

Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp.

José Ortega, Reyna Moronta y Ever Morales*

Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

Recibido: 10-09-02 Aceptado: 30-03-04

Resumen

Las microalgas son microorganismos de importancia ecológica que producen sustancias de gran valor económico como pigmentos y proteínas. La producción de biomasa puede variar en función de la fuente carbonada utilizada en cultivos mixotróficos. Se evaluó el efecto del acetato de sodio (1, 5, 10, 15 y 20mM) sobre el crecimiento, producción de clorofila y carotenoides de la microalga autóctona *Chlorella* sp. Los bioensayos se realizaron en cultivos unialgales y axénicos utilizando nutrientes Algal 4 y 8mM NaNO₃, respectivamente. Los cultivos unialgales por triplicado se mantuvieron en aireación constante, ciclo luz-oscuridad 12:12h, 28±2°C y 6Klx con iluminación lateral; y los axénicos por quintuplicado y agitación constante. El crecimiento se siguió mediante recuento celular hasta fase estacionaria. En cultivos unialgales, el acetato no estimula el crecimiento de *Chlorella*, respecto al control. La velocidad de crecimiento disminuye con la concentración de acetato. En cultivos axénicos la mayor densidad celular, 20.83x10⁶ cel/mL, se alcanzó a 10mM y fue 1.8 veces superior al control. A 10mM de acetato, se produjo el mayor contenido de clorofila, con 0.56pg/cel, respecto al control. Pero, con una disminución del mismo a concentraciones superiores. Aunque el acetato resultó ser una fuente alternativa de carbono para la microalga, debido al incremento de la densidad celular obtenido a 10mM, no logra estimular eficientemente la producción de biomasa en condiciones axénicas para fines tecnológicos. El estudio de fuentes alternativas de carbono en cultivos unialgales puede acelerar el crecimiento de la flora microbiana asociada en detrimento de la microalga, debido a que se establece una competencia interespecífica entre ambos microorganismos.

Palabras clave: Acetato de sodio; *Chlorella* sp.; cultivo axénico; mixotrófico; unialgal.

Influence of acetate and pigments content on growth of the microalga *Chlorella* sp.

Abstract

The microalgae are microorganisms great ecological importance in that they produce substances of considerable economic value such as pigments and proteins. Biomass production of these organisms varies in function of the carbon source used in mixotrophic cultures. This study evaluates the effect of sodium acetate (1, 5, 10, 15 and 20mM) on growth, chlorophyll and carotenoid production of the autochthonous microalga *Chlorella* sp. is evaluated in this paper. Bioassays were carried out in unialgal and axenic cultures, using nutrients

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

Algal 4 and 8 mM NaNO₃ respectively. Triplicate unialgal cultures were performed with constant aeration, a light:dark cycle of 12:12h, 28±2°C, and 6klx lateral illumination; and the axenic ones under constant shaking. Growth was determined by periodic cell count through stationary phase. In unialgal cultures, acetate doesn't stimulate growth of *Chlorella*, respect to control. Growth rates decrease with acetate concentration. In axenic cultures the highest cell density, 20.83x10⁶ cel/mL, was reached at 10 mM, 1.8 times higher than the control. It produced the highest chlorophyll content at 10 mM acetate, with 0.56 pg/cell respect to control, but with a decrease of this at higher concentrations. Although acetate seems to be an alternative carbon source for the microalga, due to increment of the density obtained at 10 mM, doesn't stimulate biomass production in axenic conditions with technological purposes. The further study of alternative carbon sources in unialgal cultures may enhance the growth of the microflora associated in detriment of the microalga, because is established an interspecific competition in both microorganisms.

Key words: Axenic culture; *Chlorella* sp.; mixotrophic; unialgal; sodium acetate.

Introducción

Las microalgas y cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos caracterizados por una gran diversidad metabólica y capaz de producir diferentes compuestos de importancia nutricional, farmacéutica e industrial, bajo adecuadas condiciones de cultivo (1, 2).

La evaluación del tipo y concentración de nutrientes, temperatura, intensidad luminosa, fotoperíodo, salinidad, régimen de cosecha, manipulación genética, etc., permite establecer sistemas de cultivos, dirigidos a la obtención de biomasa microalgal enriquecida con sustancias de interés comercial (3-5). Entre estos compuestos se destacan los pigmentos, tales como la clorofila *a* y los carotenoides. Su síntesis por parte de diversas microalgas y cianobacterias, puede ser incrementada mediante la manipulación de diversos parámetros ambientales. Se han reportado trabajos relacionados con la influencia de la iluminación, suficiencia o deficiencia en nutrientes, salinidad, pH, mixotrofia, etc, para inducir la producción de estos pigmentos de valor comercial (5-8).

La producción de clorofila en microalgas está relacionada con una baja intensidad luminosa, efecto de ensombrecimiento a elevadas densidades celulares, suficiencia

de fuentes nitrogenadas, magnesio y mixotrofia en cultivos discontinuos (9-11). Actualmente se tienen reportes de que las microalgas *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Dunaliella viridis*, *Selenastrum*, *Euglena* y las cianobacterias *Spirulina* y *Anabaena* constituyen fuentes naturales de clorofila.

La fuente principal de carbono en las microalgas es el CO₂, sin embargo éstas son capaces de utilizar compuestos orgánicos para su crecimiento. 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. La condición heterotrófica se establece cuando la microalga es capaz de mantener un crecimiento estable y sostenido como producto del metabolismo de algún sustrato orgánico en ausencia de iluminación. En el caso que utilice simultáneamente para su crecimiento luz y sustratos orgánicos, la microalga manifiesta una capacidad mixotrófica (12).

En el metabolismo del acetato, glucosa o etanol está descrita la actividad de la enzima isocitrato liasa a través del ciclo del glioxalato en diversas microalgas clorofitas (13). La actividad de la isocitrato liasa se incrementa en función de la concentración de acetato entre 0-20 mM en *Scenedesmus obliquus* (14). El acetato es metabolizado a acetyl

CoA, luego convertido a succinato y posteriormente utilizado como precursor para la síntesis de carbohidratos de *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella autotrophica* y *Chlamydomonas reinhardtii*. La concentración y adición continua de acetato en el medio de cultivo de *Chlorella* mantiene un elevado contenido de isocitrato liasa y de su ARNm como respuesta a una constante asimilación de dicho sustrato (15).

Los estudios basados en bioenergética del crecimiento microalgal tanto experimentales como teóricos, en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas sugieren que la mayores productividades se obtienen bajo condiciones mixotróficas (16). Es por ello que en este trabajo se evalúa el efecto del acetato de sodio, como fuente de carbono, sobre el crecimiento y producción de clorofilas y carotenoides de la microalga *Chlorella* sp.

Materiales y Métodos

Microalga

Se utilizaron cultivos unialgales y axénicos de la microalga *Chlorella* sp, la cual es una cepa de agua dulce, aislada de la Represa de Tulé, Estado Zulia, Venezuela. Este microorganismo se mantiene actualmente en la colección de microalgas del Laboratorio de Plantas No Vasculares del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, LUZ.

Efecto del acetato de sodio sobre la microalga *Chlorella* en condiciones unialgales

Para este experimento se utilizó acetato de sodio a 1,0; 5,0; y 10,0 mM. Los cultivos por tres réplicas se realizaron en frascos con capacidad de 350mL, a un volumen de cultivo de 150mL y mantenidos a una temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo luz:oscuridad de 12:12 horas, intensidad luminosa de 6Klx y aireación constante. El crecimiento celular se siguió cada tres días durante 40 días, al igual que el contenido de pigmentos.

Efecto del acetato de sodio sobre la microalga *Chlorella* en condiciones axénicas

En este ensayo se estudió el efecto del acetato de sodio a concentraciones de 0, 1, 5, 10, 15 y 20 mM en agua dulce previamente esterilizada. Para cada tratamiento se utilizaron tubos con tapa de baquelita con capacidad de 50 mL y un volumen de cultivo de 20 mL. Los cultivos por cinco réplicas se mantuvieron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas, a una intensidad luminosa de 6 Klx, en un Shaker con agitación constante de 180 EXC.p.m., durante veinte días. El recuento celular y extracción de pigmentos se realizó cada cinco días.

Evaluación de la biomasa

Recuento celular

El crecimiento de las microalgas en cultivos de medios líquidos se determinó mediante recuento celular cada tres días para los cultivos unialgales de *Chlorella* y cada cinco días para los cultivos axénicos, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. La densidad celular se calculó mediante el recuento de alícuotas con un microscopio óptico binocular Olympus, modelo CH20BIMF110 en cámara de Neubauer mejorada de 0,1 mm de profundidad.

Determinación de clorofilas y carotenoides

Se tomó 1 mL de cultivo y se agregó a un tubo de reacción Eppendorff de 1,5 mL de capacidad. Luego de centrifugado a 8000 r.p.m. durante 15 min. utilizando una microcentrifuga Thomas Scientific. Los pigmentos se extrajeron del pellet mediante la adición de 1 mL. de metanol al 95%. Los extractos, por triplicado, se clarificaron mediante centrifugación y se añadieron en tubos de vidrio para Spectronic 21 de 2,5 mL de capacidad ajustando el volumen con metanol al 95% y tomando en cuenta la dilución. Seguidamente se procedió a medir la absorbancia (D.O) de las muestras a 470 y

653 y 666 nm para carotenoides y clorofila *a* y *b* respectivamente, en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21d contra un blanco de metanol al 95%.

La concentración de clorofila *a* y *b* y carotenoides totales se obtuvo a partir de la ecuación propuesta por Wellburn (17) y los valores expresados en pg/cel.

Resultados y Discusión

Chlorella con acetato en cultivos unialgales

Crecimiento

Se encontró una disminución de la densidad celular con la concentración del acetato. Es decir, a 1,0 mM se produjo una población de $319,45 \pm 0,05 \times 10^6$ cel/mL. Mientras que, cuando se aumentó la concentración a 10,0 mM, descendió a $113,6 \pm 0,01 \times 10^6$ cel/mL (Tabla 1). Esto representa una inhibición del 68,3% respecto al control. Posiblemente, la reducción del crecimiento a las concentraciones de acetato podría implicar la inhibición de algún proceso fisiológico o la limitación de algún nutriente esencial por la interferencia de la concentración de acetato utilizada (18). En cultivos mixotróficos de *Chlorella regularis* con glucosa se ha descrito un efecto degenerativo en un sistema fotosintético, conduciendo esto a un bajo crecimiento en iluminación.

Morales obtuvo que el crecimiento en cultivos unialgales de *Dunaliella viridis* con acetato fue mayor al disminuir su concentración, con un promedio de $9,40 \times 10^6$ cel/mL a 1,0 mM (19). Asimismo, se presenta los resultados en el presente ensayo, donde la concentración de acetato más baja indujo la mayor densidad celular, aunque hubo mejor crecimiento para el control (Figura 1). Sin embargo, el hecho de que en los cultivos unialgales exista una población significativa de bacterias asociadas a la microalga, la adición de acetato contribuya a

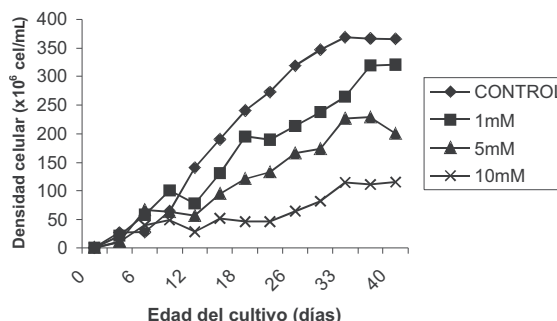


Figura 1. Influencia del acetato de sodio (mM) sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel/mL) de la microalga *Chlorella* en cultivos unialgales.

estimular el crecimiento bacteriano, de tal manera que el mismo pueda interferir en el incremento de la población microalgal. De tal manera, que la elevada densidad de bacterias pudo haber disminuido la disponibilidad de nutrientes para la microalga, hecho que traduce el crecimiento bajo en los tratamientos con acetato.

De acuerdo a los análisis estadísticos (One-way Anova, Test Scheffé), se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el control y los tres tratamientos con acetato (1,0; 5,0 y 10,0 mM).

Pigmentos

Los resultados indican que la cantidad de clorofila y carotenoides fue dependiente del suministro de acetato, ya que a medida que aumentaba la concentración de acetato mayor era la producción de pigmentos (Tabla 1).

El valor más alto de clorofila total se obtuvo a la concentración de 10,0 mM de acetato con $1,31 \pm 0,15$ pg/cel, al igual que para los carotenoides totales con $0,34 \pm 0,07$ pg/cel.

En otros ensayos realizados, se encontró que el acetato induce la síntesis de clorofila en *Chlamydomonas humicola*, mientras

que en *Chlorella* y *Scenedesmus* estimula la producción de lípidos (20).

Chlorella con acetato en cultivos axénicos

Crecimiento

Los análisis estadísticos empleados (One-Way Anova, Test Scheffe), dieron como resultado diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el control y los cinco tratamientos (1,0; 5,0; 10,0; 15,0 y 20,0 mM), al igual como sucedió para los distintos tratamientos en cultivos de *Chlorella* en condiciones unialgales.

Ensayos llevados a cabo por algunos investigadores demostraron que *Chlorella auto-trophica* y *Phaedactylum tricorutum* fueron capaces de crecer a concentraciones superiores de 20 mM de acetato en condiciones mixotróficas y cultivos axénicos (21). Asimismo, se presentan resultados similares en este ensa-

yo, donde en la concentración de acetato más alta se obtuvo crecimiento celular ($10,23 \pm 0,04 \times 10^6$ cel.mL⁻¹) y a la concentración de 10mM se indujo la mayor densidad celular con $20,83 \pm 0,12 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, siendo 1,8 veces mayor que el control (Tabla 2).

Pigmentos

Tanto para la clorofila total como para los carotenoides totales se obtuvo los valores más elevados a 10mM de acetato con $0,56 \pm 0,20$ y $0,495 \pm 0,17$ pg/cel respectivamente, respecto al control con mayor tasa de duplicación; pero con una disminución del mismo a concentraciones superiores (Tabla 3).

La producción de pigmentos celular por la microalga *Chlorella* fue disminuyendo con la edad del cultivo a medida que aumentaba la densidad celular, indicando así que la can-

Tabla 1
Influencia del acetato de sodio (mM) sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel.mL⁻¹), contenido de clorofila y carotenoides totales (pg/cel) de la microalga *Chlorella* en cultivos unialgales

Acetato	Densidad celular	Clorofila total	Carotenoides totales
Control	366,05±0,05	0,24±0,09	0,09±0,02
1,0	319,45±0,02	0,52±0,05	0,18±0,04
5,0	214,21±0,01	0,76±0,14	0,26±0,04
10,0	113,60±0,01	1,31±0,15	0,34±0,07
Valores promedios en fase estacionaria			

Control: Sin acetato.

Tabla 2
Influencia del acetato de sodio (mM) sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel.ml⁻¹) de la microalga *Chlorella* en cultivos axénicas

Edad del cultivo (días)	C	1	5	10	15	20
5	6,69±1,11	9,22±0,07	9,03±0,77	7,07±2,01	8,52±1,19	2,84±0,23
10	11,68±1,06	15,47±0,09	16,79±0,19	20,83±0,12	15,02±1,14	10,23±0,04
15	12,18±0,28	15,17±1,03	16,80±0,09	17,04±0,62	4,27±0,12	3,00±0,31
20	12,21±0,10	14,01±0,22	15,16±0,74	16,31±0,98	2,27±0,33	1,85±0,07

C: Control sin acetato.

Tabla 3

Influencia del acetato de sodio (mM) sobre el contenido de clorofila y carotenoides (pg/cel) en la microalga *Chlorella* en condiciones axénicas

Acetato	Clorofila total	Carotenoides
Control	0,48±0,06	0,43±0,04
1	0,48±0,16	0,43±0,31
5	0,45±0,09	0,48±0,29
10	0,56±0,20	0,49±0,17
15	0,35±0,39	0,30±0,10
20	0,28±0,07	0,20±0,04

Valores máximos del contenido de pigmentos alcanzados a los cinco días de crecimiento

Control: sin acetato.

La producción de clorofila y carotenoides fue independiente del uso de acetato.

La baja producción de pigmentos a 15 y 20 mM de acetato, podría implicar la inhibición de algún proceso fisiológico o la limitación de algún nutriente esencial por interferencia de la concentración de acetato utilizada (18).

En otros ensayos realizados, se encontró que el acetato promovió la síntesis de clorofila en *Chlamydomonas humicola*, mientras que en *Chlorella* y *Scenedesmus* estimuló la producción de lípidos (20).

Conclusiones

Aunque el acetato resulta ser una fuente alternativa de carbono para la microalga, debido al incremento de la densidad celular obtenido a 10mM, no logra estimular eficientemente la producción de biomasa en condiciones axénicas para fines tecnológicos. El estudio de fuentes alternativas de carbono en cultivos unialgales puede acelerar el crecimiento de la flora microbiana asociada, en detrimento de la microalga, debido a que se establece una competencia interespecífica entre ambos microorganismos.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, por su cofinanciamiento para desarrollar la presente investigación a través del proyecto CONDES-1902-99.

Referencias Bibliográficas

- DUNSTAN G., VOLKMAN J., BARRET S., GARLAND C. *J Applied Phycol* 5: 57-83, 1993.
- BOROWITZKA M. *J Applied Phycology* 7: 3-15, 1995.
- MOLINA E., SÁNCHEZ J., GARCÍA F., FERNÁNDEZ J., ACIÉN F., URDA J. *Appl Microbiol Biotechnol* 42: 658-663, 1995.
- FÁBREGAS J., PATIÑO M., MORALES E., CORDERO B., OTERO A. *Applied Environ Microbiol* 62: 266-268, 1996.
- FÁBREGAS J., OTERO A., MORALES E., ARREDONDO B., PATIÑO M. *Aquaculture* 169: 167-176, 1998.
- GOUVEIA L., VELOSO V., REIS A., FERNANDES H., EMPIS J. *Bioresource Technology* 57: 157-163, 1996.
- MORALES E., RODRÍGUEZ M., GARCÍA D., MARCO E. Producción de ficocianina de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120. *XLVII Convención Anual de AsoVac*. Valencia (Venezuela), pp. 16-21, 1997.
- ROMERO T. Tecnología de cultivo de *Chlorella vulgaris* en los efluentes líquidos de la industria pesquera y subproductos derivados. *Anais dos 4 Congreso Latinoamericano de Ficología*. Brasil, pp. 475-495, 1998.
- FALKOWSKI P., OWENS T. *Plant Physiology* 66: 592-595, 1980.
- MOLINA E., SÁNCHEZ J., GARCÍA F., ACIÉN F., FERNÁNDEZ J., VALDÉS F. *Bio-technology Letters* 16: 1035-1040, 1994.
- OTERO A. Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato (Tesis doctoral). Universi-

- dad de Santiago, Santiago de Compostela (España), pp. 163, 1995.
12. PROSPERI C., BOLUDA L., LUNA C., FERNÁNDEZ E. **J Appl Phycol** 4: 197-204, 1992.
 13. LALIBERTÉ G., HELLEBUST J. **J. Phycol** 25 (supl 2): 10, 1989.
 14. COMBRES C., LALIBERTÉ G., REYSSAC J., DE LA NOUE J. **Physiol Pl** 91: 729-734, 1994.
 15. SCHMIDT A., ZETSCHKE K. **Bot Acta** 103: 48-53, 1990.
 16. LEE H., LEE S., PARK B. **Biomass** 18: 153-160, 1989.
 17. WELLBUR A. **J Plant Phycol** 144: 307-313, 1994.
 18. STEIN J. **Culture methods and growth measurements**. Cambridge University Press. pp. 365, 1975.
 19. MORALES E. Contribución al conocimiento de las condiciones óptimas de crecimiento de *Dunaliella viridis* (chlorophyta: Volvocales) en cultivos de laboratorio (Trabajo de Ascenso). Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), pp 72, 1992.
 20. LALIBERTÉ G., DE LA NOUE J. **J Phycol** 29: 612-620, 1993.
 21. UKELES R., ROSE W. **Marine Biology** 37: 11-28, 1976.