

Crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. cultivada en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa*

Antonio Vera, Mayela Yépez, Maritza Martínez* y Gladys León de Pinto.*

Centro de Investigaciones Biológicas, Facultad de Humanidades y Educación, La Universidad del Zulia, Apartado Postal 526, 4001-A, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. E-mail: ajvera68@latinmail.com. *Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación, La Universidad del Zulia, Apartado Postal 526, 4001-A, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Recibido: 16 de mayo del 2001. Aceptado: 12 de septiembre del 2001.

Palabras clave: *Chlorella* sp., *Acacia tortuosa*, medios de cultivo, exudado gomoso, crecimiento.
Key words: *Chlorella* sp., *Acacia tortuosa*, culture media, gum exudate, growth.

RESUMEN. Se evaluó el crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa* utilizando cultivos discontinuos. Se prepararon, por triplicado, cuatro medios de cultivo (A = sintético, B = goma, C = sintético + goma + fosfato y D = goma + fosfato) a una concentración de 4 y 0,2 mmol/L de nitrógeno y fosfato respectivamente; se mantuvieron con aireación constante y pH 7-7,5. Los medios C y D mostraron la más elevada densidad celular, la cual se alcanzó a mayores velocidades de crecimiento y menores tiempos de duplicación, en comparación con el medio control (A). Esto podría estar vinculado con la capacidad mixotrófica y el sistema enzimático de *Chlorella* sp. para utilizar la fuente de carbono y nitrógeno presentes en el exudado gomoso. El crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. en el medio B, consistente en goma solamente, no experimentó fase exponencial, lo cual podría relacionarse con la ausencia de fosfato en este medio. El exudado gomoso de *Acacia tortuosa* constituye una alternativa viable, no convencional, en la preparación de medios de cultivo, en presencia de fosfato, para el crecimiento de *Chlorella* sp.

ABSTRACT. The effect of gum exudate (*Acacia tortuosa*) culture media on the mixotrophic growth of *Chlorella* sp. was evaluated, using batch cultures. Four media, each with three replicates, were prepared (A = synthetic medium, B = gum exudate only, C = synthetic + gum + phosphate, D = gum + phosphate) with 4 mmol/L nitrogen and 0.2 mmol/L phosphate concentrations, constant aeration and pH 7-7.5. Highest cell density, as well as fastest growth rate and cell division, were observed in media C and D, probably due to the mixotrophic ability and enzymatic system of *Chlorella* sp. to use carbon and nitrogen in the gum medium. The lack of exponential growth in *Chlorella* sp. in gum medium only (B), may be due to the absence of phosphate. *Acacia tortuosa* gum exudate is a unconventional, but viable alternative culture medium for *Chlorella* sp.

INTRODUCCION

Los medios de cultivo deben ser sustratos adecuados para el desarrollo de las algas microscópicas, que puedan satisfacer sus requerimientos de macronutrientes y micronutrientes. Se han utilizado medios sintéticos tradi-

cionalmente.¹⁻³ Sin embargo, el valor de los componentes de estos sustratos es un factor significativo a considerar en la producción de dichos microorganismos. La crisis económica ha promovido la búsqueda de medios alternativos menos costosos.⁴⁻⁶

Chlorella sp. es capaz de desarrollarse heterotróficamente, como también de forma mixotrófica,⁷⁻⁸ y bajo condiciones adecuadas de cultivo alcanza una elevada tasa de crecimiento. La obtención de diversos productos a partir de esta especie, le confiere gran interés biotecnológico y terapéutico.

Los exudados gomosos o hidrocoloides, son secreciones vegetales cuya producción se estimula a través de heridas practicadas a nivel del tronco de árboles que crecen en ambientes tropicales y subtropicales.⁹ Se ha demostrado que estos productos naturales complejos están constituidos por una fracción glucídica y otra proteica. Por ejemplo, *Acacia tortuosa* (L.) Willd. ("úveda") exuda una goma clara, muy soluble en agua, constituida por galactosa, arabinosa, trazas de xilosa, residuos de ácidos urónicos, con un elevado contenido relativo de nitrógeno y de los oligoelementos, calcio, sodio, potasio y magnesio.¹⁰

Recientemente, se ha ensayado el uso de las gomas de *Laguncularia racemosa* ("mangle blanco"), *Cercidium praecox* ("yabo") y *Cedrela odorata* ("cedro") como medio de cultivo para hongos.¹¹⁻¹²

El objetivo de este trabajo preliminar fue evaluar el crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa*.

MATERIALES Y METODOS

Origen de las muestras

La cepa de *Chlorella* sp. se extrajo de muestras de agua de la Represa de Tulé, Edo. Zulia. El exudado gomoso de *A. tortuosa* se colectó en un bosque muy seco tropical, Edo. Zulia (Ciudad Universitaria, La Universidad el Zulia). Los especímenes fueron identificados por la Dra. Lourdes Cárdenas de Guevara y corroborados con la muestra botánica, número de colecta 1920, del Herbario del Zulia, Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia (HERZU).

Métodos

A. Preparación de los medios de Cultivo

Medio A (medio sintético)

La composición del medio sintético se muestra en la Tabla 1.¹³ Los macronutrientes (1,856 0 mg) y micronutrientes (0,125 mg) se disolvieron, por separado, en agua destilada (10 mL). Se mezclaron ambas disoluciones y se enrasaron (50 mL). A partir de esta disolución madre (200 mmol/L NO_3^- ; 10 mmol/L PO_4^{3-}) se preparó una disolución diluida (4 mmol/L NO_3^- ; 0,2 mmol/L PO_4^{3-}).

Medio B (Medio de cultivo con base en el exudado gomoso de *A. tortuosa*)

Los indicadores analíticos de la goma de *A. tortuosa* se muestran en la Tabla 2.¹⁰

El exudado gomoso (0,927 2 g) se disolvió completamente en agua destilada (1 L) a temperatura ambiente. Se filtró a través de un tamiz de gasa y papel Whatman No. 1. Esta disolución es 4 mmol/L en nitrógeno.¹⁰

Medio C (medio de cultivo combinado: sintético + goma + fosfato)

Se empleó una disolución madre del medio sintético (10 mL), equivalente a 2 mmol de NO_3^- ; 0,1 mmol PO_4^{3-} . La goma de *A. tortuosa* (0,463 6 g) se disolvió en agua destilada (100 mL), correspondiente a 2 mmol de nitrógeno. Se adicionó como suplemento NaH_2PO_4 (0,012 g), equivalente a 0,1 mmol PO_4^{3-} .

La disolución resultante se enrasó hasta 1 L y contenía nitrógeno y fosfato (4:0,2 mmol/L).

Medio D (exudado gomoso + fosfato)

Se disolvieron 0,927 2 g de la goma de *A. tortuosa* en 100 mL de agua destilada y se pesaron 0,024 g de NaH_2PO_4 (2 mmol de fosfato). Las disoluciones se mezclaron y se enrasó a 1 L, con lo que se obtuvo la relación nitrógeno : fosfato requerida.

Las fracciones de los medios de cultivo se esterilizaron, separada-

mente, a $1,034\,25 \cdot 10^5$ Pa (15 psi) de presión y a 121 °C por 15 min.

B. Bioensayos

Se realizaron ensayos preliminares a fin de normalizar la metodología. El bioensayo de acondicionamiento permitió aclimatar la cepa a las condiciones de cada uno de los medios de cultivo; de estos se tomaron los inóculos iniciales ($1 \cdot 10^6$ cel/mL).

El bioensayo definitivo se desarrolló en cultivos discontinuos, a un volumen determinado (300 mL), con tres réplicas por medio, se mantuvo constante la relación nitrógeno : fosfato (4 :

0,2 mmol/L). Se evaluó el crecimiento de *Chlorella* sp., a través de recuentos celulares interdiarios, durante 24 d.

Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones siguientes: $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, 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 a 7,5 y aireación constante.

C. Parámetros de crecimiento

La densidad celular se determinó mediante conteo en las dos cámaras de un hematocitómetro con rayado de Neubauer BAECO, a través

Tabla 1. Composición del medio sintético.¹³

Oligoelementos		
Iones ^a	Sales	(mg/L)
Zn ²⁺	ZnCl ₂	13,6
	ZnSO ₄	28,7
Mn ²⁺	MnCl ₂ · 4H ₂ O	19,79
Mo ⁶⁺	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	24,2
Co ²⁺	CoCl ₂ ^b	1,65
	CoCl ₂ · 6H ₂ O ^b	2,31
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,49
Fe ³⁺	Citrato férrico	670
Vitaminas		
	(mg/L)	
Tiamina	350	
Biotina	50	
B ₁₂	30	
Macronutrientes		
Elementos	Sales	(mg/L) ^c
Nitrógeno	NaNO ₃	1 700
Fósforo	NaH ₂ PO ₄	156

^a Acomplejados con EDTA. ^b Cualquiera de las dos sales.

^c Equivalente a 200:10 mmol/L de N:P.

Tabla 2. Datos analíticos de la goma de *Acacia tortuosa* (medio de cultivo B).

Dato	Magnitud
Humedad (%)	6,5
Ceniza ^a (%)	2,3
Nitrógeno ^a (%)	6,04
Proteína ^a (%) (N · 6,25)	37,7
Viscosidad intrínseca ^a (mL/g)	8,6
Peso equivalente ^a (g)	1 112
Acidez (%)	16
Composición de azúcares después de la hidrólisis ^a (%)	
Galactosa	66
Arabinosa	17
Xilosa	1

^a Corregido para humedad.

de un microscopio óptico Olympus y un contador manual. El cálculo se llevó a cabo empleando la fórmula:

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} \cdot 10^4$$

La velocidad de crecimiento se calculó, en fase logarítmica, mediante la ecuación:

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t_t - t_0}$$

y el tiempo de duplicación se estimó de acuerdo con la fórmula:

$$td = \ln 2 / \mu$$

El análisis de varianza y de rango múltiple de Scheffe se hizo por el programa Statgraphics versión 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las curvas de los medios de cultivo A, C y D mostraron el crecimiento típico de *Chlorella* sp. Sin embargo, la correspondiente al medio B no experimentó fase exponencial (Fig. 1). El análisis de varianza estableció diferencias significativas a un nivel del 95 % (Tabla 3).

Los medios C y D evidenciaron la mayor densidad celular (Tabla 4, Fig. 1). Los valores obtenidos para la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación soportan esta aseveración (Tabla 4). El análisis de rango múltiple de Scheffe indicó que no existían diferencias significativas entre estos medios, a un nivel de confianza de 95 % (Tabla 5); mientras que los medios B y D sí mostraron diferencias significativas según este análisis.

El medio B se caracterizó por la presencia de una coloración verde-amarilla a partir del cuarto día de iniciado el ensayo.

El elevado crecimiento de *Chlorella* sp. en los medios C y D, en comparación con el medio A (control) (Tabla 4) podría estar relacionado con la fuente glucídica (galactosa, arabinosa y trazas de xilosa) aportada por el exudado gomoso de *A. tortuosa*, y su elevado contenido relativo de nitrógeno 6,04 % (37,75 % de proteína) (Tabla 2), superior al descrito para *Acacia senegal* (goma arábica).¹⁰

La utilización de azúcares de los medios de cultivo se ha evidenciado ampliamente en *Chlorella* sp.⁷⁻⁸ Los estudios preliminares, empleando la cepa utilizada en esta investigación, han demostrado su capacidad de asimilar glucosa, sacarosa, dulcitol y

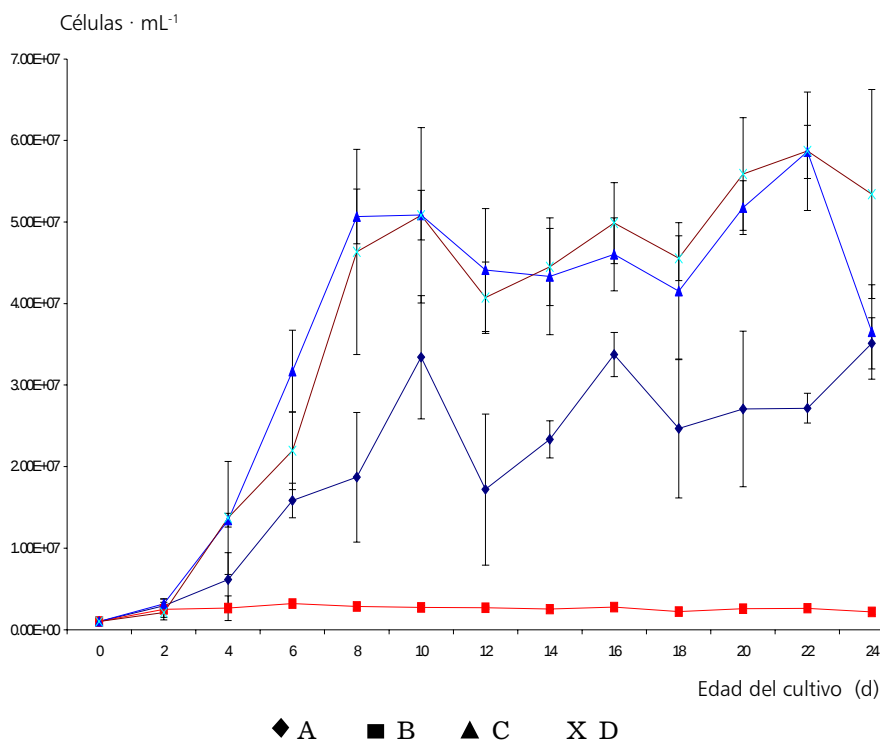


Fig. 1. Crecimiento de *Chlorella* sp. en medios de cultivo enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa*.

Tabla 3. Análisis de varianza del crecimiento (conteo celular) de *Chlorella* sp. en medios de cultivo enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Significación
A: Tratamiento	2,14E+15	3	8,04E+14	586,476	0,000 0
B: Réplica	4,22E+12	2	2,11E+12	1,542	0,288 2
Residual	8,22E+12	6	1,37E+12		
Total (Corregido)	2,42E+15	11			

Tabla 4. Parámetros de crecimiento de *Chlorella* sp. en medios de cultivo enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa*.

Tratamiento	μ	td		Máxima densidad celular (células · mL ⁻¹ · 10 ⁶)
	(div/d)	(d)	(h)	
A	0,29	2,38	57,1	33,41
C	0,33	2,1	50,4	50,84
D	0,37	1,86	44,6	50,83

Tabla 5. Análisis de rango múltiple de Scheffe del crecimiento (conteo celular) de *Chlorella* sp. en medios de cultivo enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia tortuosa*.

Prueba	Tratamientos confrontados	Diferencias	Promedio
Scheffe	A-B	1,80E+07*	± 3,61E+06
	A-C	-1,59E+07*	
	A-D	-1,68E+07*	
	B-C	-3,39E+07*	
	B-D	-3,48E+07*	
	C-D	-9,26E+05	

* Diferencias significativas.

almidón (comunicación personal, Morales, 2000).

Se ha reportado a la glutamina como fuente de nitrógeno en *Chlorella vulgaris*, lo cual está relacionado íntimamente con su sistema enzimático.¹⁴

Los resultados obtenidos en el medio B podrían vincularse con la interrelación de los nutrientes nitrógeno y fósforo. Se ha reportado la presencia de clorosis marcada en cultivos de *Ankistrodesmus braunii* e *Hydrodictyon reticulatum* deficientes en fósforo.¹⁴ Por otra parte, se ha reportado en *Nannochloris* sp.,¹⁵ y en *Chlorella* sp.¹⁶ la aparición de un color de verde-amarillo en cultivos deficientes en nitrógeno. Sin embargo, al comparar los tratamientos B y D, este último con un crecimiento del alga relativamente elevado, se observó que ambos contenían el mismo suministro de nitrógeno aportado por la goma de *A. tortuosa*; la diferencia radicó en la presencia de fosfato en el tratamiento D, el cual podría desempeñar un papel fundamental en la captación de nitrógeno por parte de las células de las algas. Se ha reportado que la incorporación y asimilación del nitrógeno se estimula con el suministro de ATP vía fosforilación.¹⁷

A partir de estos resultados, se infiere que el fósforo actúa como elemento limitante para el crecimiento de *Chlorella* sp. en el tratamiento B.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que los substratos preparados a partir del exudado gomoso de *A. tortuosa*, permiten el crecimiento adecuado de *Chlorella* sp. La posible substitución del medio sintético por los medios C

y D tiene un alcance importante para el cultivo de las algas microscópicas, debido a que su preparación se basa en un producto natural, de fácil obtención y económico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a los Profesores Clark Casler y Ever Morales por su aporte en el análisis estadístico de los datos y en la corrección del manuscrito respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- Walne P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. **Fishery Invest.** Min. Agric. Fish., Serie 2, **24**, 8, 1966.
- Guillard R.L. Division rates. En *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. J.R. Stein (Ed. 9. Cambridge University Press, 289-313, 1973.
- Becker E.W. *Biotechnology y Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 293, 1994.
- Koenig M., de Oliveira J., Countunho C. y Pereira K. O vinhoto no cultivo de microalgas (microalgae culture with sugarcane broth). **Gayana Botanica**, **45**, 253, 1988.
- Travieso L., Borja R., Sánchez E., Benítez F., Dupeirón R. y Valiente V. *Chlorella vulgaris* Growth on Pretreated Cane Sugar Mill Waste. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **57**, 986, 1996.
- Fábregas J., Morales E., Arán J. y Otero A. Germinated *Solanum tuberosum*: an agricultural product for marine microalgae culture. **Bioresource Technology**, **66**, 19, 1998.
- Martínez F. and Orus M. I. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101. **Plant. Physiol**, **95**, 1150, 1991.

- Lee Y.K., Ding S.Y., Hoe C.H. and Low C. S. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, **8**, 163, 1996.
- Clamens C., Rincón F., Vera A., Sanabria L. and León de Pinto G. Species widely disseminated in Venezuela which produce gum exudates. **Food Hydrocolloids**, **14**, 253, 2000.
- León de Pinto G., Martínez M., Ortega S., Villavicencio N. and Borjas L. Comparison of gum specimens from *Acacia tortuosa* and other *Gummiferae* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, **21**, 795, 1993.
- Mesa L. M. y León de Pinto G. Exudado gomoso de *Laguncularia racemosa* ("mangle blanco") como medio de cultivo para hongos. **Invest. Clin.**, **34**, 85, 1993.
- Mesa L. M. et al. Comportamiento de *Aspergillus niger* en los exudados gomosos en *Cercidium praecox* y *Cedrela odorata*. **Boletín Micológico**, **12**, 35, 1997.
- Fábregas J., Herrero C., Cabezas B. and Abalde J. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. **Aquaculture**, **49**, 231, 1985.
- Abalde J., Cid A., Fidalgo J.P., Torres E. y Herrero C. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones, Universidad Da Coruña, 210, 1995.
- Lubián L.M. Factores que afectan al crecimiento en cultivo del alga planctónica *Nannochloris* sp. **Nf. Tec. Inv. Pesq.**, **67**, 1, 1979.
- Iriarte F. y Buitrago E. Determinación de la concentración y fuente óptima de nitrógeno en cultivos de *Chlorella* sp. usados como inóculo de cultivos masivos. **Memoria**, **51**, 181, 1991.
- Tischner R. and Lorenzen H. Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. **Planta**, **146**, 287, 1979.



ACTIVIDADES CIENTÍFICAS
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

SEMINARIO REGIONAL SOBRE NUTRICION ANIMAL

Instituto de Ciencia Animal

Del 16 al 18 de octubre de 2002.

TEMATICAS: *Nutrición de rumiantes. Fuentes de alimentos.*

CUOTA DE INSCRIPCION: 100.00 USD. Se pagará en el momento de la acreditación en el Seminario.

COMITE ORGANIZADOR: Dra. Bertha Chongo.

E-mail: ica@ceniai.inf.cu

Fax: (537) 33-5382