

Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chroomonas* sp.

José Luis Bermúdez, Gloria Sánchez, Gisela Fuenmayor y Ever Morales*

Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos, Dpto. de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias. La Universidad del Zulia. Apartado 526.
Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 11-09-02. Aceptado: 25-11-03

Resumen

El carbono constituye el principal macronutriente para el crecimiento y productividad de las microalgas. Por tal motivo es necesario evaluar las diferentes fuentes de carbono orgánico e inorgánico en cultivos de microalgas. En este sentido se estudió el efecto del bicarbonato a 5 mM y del acetato a 1, 5 y 10 mM sobre el crecimiento y contenido de clorofila y carotenoides de la microalga *Chroomonas* sp. utilizando cultivos discontinuos con medio Algal a 4,0 mM NaNO₃. Los cultivos para cada tratamiento se realizaron por triplicado y mantenidos con aireación constante, ciclo de luz:oscuridad 12:12h y 28±2°C. La mejor fuente de carbono para la producción de biomasa fue el acetato, con densidades celulares de 73,56; 78,55 y 74,82 x 10⁶ cel.mL⁻¹ para 1, 5 y 10 mM respectivamente, siendo estas densidades significativamente superiores ($P < 0,05$) a la obtenida con bicarbonato y en el control. Sin embargo, en los cultivos con bicarbonato se produjeron las concentraciones mas elevadas de clorofila y carotenoides con 254,77 y 106,22 fg.cel⁻¹ respectivamente y con diferencia significativa ($P < 0,05$), respecto a los cultivos con acetato y en el control. Además, el contenido de ambos pigmentos disminuyó con la concentración de acetato. Los resultados indican que el acetato estimula la producción de biomasa en condiciones mixotróficas; mientras que el bicarbonato estimula la de clorofila y carotenoides en condiciones autotróficas.

Palabras clave: *Chroomonas*; fuente de carbono; microalga.

Effect of the carbono Source on growth and pigments production of marine microalga *Chroomonas* sp.

Abstract

Carbon constitutes the major macronutrient for the growth and productivity of the microalgae. For this reason It's necessary to evaluate the different sources of inorganic and organic carbon in microalgal cultures. For this purpose, the effect of 5 mM bicarbonate and 1. 5, and 10 mM acetate on growth and chlorophyll and carotenoids content of the microalga *Chroomonas* sp was studied, by using discontinuous cultures with Algal medium 4 mM NaNO₃. Cultures for each treatment were carried out by triplicate and maintained with constant aeration, light:dark cycle 12:12 h and 28±2°C. The best carbon source for biomass production was acetate with cell densities of 73.56, 78.55 y 74.82 x 10⁶ cel.mL⁻¹ for 1. 5 and 10 mM respectively, being

* Autor para la correspondencia. E-mail: everm@iamnet.com

this densities significantly higher than obtained in cultures with bicarbonate and control. However, with bicarbonate the concentration of total chlorophyll and carotenoids of 254.77 y 106.22 fg.cel⁻¹ respectively were significantly higher (P<0.05) to acetate and control. Moreover, the content of chlorophyll and carotenoids decreased with acetate concentration. These results suggest that acetate stimulates biomass production in mixotrophic conditions. While bicarbonate increased the chlorophyll and carotenoids production in autotrophic conditions.

Key words: Carbon source; *Chroomonas*; microalga.

Introducción

Algunas microalgas son capaces de reemplazar las fuentes de carbono y energía, utilizadas en sistemas autotróficos, por compuestos orgánicos como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos, extracto de levadura y peptonas (1, 2) tal como ocurre en bacterias y hongos (3, 4). Por ejemplo, en ambientes acuáticos los compuestos orgánicos podrían estimular una prolongada supervivencia de ciertas microalgas bajo una ausencia o deficiencia de iluminación (3).

Los diversos tipos de nutrición organotrófica en microorganismos fotosintéticos están relacionados con la utilización de energía luminosa y CO₂, además de los compuestos orgánicos asimilados. Tal es el caso, de la condición heterotrófica en microalgas capaces de mantener un crecimiento estable y sostenido en presencia de algún sustrato orgánico en ausencia de iluminación. En cambio, cuando utiliza simultáneamente para su crecimiento luz y sustratos orgánicos como fuente de energía, y como fuente de carbono CO₂ y sustratos orgánicos, la microalga manifiesta una capacidad mixotrófica (5).

En los cultivos mixotróficos la asimilación oxidativa de los compuestos orgánicos y de CO₂ a través de las reacciones fotosintéticas ocurre simultáneamente, resultando una estimulación del crecimiento comparada con otras condiciones de cultivos (7). Es decir, la microalga es capaz de mantener su crecimiento utilizando un componente autotrófico, a partir de dióxido de carbono y luz, y un componente heterotrófico a partir de un compuesto orgánico. Los estudios ba-

sados en bioenergética del crecimiento microalgal tanto experimentales como teóricos, en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas sugieren que la mayor productividad se obtiene bajo condiciones mixotróficas (7).

En cultivos mixotróficos de la microalga *Chlamydomonas humicola* se ha descrito que el acetato induce un crecimiento de 20 veces respecto a un control sin acetato. Mientras que, en *Scenedesmus obliquus* es capaz de mejorar su crecimiento y asimilación de amonio (8, 9). Así mismo, en *Ankistrodesmus convolutus* se encontró que la glucosa logra aumentar la velocidad de crecimiento y producción de biomasa en comparación a la adición de otras fuentes carbonadas, como acetato, citrato y bicarbonato (10).

Es de suma importancia evaluar el efecto de compuestos carbonados sobre microalgas de interés económico con la finalidad de comparar la producción de biomasa en condiciones autotróficas y mixotróficas. En este sentido, hemos seleccionado a la microalga marina *Chroomonas* sp., la cual presenta potencial por su excelente crecimiento en condiciones de laboratorio (11). Por tal motivo, en el presente trabajo se evaluó la influencia del acetato y del bicarbonato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga autóctona *Chroomonas* de importancia en acuicultura.

Materiales y Métodos

Microorganismo

Se utilizaron cultivos unialgales de la microalga marina *Chroomonas* sp., aislada

al Norte de Maracaibo, Venezuela. Esta microalga se caracteriza por no presentar pared celular, ser planctónica, biflagelada y de un tamaño hasta de 5 micras (11).

Sistema de Cultivo

Todos los cultivos discontinuos se realizaron con agua de mar enriquecida con medio de cultivo comercial ALGAL a una concentración equivalente de 4,0 mM NaNO₃, (12). Se utilizó como fuente de carbono inorgánico, el bicarbonato de sodio a una concentración de 5 mM y el acetato de sodio como fuente de carbono orgánico a 1, 5 y 10 mM; con respecto a cultivos controles con sólo el medio de cultivo comercial.

Los cultivos por tres réplicas se iniciaron con una densidad celular de 2x10⁶ cel·mL⁻¹ en frascos de 350 mL de capacidad a un volumen de cultivo de 150 mL. Estos experimentos se mantuvieron con iluminación lateral a una intensidad luminosa de 156 μmol quanta·m⁻²·s⁻¹, fotoperíodo de 12:12 horas, aireación constante, salinidad de 35‰ y a una temperatura de 28,5 ± 1°C durante 18 días.

Densidad celular y parámetros de crecimiento

El crecimiento de la microalga se siguió mediante recuento celular cada dos días, hasta alcanzar la fase estacionaria utilizando cámara de Neubauer. Los valores de densidad celular fueron expresados en cel·mL⁻¹ y corresponden al promedio de las producidas en fase estacionaria para cada tratamiento. En la fase exponencial se calculó la velocidad de crecimiento (μ), expresada en div·día⁻¹ y el tiempo de duplicación (td).

Pigmentos

La determinación del contenido de clorofila y carotenoides se realizó directamente sobre cultivos frescos y por duplicado. Se tomó un 1 mL de cultivo en un tubo de reacción. Luego de centrifugado a 5500 r.p.m. durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante. Los pigmentos se extrajeron del pellet mediante la adición de 1 mL de acetona: me-

tanol 2:1 (v/v). Los extractos se clarificaron mediante centrifugación y el sobrenadante medido a: 480, 630 y 663 nm en un espectrofotómetro contra un blanco de acetona: metanol 2:1 (v/v).

La concentración de Clorofila a y c y la de carotenoides obtenidas (13) y (14) fueron expresadas en fg cel⁻¹.

Análisis estadísticos

Los valores de densidad celular y de los pigmentos se compararon mediante un análisis de varianza de una vía para la determinación de grupos significativamente diferentes. En todos los casos donde la prueba F resultó significativa, se empleó la prueba de rangos múltiples de Scheffé's a un nivel de significancia del 95%, mediante el programa StatMost for Windows versión 3,0.

Resultados y Discusión

La microalga creció en todas las concentraciones de acetato, con densidades celulares superiores significativamente (P < 0,05), a la del control y bicarbonato (Figura 1). El acetato a 5 mM produjo el mayor crecimiento con 78,55 x10⁶ cel·mL⁻¹. Aunque, el test de rangos múltiples Tukey (P < 0,05), indicó que los tratamiento con acetato son homogéneos. Los cultivos con

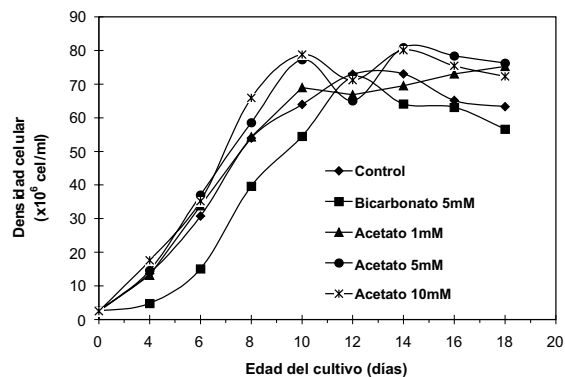


Figura 1. Influencia de la fuente carbonada (acetato de sodio y bicarbonato de sodio) sobre el crecimiento de la microalga *Chroomonas* sp.

acetato también exhibieron una fase exponencial de inmediato sin ninguna fase de adaptación; con lo cual produjeron una mayor velocidad de crecimiento respecto al bicarbonato. Es decir, a 1, 5 y 10 mM de acetato se alcanzaron valores de μ de 0,36; 0,35 y 0,33, respectivamente en relación a la obtenida con bicarbonato, de 0,23 (Tabla 1). En la microalga marina *Isochrysis* sp. también se ha descrito un incremento del crecimiento y del peso seco hasta una concentración de 10 mM de acetato de sodio, en cultivos mixotróficos crecidos entre 0 y 50 mM (15).

La baja densidad celular registrada en los cultivos con bicarbonato en relación al control (Tabla 1), posiblemente sea debido a la poca eficiencia de la microalga en utilizar el HCO_3^- a través del mecanismo de concentración del CO_2 para el crecimiento (16). A pesar de que esta microalga es marina y presenta un excelente crecimiento a pH entre 7 y 9 (11). Es posible que, *Chroomonas* utilice el bicarbonato al rango de concentración encontrado en el agua de mar. El hecho de que esta microalga mantiene un crecimiento sostenido con tan solo el CO_2 (0.03%) presente en el aire del sistema de agitación, sugiere que esta fuente de carbono es la utilizada con mayor eficiencia con respecto a otras fuentes de carbono inorgánicas.

Aun cuando el bicarbonato no favoreció el crecimiento de la microalga *Chroomonas*, en cambio si estimuló la producción celular de clorofila y de carotenoides con 254,77 y 106,22 $\text{fg}\cdot\text{cel}^{-1}$ respectivamente, cuyos valores fueron significativamente superiores ($P > 0,05$) al resto de los tratamientos (Tabla 1).

La disminución del contenido celular de clorofila y de carotenoides por efecto del acetato ha sido reportada para otros compuestos orgánicos. En *Poteroiochromonas malhamensis*, la adición de glucosa, glicerol o etanol a los cultivos induce un aumento de su crecimiento, pero decrece la concentración celular de la clorofila. Lewitus y Caron (17) propusieron un efecto inhibitorio de la síntesis de clorofila debido a la presencia de estos sustratos orgánicos en el medio de cultivo.

En la microalga *Chlamydomonas humicola*, en cambio, el acetato logra mejorar la producción de clorofila en relación a las células autotróficas (8), situación descrita de igual manera para *Golenkinia* sp. (18) y *Chlamybotrys stellata* (19). Esto significa que el efecto de compuestos orgánicos puede variar dependiendo de la microalga y condiciones de cultivo. Es decir, la abundancia de carbono orgánico en el medio puede inhi-

Tabla 1

Densidad celular ($10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}\pm\text{std}$), velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y contenido de clorofila y de carotenoides ($\text{fg}\cdot\text{cel}^{-1}$) de la microalga *Chroomonas* sp. cultivada con acetato y bicarbonato

	Control	Bicarbonato 5 mM	Acetato 1 mM	Acetato 5 mM	Acetato 10 mM
Densidad Celular	67,19±7,6	61,29±10,34	72,56±9,3	78,55±8,9	74,82±15,5
μ	0,34	0,23	0,36	0,35	0,33
Td	2,02	3,01	1,95	2,00	2,10
Clorofila ($\text{fg}\cdot\text{cel}^{-1}\pm\text{std}$)	197,92±33,6	254,77±29,0	200,07±21,2	184,73±42,3	168,90±18,0
Carotenoides ($\text{fg}\cdot\text{cel}^{-1}\pm\text{std}$)	88,49±13,7	106,22±14,0	94,13±6,2	89,45±17,9	84,27±8,9

μ = Velocidad de crecimiento (divisiones por día). td= Tiempo de duplicación (días⁻¹). Control sin bicarbonato y sin acetato.

bir o estimular la formación de clorofilas en algunas microalgas (20).

Conclusiones

Los resultados indican que el acetato puede ser utilizado para estimular el crecimiento de la microalga *Chroomonas* en condiciones mixotróficas. Mientras que, el bicarbonato parece canalizar la producción de clorofila y la de carotenoides con una mayor eficacia que el acetato en cultivos autotróficos.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) y a La Universidad del Zulia por los aportes al desarrollo de este trabajo. Trabajo cofinanciado por CONDES-LUZ 01902-99.

Referencias Bibliográficas

1. NIELSON A.H., BLANKLEY F., LEWIN R.A. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements.** J.R. Stein (Ed.) Cambridge University Press. pp. 275-285, 1973.
2. UKELES R., ROSE W.E. **Mar Biol** 37: 11-28, 1976.
3. LEWIN J., HELLEBUST J.A. **Mar Biol** 36: 313-320, 1970.
4. FLYNN K.J.; SYRETT P.J. **Mar Biol** 90: 159-163, 1986.
5. VAN BAALEN C., PULICH W. **Critical Reviews in Microbiology** 2: 229-255, 1973.
6. PROSPERI C., BOLUDA L., LUNA C., FERNÁNDEZ E. **J Appl Phycol** 4: 197-204, 1992.
7. LEE H., ERICKSON L. **Biotechnol Bioeng** 29: 476-481, 1987.
8. LALIBERTE G., DE LA NOUE J. **J Phycol** 29: 612-620, 1993.
9. COMBRES C., LALIBERTE G., REYSSAC J.S., DE LA NOUE. **J Physiol Pl** 91: 729-734, 1994.
10. CHU W.L., PHANG S.M., GOH S.H., BLAKEBROUGH N. **Proceeding of the 1st Asia-Conference on Algal Biotechnology.** University of Malaya, Lumpur: 16-27, 1994.
11. BERMÚDEZ J.L., LODEIROS C., MORALES E. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras** 31: 167-185, 2002.
12. FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B., VEIGA M. **Aquaculture** 42: 207-215, 1984.
13. JEFFREY S., HUMPHREY R. **A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167 (2nd Edition).** Ottawa, pp. 306, 1975.
14. STRICKLAND J., PARSONS T. **A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167 (2nd Edition).** Ottawa, pp. 310, 1972.
15. LIU C., LIN L. **Bot Bull Sin** 42: 207-214, 2001.
16. TSUZUKI M., MIYACHI S. **Aqua Bot** 34: 85-104, 1989.
17. LEWITUS A.J., CARON D.A. **Plant cell Physiol** 32(5): 671-680, 1991.
18. ELLIS R., SPOONER T., YAKULIS R. **Plant Physiol** 55: 791-795, 1975.
19. WIESSNER W., FRENCH C.S. **Planta** 36: 123-129, 1970.
20. ABALDE J., CID A., FIDALGO P., TORRES E.; HERRERO C. **Microalgas: Cultivo y Aplicaciones.** Universidad da Coruña, España. Primera Edición, pp. 106-108, 1995.