, III y IV no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los cultivos de los medios III y IV desarrollaron una velocidad de crecimiento menor y una fase exponencial más larga, en contraste con lo observado en el medio I (Fig. 1, Tabla 3). Se ha reportado la relación entre estas variables, su importancia para la selección de un cultivo de laboratorio y su aplicación como inóculo en cultivos masivos (González *et al.* 1999).

La relativa alta densidad celular de *Chlorella* sp. en los medios III y IV, en comparación con el medio I, se podría vincular con el aporte de carbohidratos (galactosa, arabinosa y ramnosa) y de nitrógeno del exudado gomoso de *A. macracantha*, y con la capacidad mixotrófica de la microalga (Fig. 1, Tabla 3). Lewin (1962) ha descrito la presencia de

hexoquinasa en *Chlorella* sp., como también de fosfohexoquinasa, fructosa-difosfato aldolasa y gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa en *Chlorella pyrenoidosa*. Por otra parte, se ha reportado que *Chlorella* sp. utiliza compuestos orgánicos (fuente de carbono), destacando: glucosa, galactosa y fructosa, del medio de cultivo, para crecer heterotróficamente (Kapland *et al.* 1986, Abalde *et al.* 1995, Lee *et al.* 1996), así como también que esta microalga es capaz de crecer mixotróficamente al usar energía luminosa y azúcares en forma coordinada (Martínez y Orus 1991).

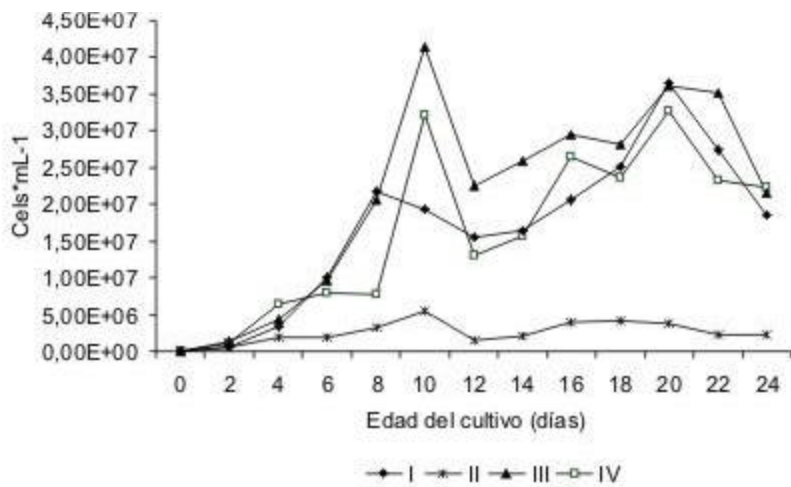


FIGURA 1. Crecimiento de *Chlorella* sp. en cultivos enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*

TABLA 3. Parámetros de crecimiento de *Chlorella* sp. en cultivos enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*.

Tratamiento	μ (div. día ⁻¹)	td (día)	td (horas)	Máxima densidad celular (×10 ⁶ cel. mL ⁻¹)
I	0,66	1,04	24,9	32,73 ± 1,09
III	0,31	2,23	53,5	41,50 ± 6,92
IV	0,39	1,77	42,4	36,45 ± 1,35

El crecimiento de *Chlorella* sp. en el medio II no describió fase exponencial, y se caracterizó por presentar una coloración verde-amarilla (clorosis) a partir del cuarto día de iniciado el ensayo. Estos resultados coinciden con los reportados por Iriarte y Buitrago (1991), los cuales revelaron este hecho al emplear úrea como fuente de nitrógeno en *Chlorella* sp.; y Vera *et al.* (2002) quienes ensayaron un medio con base únicamente en el exudado gomoso de *Acacia tortuosa* (Mimosaceae) para el crecimiento de esta especie.

La incorporación de fosfato inorgánico al medio IV, a diferencia del sustrato II, sugiere

que este nutriente actúa como limitante para el crecimiento de la microalga; resultados similares se encontraron en las investigaciones de Vera *et al.* (2002). Se ha descrito que la deficiencia de fósforo, a nivel celular, origina un descenso en la síntesis de ATP y clorofila; y como consecuencia de ello aparece una marcada clorosis (Abalde *et al.* 1995).

El crecimiento de *Chlorella* sp. se mantuvo estable en el medio II durante todo el desarrollo del cultivo; esto podría tener aplicación en acuicultura. González *et al.* (1999) han demostrado el amplio uso que tienen los cultivos de mantenimiento, caracterizados por presentar una fase estacionaria durante un período de tiempo relativamente largo, como inóculos o en la alimentación de organismos intermediarios para el levantamiento de larvas de peces y crustáceos de importancia comercial.

CONCLUSIONES

La cinética de crecimiento de *Chlorella* sp. depende de la composición del sustrato empleado. Las densidades celulares de los medios de cultivo III y IV sugieren que los componentes del exudado gomoso de *Acacia macracantha* están disponibles como nutrientes para la microalga; el cual se podría utilizar como sustrato alternativo y enriquecido, ya que es de fácil obtención y relativamente económico.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia por otorgar el financiamiento para la realización esta investigación.

LITERATURA CITADA

1. ABALDE J., A. CID, J. P. FIDALGO, E. TORRES y C. HERRERO. 1995. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Universidad Da Coruña, 210 pp.
2. BABU A. M. y J. J. SHAH. 1987. Unusual tissue complexes formed in association with traumatic gum cavities in the stem of *Bombax ceiba* L. *Annals of Botany* 59: 293-299.
3. FÁBREGAS J., C. HERRERO, B. CABEZAS y J. ABALDE. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Acuaculture* 49: 231-244.
4. GONZÁLEZ B., E. BUITRAGO y K. FRONTADO. 1999. Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. *Memoria Tomo LIX, número 151*, 75-84.

5. IRIARTE F. y E. BUITRAGO. 1991. Determinación de la concentración y fuente óptima de nitrógeno en cultivos de *Chlorella* sp. usados como inóculo de cultivos masivos. Memoria 51: 181-193.
6. KAPLAND D., A. E. RICHMOND, S. DUBINSKY y J. ARONSON. 1986. Algal nutrition. En: Handbook of microalgal mass culture. A. E. Richmond (Ed). CRC Press. Florida 147-198.
7. LEE Y. K., S. Y. DING, C. H. HOE y C. S. LOW. 1996. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. Journal of Applied Phycology 8: 163-169.
8. LEWIN R. A. 1962. Physiology and biochemistry of algae. University of California. Academic Press. New York and London. 929 pp.
9. MARTÍNEZ M., G. LEÓN DE PINTO y C. RIVAS. 1992. Composition of *Acacia macracantha* gum exudates. Phytochemistry 31: 535-536.
10. MARTÍNEZ M., G. LEÓN DE PINTO, C. RIVAS y E. OCANDO. 1996. Chemical and spectroscopic studies of the gum polysaccharide from *Acacia macracantha*. Carbohydrate Polymers 29: 247-252.
11. MARTÍNEZ F. y M. I. ORUS. 1991. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101. Plant. Physiol. 95: 1150-1155.
12. MESA L. M., S. RODRÍGUEZ, O. BELTRÁN, J. QUINTERO, E. SÁNCHEZ, G. PÁEZ y G. LEÓN. 1997. Comportamiento de *Aspergillus niger* en los exudados gomosos de *Cercidium praecox* y *Cedrela odorata*. Boletín Micológico 12: 35-39.
13. RANDALL R. C., G. O. PHILLIPS y P. A. WILLIAMS. 1989. Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. Food Hydrocolloids 3: 65-75.
14. RODRÍGUEZ S., L. M. MESA, G. PÁEZ y G. LEÓN. 1997. Comportamiento de *Sporothrix schenckii* y *Cladosporium carrionii* en medios a base de exudados gomosos. Kasmera 25: 7-24.
15. ROMERO T., I. RODRÍGUEZ y D. HERNÁNDEZ. 2001. Cultivo semicontinuo de la microalga *Chlorella* sp. para el tratamiento de residuales pesqueros. Bol. Centro Invest. Biol. 35: 42-51.

16. VERA A., M. YÉPEZ, M. MARTÍNEZ y G. LEÓN DE PINTO. 2002. Crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 33: 19-22.
17. VIGNA M. S., J. ALBERGHINA, S. M. DEL MÓNACO y M. A. GALVAGNO. 2002. *Prototheca zopfii* (Chlorophyta) capaz de utilizar "gas oil", registrada por primera vez en aguas contaminadas de Argentina. Darwiniana 40 (1-4): 45-50.