

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Phormidium sp* EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO PARA SU APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO.

Aguilera Segoviano, Elizabeth (1) Ayala Islas, Alberto (2)

¹ [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [elissi_21hotmail.com]

² [Ingeniería Bioquímica, Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Irapuato, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [alayala@hotmail.com]

Resumen

Las microalgas son organismos fotosintéticos que son capaces de transformar la energía luminosa en energía química; pueden ser unicelulares o pluricelulares y son considerados como productores primarios de la cadena trófica. En los últimos años se ha incrementado la utilización de microalgas para diversos fines entre los que destacan la producción de carotenoides, lípidos y polisacáridos así como su aprovechamiento en la industria alimentaria, su uso para la purificación de aguas residuales y su aprovechamiento energético principalmente con la obtención de biodiesel. En este trabajo se observó el comportamiento de *Phormidium* mediante cinéticas de crecimiento, evaluando un medio de cultivo a base de sales inorgánicas (Bold Basal) y un medio enriquecido con nitrógeno. El crecimiento celular se contabilizó mediante una cámara de Neubauer y la densidad celular se determinó mediante la técnica de espectrofotometría. *Phormidium* mostró una rápida adaptación y crecimiento en medio Bold basal con lo que se estableció que se trata de una cianobacteria de fácil propagación, por lo que puede ser una buena opción esta para su aprovechamiento biotecnológico y su aplicación en la remoción de metales en aguas residuales. En medio Bold Basal enriquecido con nitrógeno *Phormidium sp* presentó una inhibición en su crecimiento.

Abstract

Microalgae are photosynthetic organisms that are able to transform light energy into chemical energy; They can be unicellular or multicellular and are considered as primary producers in the food chain. In recent years it has increased the use of microalgae for various purposes among which are the production of carotenoids, lipids and polysaccharides and their use in the food industry, it is use for the purification of waste water and energy use primarily with biodiesel. *Phormidium* behavior through growth kinetics, was observed in this work evaluating a culture-based (Basal Bold) inorganic salts medium and a medium enriched with nitrogen. Cell growth was counted using a Neubauer chamber and the cell density was determined by spectrophotometry. *Phormidium* showed a rapid adaptation and growth in basal medium Bold with what is established that it is a cyanobacterium easily spread, so it may be a good option is for biotechnology development and application in the removal of metals in wastewater. In bold basal medium enriched with nitrogen *Phormidium sp* showed a growth inhibition.

Palabras Clave

Phormidium sp; Densidad óptica; Medio Bold Basal; Fotobiorreactor.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas y algunos procariotas capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas. Su importancia radica en su papel como productores primarios de las cadenas tróficas. [1] (Abalde & Herrero, 2004). Las microalgas son fuente de macronutrientes, vitaminas y elementos traza; en el caso de las comunidades acuáticas son la fuente más importante de proteínas, carbohidratos y, sobre todo, de ácidos grasos. [2] (Reyes Bustamante & Ortega Salas, 1998). Las condiciones para su óptimo crecimiento, como la temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes y pH, varían considerablemente dependiendo de la especie. [3] (Contreras Flores & y col., 2003)

En los últimos años se han realizado investigaciones acerca de las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas y se han logrado importantes avances en aplicaciones con fines en la salud humana, purificación de aguas residuales, acuicultura, producción de pigmentos, antibióticos y biocombustibles. Se han reportado aproximadamente 493 especies que cuentan con ciertas características que podrían ser utilizadas como una alternativa, no solo para la producción de antibióticos y pigmentos, sino que podrían ser una alternativa de alimentación para el hombre y para algunos animales. En algunos países ya se han reportado especies de microalgas con un gran potencial alimenticio para el ser humano, algunos de estos países son Alemania, Perú, India, Japón y México. [4] (Medina Jasso, Piña Valdez, & Nieves Soto, 2012)

Clasificación

Khanet en el año 2009 realizó una clasificación de las microalgas en cuatro grupos debido a su abundancia: diatomeas, algas verdes, algas verde-azules (cianobacterias) y algas doradas. Gracias a esta diversidad de algas es que existe un gran potencial para la búsqueda y explotación de dichos microorganismos para la obtención de productos que satisfagan las necesidades de los seres

humanos, animales o bien, ayuden a resolver algún problema.

- *Cianobacterias*

Entre la clasificación de las microalgas se encuentran las cianobacterias o cianofíceas más comúnmente llamadas algas verde-azules que son microorganismos procariontes, aeróbicos y fotoautótrofos, la fotosíntesis es su principal modo de obtención de energía. Se encuentran entre los organismos más primitivos de la tierra ya que su origen se remonta a unos 3500 millones de años. Su facilidad de crecimiento favorece su aparición tanto en el suelo como en el medio acuático, principalmente en aguas alcalinas o neutras de un pH entre 6 y 9, crecen preferentemente entre los 15 y 30 °C. La concentración de nitrógeno y fósforo tiene un importante papel, las cianobacterias prefieren una alta concentración de nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo. [5] (Roset, Aguayo, & Muñoz, 2001)

- *Aplicaciones biotecnológicas de las cianobacterias*

Se ha centrado la importancia en las cianobacterias debido a los componentes bioactivos que muchas de estas presentan, a los cuales se les ha atribuido un gran potencial para la producción de compuestos interesantes, principalmente a nivel médico y nutricional y muchos otros se siguen investigando. Entre los componentes bioactivos se encuentran lipopéptidos, aminoácidos, ácidos grasos, macrólidos, amidas, entre otros. Se ha puesto principal importancia en los lipopéptidos debido a que se les han atribuido muchas actividades farmacológicas, entre las que destacan las citotóxicas, antitumorales, antivirales, antibióticas, antimaláricas, reversoras de multiresistencia a drogas y herbicidas. [6] (Arrieta, 2008)

El nitrógeno es sin duda una parte sumamente importante en la composición del medio de cultivo para el óptimo crecimiento de las microalgas, ya que constituye aproximadamente el 5% del total de estas, y forma parte de la composición de proteínas y nucleótidos de la biomasa. Es por esto que en el presente trabajo se realizó el estudio de la cinética de crecimiento de *Phormidium sp*, una cianobacteria, con la finalidad de observar su comportamiento en base a la concentración de

nitrógeno disponible en el medio de cultivo, conociendo bajo qué condiciones se obtiene una mayor producción de biomasa se puede proponer a *Phormidium sp* como una alternativa para obtener compuestos bioactivos que sean de utilidad nutricional y médica o bien para la obtención de compuestos como ácidos grasos, carotenos o su aplicación en el tratamiento de aguas residuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de una muestra de agua dulce procedente de un río del estado de Guanajuato se realizó el aislamiento de una cianobacteria identificada como *Phormidium sp*. El aislamiento se llevó a cabo mediante la técnica de diluciones seriadas. Los cultivos de biomasa se obtuvieron utilizando un fotobiorreactor con una capacidad de 400 ml al cual se le adicionó un medio de cultivo elaborado a partir de sales inorgánicas (Bold Basal) el cual se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El fotobiorreactor se mantuvo con aireación y presencia de luz blanca durante toda la cinética de crecimiento con la finalidad de favorecer el crecimiento algal. El crecimiento celular se contabilizó mediante el recuento celular utilizando una cámara de Neubauer y la densidad celular se determinó mediante la técnica de espectrofotometría, en la cual se midió la concentración de clorofila en las células a 685 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó el aislamiento de una cianobacteria, como se observa en la imagen 1; esta cianobacteria presentó células filamentosas extensas, rectas o curvas, de color verde azulado, con pequeñas fragmentaciones a lo largo de la célula. La forma epical es redonda pero algunas veces también se puede observar recta. Algunas veces los espacios entre los segmentos son difíciles de ver debido a que la coloración no es demasiado verde. En base a las características antes mencionadas se pudo identificar dicha cianobacteria como *Phormidium sp*.

Se obtuvo un abundante crecimiento algal utilizando el medio con la composición original de nitrógeno, el seguimiento de los cultivos se realizó cada 24 horas, durante este tiempo se mostró un aumento progresivo en la cantidad de células/ml.

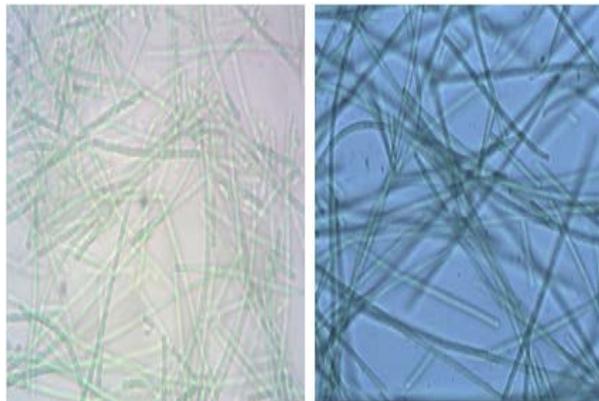


IMAGEN 1: Comparación de la cianobacteria aislada (a) con *Phormidium sp* (b) (Arrieta, 2008)

La imagen 2 muestra el comportamiento de la cinética de acuerdo a la cantidad de células, se puede observar que *Phormidium sp* presentó una fase de adaptación del día 0 al día 5, mientras que presentó una fase exponencial a partir del día 6 y que continuó hasta el día 17, después del día 17 se observó un descenso en la cantidad de células presentes, esto pudo ser a que no se realizó una buena toma de muestra o que la cantidad de células era menor pero estar pudieran ser de un tamaño mucho mayor debido a que la densidad óptica siguió en ascenso.

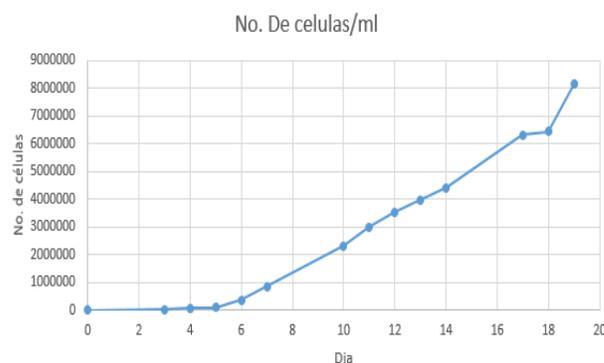


IMAGEN 2: Cinética de crecimiento de *Phormidium sp* en medio Bold Basal.

La cinética se realizó hasta el día 19 donde se contabilizaron 8,144,000 células/ml.

Como se puede observar en la imagen 3 el comportamiento de la cinética de crecimiento

obtenida a partir de la medición de clorofila en las células fue similar a la que se obtuvo por conteo celular, sin embargo en esta se observó que la cantidad de clorofila fue aumentando de manera exponencial a lo largo del crecimiento del cultivo sin presentar un decaimiento.



IMAGEN 3: Densidad óptica de *Phormidium sp* en medio Bold Basal.

Al enriquecer el medio de cultivo BBM con el doble de nitrógeno el crecimiento de *Phormidium sp* fue mucho menor en comparación con el medio que contenía la concentración de nitrógeno original, como se puede observar en la imagen 4 la fase de adaptación fue corta, después se presentó la fase exponencial del día 1 al día 6, en esta fase la cantidad de células era muy baja, obteniéndose como máximo 14000 células/ml en el día 6, lo que significa 27 veces menos la cantidad de células obtenida con la composición original de nitrógeno en el medio. La baja concentración de las células fue observada a simple vista en el fotobiorreactor, debido a que no se apreciaba una coloración azul-verdosa.

En la imagen 5 se puede apreciar la cinética de crecimiento que se obtuvo a partir de la medición de la densidad óptica, en esta cinética se observa una fase corta de adaptación y al igual que en el conteo celular se observa una pequeña fase exponencial hasta el día 6 y una fase estacionaria hasta el día 9, a diferencia de la cinética del conteo celular (imagen 4) en este caso no se muestra un decaimiento drástico a partir del día 10, sin embargo se observa que los valores de la densidad óptica no aumentan de manera considerable desde el día 10 hasta el día 13 lo que

nos indica que la cantidad de clorofila se mantuvo en esos días. A partir del día 14 se observa un decaimiento en la densidad óptica, estos resultados coinciden con el conteo celular.

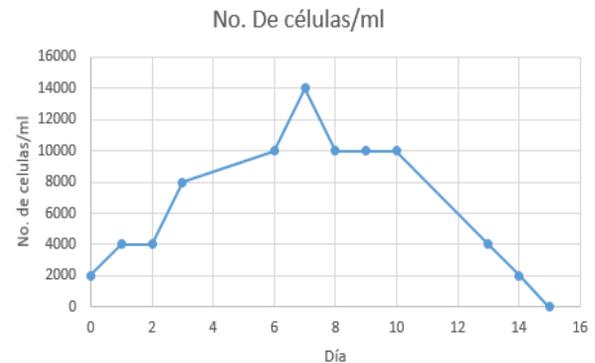


IMAGEN 4: Cinética de crecimiento de *Phormidium sp* en medio Bold Basal enriquecido con nitrógeno.



IMAGEN 5: Densidad óptica de *Phormidium sp* en medio Bold basal enriquecido con nitrógeno.

Comparando las cinéticas de crecimiento tanto del medio BBM con la concentración de nitrógeno normal como del medio BBM enriquecido con nitrógeno es evidente la baja cantidad de células que se encuentran en el medio enriquecido con nitrógeno. Smith en 1993 observó que los niveles bajos de N:F (nitrógeno: fósforo) promueven la dominancia de cianobacterias, y aunque no menciona si *Phormidium sp* sigue este comportamiento el hecho de que sea una

cianobacteria puede explicar porque se obtuvieron valores bajos de biomasa.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo resaltan que *Phormidium sp* tiene una alta tasa de crecimiento en medio Bold Basal por lo que es una buena opción para su aprovechamiento biotecnológico.

El crecimiento de *Phormidium sp* sufre una inhibición cuando el medio de cultivo Bold basal es enriquecido con nitrógeno.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor M.C. Alberto Ayala Islas que con su conocimiento, orientación, dedicación, paciencia y esfuerzo hizo posible este trabajo. A mi familia, en especial a mis padres por darme todo su amor y ser mi fortaleza para seguir adelante. A mis amigas, Cynthia y Gemma por su apoyo, dedicación y valiosa amistad. Por último y no menos importante a Dios que ha sabido guiarme por el camino de la felicidad.

REFERENCIAS

- [1] Abalde, J. y Herrero, C. 2004. Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. pp. 16-18.
- [2] Reyes Bustamante, H., & Ortega Salas, A. (1998). Reproducción de Trucha Arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* de 1985 a 1988 en la Piscifactoría Apulco, Puebla, México. *Revista de la Universidad del Mar*, Volumen II, pp. 159-164
- [3] Contreras Flores, C., & y col. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Redalyc*, Volumen.28,pp. 451-455.
- [4] Medina Jasso, A., Piña Valdez, M., & Nieves Soto, J. (2012). La importancia de las microalgas. *CONABIO*,pp. 1-5.
- [5] Roset, J., Aguayo, S., & Muñoz, M. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología*, pp. 65-71.
- [6] Arrieta, E. (2008). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, Volumen 14, pp.8-13.