



Avances del Banco de Cepas de Microalgas en el Centro Internacional Náutico Fluvial y Portuario del SENA

Advances on Microalgae Strains Bank at Centro International Náutico Fluvial y Portuario of SENA

Martha Jeannette Torres Virviescas

Bióloga Marina

Instructor e integrante Grupo de Investigación SENA CINAFLUP

mjtorresv@sena.edu.co

Servicio Nacional de

Aprendizaje SENA

Regional Bolívar

Centro Internacional Náutico

Fluvial y Portuario, Cartagena

Jorge Hernán Sánchez Aponte

Biólogo Marino

MSc en Gestión y Auditorias

Ambientales

Instructor e integrante Grupo de Investigación SENA CINAFLUP

jhsancheza@sena.edu.co



Resumen

El presente artículo se constituye en un avance de resultados obtenidos del proyecto de investigación denominado 'Montaje y puesta en funcionamiento de un Banco de Cepas de Microalgas Nativas para procesos de biorremediación, bioensayos y bioproductos', que surge como respuesta a necesidades regionales en materia de investigación y desarrollo tecnológico, las cuales pretenden ser atendidas con el funcionamiento de un laboratorio acondicionado que permita el aislamiento, identificación y caracterización de especies nativas.

Con esta orientación, se siguió una metodología en cuyos aspectos más destacados se encuentra el muestreo y filtrado (35µm y 90µm); aislamiento por pipeteo y rayado en agar; el medio de cultivo óptimo resultó ser una composición de Conway modificado. Como resultado se obtuvo las siguientes especies de microalgas de agua dulce: *Clorella* sp.; *Haematococcus* sp.; *Fragilaria* sp.; *Scenedesmus* sp. (1); *Scenedesmus* sp. (2); *Clamydomonas* sp.; y *Orococcus* sp. En cuanto a especies marinas se identificaron: *Cyclotella* sp.; y *Nitzschia* sp., utilizando las claves de Crawford y col. (1990), Prescott (1970) y Brunel (1962).

Para el desarrollo de las posteriores fases es recomendable la consolidación de alianzas estratégicas con instituciones para establecer rutas de cooperación fortaleciendo los ejercicios de caracterización, cultivo y distribución de las especies identificadas.

Palabras clave:

Aislamiento de Microalgas, banco de microalgas, cepas, microalgas.

Abstract

This article constitutes an advance of the reached results in the research project entitled "Installation and Operation of a Native Microalgae strains Bank for Bioremediation, Bioassays and Bioproducts". It is a response to regional needs for research and technological development, which are intended to be serviced with the operation of a conditioned laboratory that allows the isolation, identification and characterization of native species.

With this orientation, it was kept a methodology whose highlights is the sampling and filtering (35 μm y 90 μm) was followed; isolation agar pipetting and scratch; the optimum culture medium turned out to be a composition of modified Conway. As a result the following species of freshwater microalgae were obtained: *Chlorella* sp.; *Haematococcus* sp.; *Fragilaria* sp.; *Scenedesmus* sp.(1); *Scenedesmus* sp. (2); *Clamydomonas* sp .; and *Orococcus* sp.As for marine species they were identified: *Cyclotella* sp .; and *Nitzschia* sp., using keys Crawford et al. (1990), Prescott (1970) and Brunel (1962). For the development of subsequent phases is recommended consolidating strategic alliances with institutions to establish routes of cooperation, strengthening exercises characterization, cultivation and distribution of the species identified.

Keywords:

Microalgae isolation, microalgae bank, strain, microalgae.

Introducción

En virtud de la reciente tendencia global por el uso de biotecnología con microorganismos (Chacón-Lee & González-Mariño, 2010; Gallagher, 2011; Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Kheshgi, Prince, & Marland, 2000; Williams & Laurens, 2010), se creó un proyecto para el montaje y puesta en funcionamiento del Banco de Cepas de Microalgas del Centro Internacional Náutico Fluvial y Portuario que empezó a funcionar en el primer trimestre de 2015 con el Grupo de Investigación SENA - Centro Internacional Náutico Fluvial y Portuario (CINAFLUP), su semillero SENAIN y con la financiación del Sistema de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación del SENA (SENNOVA) para atender las necesidades regionales en materia de formación, investigación y desarrollo industrial en procesos de biorremediación, bioensayos y bioproductos.

Este artículo se constituye en una presentación de avances del proyecto, se destacan los procedimientos y métodos empleados para el aislamiento de las cepas y su posterior identificación.

Al término de esta iniciativa se espera contar con la adecuación de un laboratorio de biotecnología acuática y microalgas, permita aislar e identificar diez especies nativas de microalgas marinas y de agua dulce para su propagación y adaptación al medio de cultivo, además de caracterizar su crecimiento por cuantificación celular en las diferentes fases del cultivo.

1. Marco conceptual

En términos generales, el cultivo de microalgas inicia con inóculos que son pequeños cultivos puros que se transfieren a un medio nutritivo de cultivo para que actúen como elemento

inicial de crecimiento. Cuando el pequeño cultivo alcanza el final de la fase exponencial, se procede a trabajar en condiciones semicontroladas con mayores volúmenes que se alcanzan diluyendo el inóculo con medio de cultivo (Devi, Subhash, & Mohan, 2012; Markou & Georgakakis, 2011; Provasoli, McLaughlin, & Droop, 1957).

La productividad de las microalgas está determinada principalmente por factores como pH del medio, salinidad, disponibilidad y concentración de nutrientes; intensidad y tipo de luz; densidad celular del cultivo, temperatura, y la contaminación o predación por otros organismos invasores (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006; Suali & Sarbatly, 2012).

Los medios de cultivo artificiales se usan principalmente para fines comerciales y de investigación porque brindan

resultados constantes; las principales fórmulas utilizadas van desde el Agua de Miquel que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de Schereiber, hasta fórmulas específicas para familias como la fórmula del Laboratorio Haskins de Nueva York para diatomas. Las principales formulaciones de los medios de cultivo, tanto de mantenimiento de cepas, como la producción masiva, están descritas en la literatura pero acorde con las condiciones del agua y factores medio ambientales, es necesario realizar algunos ajustes en los componentes.

2. Materiales y Métodos

En el Banco de Cepas de Microalgas Nativas del CINAFLUP, se preparan cultivos monoespecíficos y axénicos a partir de muestreo del medio natural en los cuerpos de agua seleccionados para la recolección de las especies de

agua dulce en el Embalse del Guájaro (Atlántico), y para las especies de mar de la Bahía de Cartagena.

La técnica de muestreo del fitoplancton es mediante la filtración de 50L a través de una malla de 35 micras. Posteriormente, para eliminar la mayor parte del zooplancton de la muestra se pasa por un filtro de 90 micras (unidad de longitud equivalente a milésima parte de un milímetro). Las muestras son colectadas en frascos plásticos y refrigeradas a una temperatura entre 5 a 8 grados centígrados para su transporte hasta el laboratorio de microalgas del CINAFLUP, adecuado con los materiales e instrumentación necesaria para los ejercicios de aislamiento e identificación (Figura 1).

De los métodos desarrollados y utilizados para aislar y purificar microalgas (Umebayashi, 1975) se escogieron técnicas como el aislamiento por pipeteo capilar,

que consistente en separar microalgas mayores de 10 μ mediante una pipeta construida con un tubo capilar. Con el uso del microscopio óptico se 'pescan' las células, se separan colocándose en pequeñas gotas de agua con nutrientes en portaobjetos. También se utilizó el método de rayado de placas de agar que permite transferir pequeñas gotas de plancton con una asa de siembra, extendiendo mediante la técnica microbiológica por estrías o agotamiento; después de ocho días pequeñas colonias aparecen sobre la superficie del agar y pueden transferirse por micropipeta a medios líquidos.



Figura 1. Laboratorio de aislamiento de cepas de microalgas.

Las principales formulaciones de los medios de cultivo tanto de mantenimiento de cepas como la producción masiva, están descritas pero acorde a las condiciones del agua y factores medio ambientales; es necesario

realizar algunos ajustes en los ingredientes, por este motivo se adoptó el uso del medio Conway (Walne) modificado, cuya composición se ilustra en las Tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1

Composición medio Conway modificado

Componente	Cantidad
FeCl ₃ 6H ₂ O	26 gr
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.72 gr
H ₃ BO ₃	67.2 gr
EDTA	90 gr
NaHPO ₄ 2H ₂ O	40 gr
NaNO ₃	200 gr
Na ₂ SiO	40 gr
Agua destilada	2 L
Solución de metales traza	2 ml
Solución de vitaminas	100 ml

Figura: propia

Tabla 2

Solución de metales traza

Componente	Cantidad
ZnCl ₂	2.1 gr
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 gr
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.9 gr
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2 gr
Agua destilada	100 ml

Tabla 3

Solución de metales traza

Componente	Cantidad
Decamil compuesto	210 mg
Agua destilada	100 mg

Las técnicas anteriores permiten purificar el cultivo a través de las resiembras sucesivas; periódicamente se utilizan antibióticos para eliminar otros microorganismos, generalmente de tipo bacteriano, que estén contaminando el cultivo de microalgas y así obtener cepas puras y axénicas.

Una vez se cuenta con las cepas de microalgas puras se procede con el 'Sistema de Escalamiento' para un cultivo de algas tipo 'Batch Culture', partiendo de la Caja de Petri, tubo de ensayo, fiola de 250ml hasta beaker de 1000 ml, donde el crecimiento se presenta con cinco fases de desarrollo descritas por Fogg y Thake en 1987: Fase de ajuste o adaptación, Fase exponencial, Fase de retardo o declinación, Fase estacionaria y Fase de muerte. Para la identificación taxonómica fueron empleadas las claves de Round, Crawford, y Mann (1990), Scott y Prescott (1958), y Brunel (1962) (McNeill et al., 2012).

3. Resultados y Discusión

A julio de 2015 se obtuvo el aislamiento e identificación de microalgas a nivel de género.

La colección microbiológica cuenta con las siguientes especies de microalgas:

Clorella sp.; Haematococcus sp.; Fragilaria sp. (1); Fragilaria sp. (2); Scenedesmus sp. (1); Scenedesmus sp. (2); Clamydomonas sp.; Clorococcus sp.; Cyclotella sp.; y Nitzschia sp., ocho especies de agua dulce y dos de mar respectivamente (Véase Figura 2). Cabe anotar que el 'Banco de Cepas' del CINAFLUP cuenta además con seis cepas de agua de mar donadas por el Centro de Investigaciones CENIACUA: Tetraselmis sp.;

Chaetoceros sp.; Nannocloropsis sp.; Thalasiocira sp.; Isocrysis sp.; y Oscillatoria sp.

3.1 Conclusiones o Recomendaciones

La implementación de los procedimientos reportados por la literatura respecto al aislamiento e identificación de especies de microalgas, resultaron ser exitosos en el contexto de la investigación propuesta;

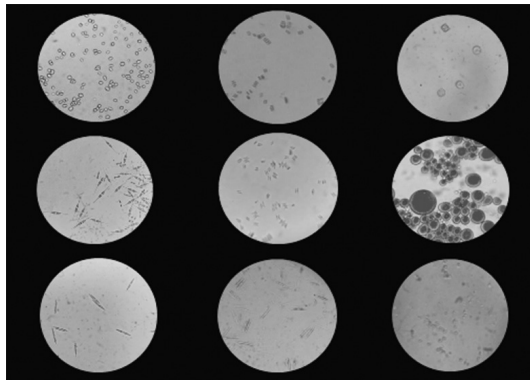


Figura 2. Especies de microalgas identificadas en laboratorio.

- | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| a) Clamydomonas sp. | d) Nitzschia sp. | g) Fragilaria sp. (1); |
| b) Scenedesmus sp. (1) | e) Scenedesmus sp. (2) | h) Fragilaria sp. (2) |
| c) Cyclotella sp. | f) Haematococcus sp. | i) Clorella sp. |

se aislaron nueve cepas en total con potencial para uso académico e industrial, en este sentido y teniendo en cuenta la fase de desarrollo en que se encuentra el proyecto, se estima un aumento en el número de especies proyectadas al término del proyecto.

Respecto a las limitaciones del mercado local para la consecución de las vitaminas B12 y B1, y la proporción de silicato de sodio, las modificaciones efectuadas al medio de cultivo Conway resultaron ser convenientes para el crecimiento de las especies hasta el momento aisladas.

Teniendo en consideración los ejercicios de caracterización y cultivo, además de las fases posteriores del proyecto, concernientes al uso de microalgas como insumo para la industria en los procesos de biorremediación y bioproductos, se recomienda la ampliación y equipamiento del laboratorio dispuesto para este proyecto,

así mismo resulta necesario establecer alianzas estratégicas con otros centros de formación e investigación.

Bibliografía

Brunel, J. (1962). *Le Phytoplancton de la baie des Chaleurs*. University of Montreal Press, Montreal.

Chacón-Lee, T. L., & González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for «healthy» foods—possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(6), 655–675.

Devi, M. P., Subhash, G. V., & Mohan, S. V. (2012). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43, 276–283.

Fogg, G. E., & Thake, B. (1987). *Algal Cultures and Phytoplankton*

- Ecology. Univ of Wisconsin Press.
- Gallagher, B. J. (2011). The economics of producing biodiesel from algae. *Renewable Energy*, 36(1), 158–162.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173.
- Kheshgi, H. S., Prince, R. C., & Marland, G. (2000). The potential of biomass fuels in the context of global climate change: focus on transportation fuels 1. *Annual Review of Energy and the Environment*, 25(1), 199–244.
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 88(10), 3389–3401.
- McNeill, J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D. (2012). *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*.
- Provasoli, L., McLaughlin, J. J. A., & Droop, M. R. (1957). The development of artificial media for marine algae. *Archiv für Mikrobiologie*, 25(4), 392–428.
- Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *The diatoms: biology & morphology of the genera*. Cambridge University Press.
- Scott, A. M., & Prescott, G. W. (1958). Some freshwater algae from Arnhem Land in the Northern Territory of Australia. Place of publication not identified.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.
- Suali, E., & Sarbatly, R. (2012).

Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316–4342.

Umebayashi, O. (1975). Practical culture of microalgae. *Culture of Marine Life Textbook for Marine Research Course*. Japan International Cooperation Agency, Government of Japan, 6, 131–144.

Williams, P. J. le B., & Laurens, L. M. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554–590.