

Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas

R. Moronta, R. Mora y E. Morales¹

¹Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Resumen

El cultivo de microalgas de interés económico en condiciones no axénicas puede ser utilizado para acuicultura y tratamiento de aguas residuales; mientras que el cultivo axénico es utilizado para la extracción de productos comerciales. Sin embargo, el comportamiento de las microalgas axénicas puede variar con respecto a las cultivadas en condiciones no axénicas. El objetivo de este estudio es evaluar la respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* en función del pH (5, 6, 7, 8 y 9), temperatura (25, 30, 37, 40 y 42°C) y salinidad (15, 25 y 35 ppm) en cultivos no axénicos y axénicos. Todos los bioensayos se realizaron con fotoperíodo 12:12h, 98 $\mu\text{mol}\cdot\text{quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 28°C. Los cultivos no axénicos con medio ALGAL por triplicado se mantuvieron en volumen de 250ml, en matraces de 500ml de capacidad. Mientras que, los cultivos axénicos por cinco réplicas se realizaron en tubos de ensayo con volumen de 15ml, en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas con medio organotrófico. En cultivos no axénicos, la microalga fue más sensible a la salinidad, temperatura y pH <5, con un crecimiento óptimo a 30°C y pH 7-8 en medio no salino. En cambio, en condiciones axénicas, la microalga fue capaz de crecer hasta 42°C, 35 ppm de salinidad, a partir de pH 3 alcanzando mayor crecimiento a pH 7-8, entre 0 y 25 ppm y a 37°C en mixotrofia. La síntesis de clorofila fue mayor en cultivos no axénicos. Estos resultados sugieren que la respuesta de *C. sorokiniana*, al pH, temperatura y salinidad puede ser modulada por la flora bacteriana asociada.

Palabras clave: *Chlorella sorokiniana*, pH, salinidad, temperatura, axénico, no axénico.

Introducción

La variación de las condiciones de cultivo, tales como el tipo y concentración de nutrientes, temperatura, pH, intensidad luminosa, fotoperíodo, régimen de cosecha de cultivos discontinuos, continuos o semicontinuos, manipulación genética, entre otros (15, 27 y 37) ha contribuido a establecer sistemas dirigidos hacia la obtención de biomasa microalgal (17 y 18). La respuesta de las microalgas al pH varía ampliamente, debido a que este factor determina la solubilidad del dióxido de carbono y de los minerales en los cultivos e influye directa o indirectamente en su metabolismo (28, 32 y 38). La temperatura no solo afecta las reacciones celulares, sino también los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, así como la solubilidad de los gases en el agua (1, 14, 24, 37, 38 y 40).

Los cultivos masivos de microalgas se obtienen típicamente de manera fotoautotrófica, bien sea por el uso de estanques abiertos y luz natural o por una variación de sistemas más intensivos. Sin embargo, se presentan alternativas de producción de biomasa microalgal, tanto en condiciones mixotróficas como heterotróficas. Es decir, cuando son capaces de asimilar fuente de carbono orgánica exhibiendo un crecimiento organotrófico (26, 27 y 35).

Los cultivos mixotróficos producen una elevada cantidad de biomasa comparada a la autotrofia y heterotrofia y ello se debe posiblemente al efecto energético de la luz y del sustrato orgá-

nico (19, 25, 28 y 36). Mientras que los cultivos heterotróficos, desde una perspectiva de ingeniería tienen ventajas sobre los sistemas fotosintéticos ya que se logra obtener proteínas, carbohidratos, lípidos, entre otros, a un menor costo, por prescindir de la iluminación (10 y 43).

Cuando las microalgas están asociadas a bacterias en la naturaleza (no axénicas), se ejerce una interacción que puede ser beneficiosa para ambos; de tal manera que la microalga es capaz de asimilar productos de la actividad bacteriana en el medio. Así mismo, la flora microbiana asociada está implicada en la regulación de parámetros fisiológicos como pH, temperatura y salinidad. En cambio, en condiciones axénicas, las microalgas no llegan a alcanzar un crecimiento óptimo, por carecer de la flora microbiana asociada; la cual le aportará factores esenciales para estimular el crecimiento (7 y 10).

En condiciones de laboratorio, las cepas de microalgas axénicas son de suma importancia en estudios bioquímicos, fisiológicos, genéticos y taxonómicos (19). Los trabajos realizados con microalgas desde el punto de vista fisiológicos son de gran interés, ya que permiten dilucidar si la microalga posee o no mecanismos fisiológicos que le permitan regular condiciones ambientales estresantes, tales como elevada salinidad, pH, temperatura, limitación de nutrientes, deshidratación, entre otros (12, 13 y 41). Es por ello que es necesario reali-

zar estudios sobre la reacción de una microalga ante factores ambientales, la cual puede variar en función de la ausencia o presencia de bacterias asociadas.

Entre las microalgas de mayor importancia se encuentra *Chlorella* por su valor económico y nutricional, tanto a nivel animal como humano. Por ejemplo, *Chlorella vulgaris* ha sido utilizada por su calidad proteica (28) e incluso presenta propiedades antitumorales (30). Actualmente, representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y además presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio (4, 5, 6, 9, 19, 21, 28, 31 y 32).

Los cultivos axénicos de microalgas de interés en biotecnología pueden ser utilizados para fines

farmacológicos y de nutrición humana. Mientras que, los cultivos no axénicos en los cuales se mantiene la flora bacteriana asociada pueden ser seleccionados para acuicultura, nutrición animal o para biofertilizantes. Sin embargo, la respuesta de las microalgas para cada condición de cultivo es susceptible de ser modificada en función de diversos parámetros de cultivos. No obstante, actualmente se tiene poca información fisiológica de cepas de *Chlorella* cultivadas tanto en condiciones axénicas como no axénicas (32). En este sentido, se reporta el efecto del pH, salinidad y de la temperatura sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella sorokiniana* en cultivos discontinuos axénicos y no axénicos y en condiciones mixotróficas y heterotróficas.

Materiales y métodos

Microalga estudiada. Se seleccionó la microalga *Chlorella sorokiniana*, procedente del Embalse de Tulé ubicado en la Costa Nor-Occidental del Lago de Maracaibo, Municipio Mara, estado Zulia, Venezuela y aislada mediante la técnica de dilución en serie en cultivo selectivo líquido y sólido. La ubicación taxonómica de la microalga se determinó mediante el uso de claves taxonómicas y estudio fisiológico y bioquímico realizado a la cepa (3, 19, 20, 21 y 44).

Descripción de *Chlorella*. Se describió la microalga *Chlorella* mediante la observación de sus células en un examen al fresco y en lámi-

nas fijadas a través del microscopio óptico. Además se observaron las características morfológicas coloniales de la microalga tanto en medio inorgánico como orgánico.

Obtención del cultivo axénico de la microalga *Chlorella*. Colonias de la microalga libres de bacterias se aislaron a partir de cultivos unialgales, mediante siembra en medio sólido inorgánico (figura 1). Las placas se incubaron a temperatura ambiente, bajo un sistema de iluminación continua a una intensidad luminosa de $98 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Posteriormente las colonias de la microalga aisladas se sembraron en medio de cultivo organotrófico (8), como control para

Chlorella sorokiniana

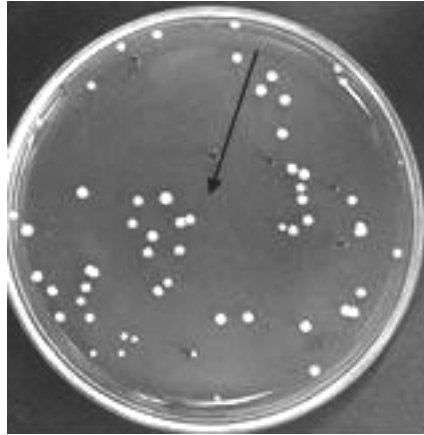


Figura 1. Aislamiento de colonias de la microalga *Chlorella sorokiniana*.

garantizar las condiciones axénicas de la microalga en cultivo líquido y sólido.

Estudios fisiológicos. Todos los cultivos se realizaron con medio comercial ALGAL con un fotoperíodo de 12:12 h, a una intensidad luminosa de $98 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 28°C y a pH inicial de 7. Los cultivos no axénicos con aireación constante, se iniciaron con un inóculo de $1 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ en un volumen de 250 ml en matraces de 500 ml de capacidad. Mientras que, los cultivos axénicos con agitación mecánica, se iniciaron por quintuplicado con $5 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ en un volumen de 15 ml en tubos con tapa de baquelita.

pH. El crecimiento y la producción de pigmentos de *C. sorokiniana*, se evaluaron a pH 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 9, tanto en cultivos axénicos como no axénicos. Los cultivos no axénicos fueron tamponados con Tris HCl a 25mM. A cada tratamiento se le ajus-

tó el pH dos veces por día, mientras que el control correspondió a cultivos sin ajuste de pH.

El pH en los cultivos axénicos se evaluó en medio de cultivo organotrófico con una intensidad luminosa de $98 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mediante la condición mixotrófica y en condiciones heterotróficas bajo oscuridad. El control correspondió a cultivos autotróficos realizados con medio inorgánico ALGAL.

Todos los cultivos se mantuvieron durante 15 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y al término del cual se determinó la densidad celular, contenido de pigmentos y el pH final. Los cultivos axénicos no fueron tamponados a fin de evitar efecto del mismo sobre las células libres de bacterias.

Salinidad. Este experimento se realizó tanto en cultivos axénicos como no axénicos y se utilizó agua de mar ajustada a las salinidades de 15, 25 y 35 ppm. El control consistió en

cultivos no salinos. A los de 15 días de iniciado el experimento se determinó el crecimiento celular y el contenido de pigmentos.

Temperatura. Los cultivos se hicieron crecer a 25, 30 y 37°C en condiciones no axénicas, y a 25, 37, 40 y 42°C en condiciones axénicas. El medio de cultivo organotrófico se utilizó en cultivos mixotróficos y heterotróficos, mientras que el control se mantuvo con medio inorgánico ALGAL y correspondió a los cultivos autotróficos.

Medios de cultivo: a) Inorgánico. Se utilizó agua destilada esterilizada mediante autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 minutos. Posteriormente, el agua se enriqueció con medio de cultivo ALGAL a una concentración equivalente a 6,0 y 8,0 mM de NaNO_3 (14). El medio sólido se realizó con agar-agar 1,5% suplementado con nutrientes ALGAL. **b) Orgánico.** Se preparó medio líquido en tubos con tapa de baquelita de capacidad 20 ml y medio sólido en placas de Petri. Luego de esterilizado el me-

dio organotrófico conformado por extracto de levadura, peptona y glucosa a 5,0; 1,5 y 2,5 g.L^{-1} respectivamente, se procedió a adicionarle medio ALGAL a una concentración equivalente a 8,0 mM de NaNO_3 (8).

Evaluación de la biomasa:

A) Recuento celular. El crecimiento se calculó mediante el recuento de células con un microscopio óptico binocular en cámara de Neubauer mejorada de 0,1 mm de profundidad (15).

B) Determinación de pigmentos. La clorofila *a*, *b* y los carotenoides totales se determinaron mediante extracción metabólica. La concentración expresada en pg.cel^{-1} fue determinada a partir de la ecuación propuesta por Wellburn (42).

Análisis estadístico. El crecimiento y la producción de pigmentos de la microalga en los cultivos no axénicos y axénicos se analizaron a través de la prueba de Scheffé mediante el programa estadístico Stat Most for Window versión 3.0 (Stat Most Corporation, 1995).

Resultados y discusión

Característica morfológica de *Chlorella*. Es una microalga unicelular inmóvil, sin constricción en la parte media de la célula, de forma esférica, con pared celular lisa y con un cloroplasto en forma de copa (4, 5 y 22). Las colonias de *Chlorella* a veces están rodeadas de mucílago y la modalidad de la agregación de la célula es característica de las especies lo que facilita su identificación. Aproximadamente, el 90% forman parte del plancton o del

bentos de aguas dulces (16).

pH. El crecimiento de la microalga (densidad celular) tanto en cultivos axénicos como no axénicos, se incrementó con el pH. Para los cultivos no axénicos, se obtuvieron los mayores valores a pH 8 y 9, con $344,68 \pm 33,45$ y $352,34 \pm 51,47 \times 10^6$ cel.ml^{-1} , respectivamente (cuadro 1). Siendo el pH 1 y 3 letal para la microalga. Por el contrario, cuando el pH se incrementó a 5 comenzó el cre-

Cuadro 1. Densidad celular ($\times 10^6$ cel.ml⁻¹) y contenido de pigmentos (pg.cel⁻¹) de la microalga *Chlorella sorokiniana* en función del pH en condiciones no axénicas.

pH	Densidad celular	Clorofila	Carotenoides	Chlo/caro
Control	168,27± 1,43	1,58±0,04	0,37±0,04	4,17
5,0	0,22± 0,01	ND	ND	ND
6,0	154,52± 1,11	0,33±0,01	0,06±0,01	5,35
7,0	192,46± 6,46	1,59±0,01	0,27±0,01	5,88
8,0	344,68±33,45	1,60±0,01	0,17±0,01	9,41
9,0	352,34±51,47	1,40±0,05	0,19±0,02	7,37

Cultivos realizados en condiciones axénicas. Control: no tamponado y no ajustado, con pH final de 9. Chlo/Caro: relación clorofila /carotenoides. Cultivos a pH 5,0 con un porcentaje de inhibición del 81,79% en relación al cultivo control. ND: no determinado por baja densidad celular.

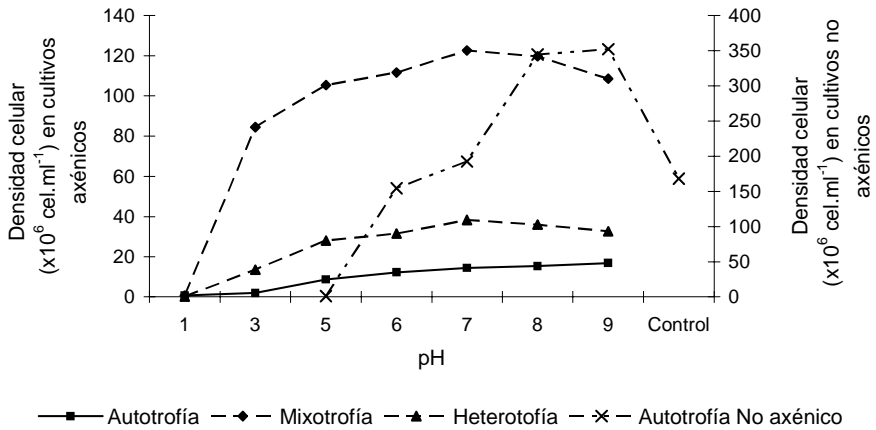
cimiento de la microalga, pero aún con una inhibición del 81,79% respecto al control.

En condiciones axénicas, la microalga también incrementó su crecimiento en función del pH, lo cual indica que su densidad celular se optimiza en el rango alcalino, pero a diferencia de los cultivos no axénicos presentó tolerancia a pH 1 y 3, aunque el crecimiento se mantuvo inhibido a pH 1 la microalga fue capaz de crecer a partir de pH 3, en cultivos autotróficos, heterotróficos y mixotróficos con un incremento de 4; 77,5 y 169 veces respectivamente, en relación a la densidad celular ($0,5 \times 10^6$ cel.ml⁻¹) con la que se inició el cultivo (figura 2). Los cultivos mixotróficos y heterotróficos con un pH final de 7,8 produjeron los mayores valores de densidad celular con $122,64 \pm 1,33$ y $109,43 \pm 1,48 \times 10^6$ cel.ml⁻¹. A diferencia de éste último, en los cultivos autotróficos se encontró el valor más elevado de crecimiento celular a pH

final de 8,2 y 9,6 con $15,29 \pm 0,03$ y $16,87 \pm 0,04 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ respectivamente.

Así mismo, el crecimiento de la microalga fue estimulado en función de la presencia de sustratos orgánicos en el medio de cultivo (autotrofia < heterotrofia < mixotrofia) (figura 2). Es decir, el medio de cultivo organotrófico con iluminación fue el que indujo un mayor crecimiento de la microalga *Chlorella*. Diversos reportes indican que la condición mixotrófica de crecimiento contribuye a una mayor producción de biomasa en diversas microalgas, con respecto a la heterotrofia y autotrofia (10, 11, 23, 33 y 38).

Estos resultados indicaron también que, el medio de cultivo además del pH, ejercieron influencia sobre el crecimiento. En el medio inorgánico, la mayor densidad celular se alcanzó a pH final de 9,6, mientras que en medio organotrófico con iluminación y bajo oscuridad, se produjo un pH fi-



*Cultivo control con pH final de 8.9

Figura 2. Influencia del pH sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel.ml⁻¹) de la microalga *Chlorella sorokiniana* en cultivos axénicos y no axénicos.

nal de 7,8 (figura 2). Es posible, que la carga neta de ciertos sustratos orgánicos en el medio de cultivo, varíe en función del pH, lo cual puede influir en el crecimiento.

Por otra parte, el hecho de que esta cepa de *Chlorella* fuese capaz de tolerar un medio de cultivo en condiciones axénicas resultó de interés fisiológico. Sin embargo, en su hábitat natural, caracterizado por su asociación con bacterias, la microalga no creció y perdió viabilidad a pH inferiores a 6. Esto significa que en condiciones axénicas presentó mecanismos fisiológicos inherentes exclusivamente a la microalga, capaces de regular condiciones ambientales muy ácidas, las cuales muchos microorganismos fotosintéticos no son capaces de tolerar, aún cuando están libres de bacterias. En este sentido, se ha reportado que a las especies *C. ellipsoidea* y *C. saccharophila* crecen

satisfactoriamente a pH entre 2 y 3 y que esta propiedad constituye además una característica taxonómica útil para separar especies dentro del género (21).

La producción de clorofila en condiciones no axénicas fue superior en el control y en los cultivos a pH 7 y 8, con diferencia significativa ($P < 0,05$). En cambio, en condiciones axénicas, el pH no ejerció influencia en el contenido de clorofila, debido a que entre pH 3 y 9 se encontraron valores similares, entre 0,37 y 0,45 $\mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1}$ (figura 3). Sin embargo, este pigmento se produjo más en condiciones no axénicas con diferencia significativa ($P < 0,05$), con valores de 3,5; 5,3 y de 5,7 veces más superiores a los obtenidos en los cultivos axénicos mixotróficos, heterotróficos y autotróficos, respectivamente. Estos resultados se reflejan de igual manera por las elevadas relaciones clorofila/carotenoides registra-

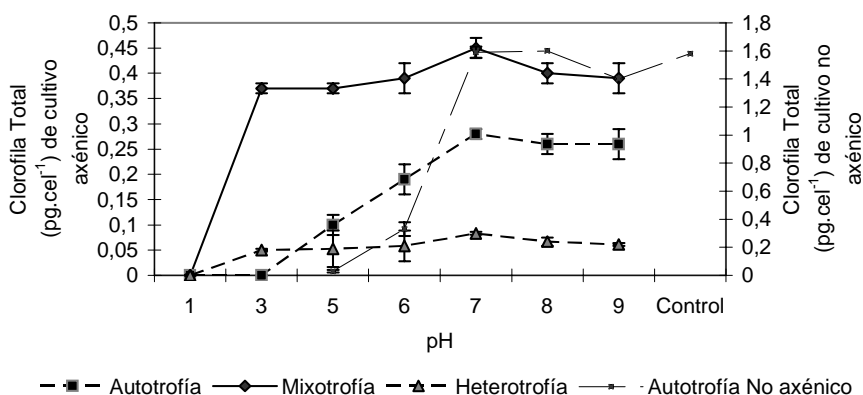


Figura 3. Influencia del pH sobre el contenido de clorofila (pg.cel^{-1}) de la microalga *Chlorella sorokiniana* en cultivo axénicos y no axénicos.

das en los cultivos no axénicos. Es decir, la síntesis de clorofila fue estimulada en la medida que el pH aumentó, mientras que la concentración de carotenoides presenta tendencia a disminuir (cuadros 1 y 2).

Para el caso de los carotenoides se alcanzaron los valores más elevados a pH 7 independientemente de la

condición axénica; aunque sin diferencia significativa entre ambos tipos de cultivos (cuadros 1 y 2).

Los resultados indican que la mayor producción de clorofila en cultivos no axénicos posiblemente estuvo relacionada con el aporte de nutrientes ricos en fuentes nitrogenadas y de minerales que pu-

Cuadro 2. Relación clorofila/carotenoides en cultivos mixotróficos y heterotróficos de la microalga *Chlorella sorokiniana* en función del pH, en condiciones axénicas.

pH		Relación clorofila/carotenoides		
Inicial	Final	Autotrofia	Mixotrofia	Heterotrofia
1	1,1	ND	ND	ND
3	3,4	ND	1,61	1,05
5	5,8	1,25	1,85	1,06
6	6,4	1,36	1,95	1,10
7	7,8	1,47	1,96	1,11
8	8,2	1,53	2,05	1,41
9	9,6	1,53	1,95	1,46

ND: no determinado por baja densidad celular.

dieron ser aportados por las bacterias asociadas a la microalga, a pesar de que el medio organotrófico en el cual se hizo crecer la microalga libre de bacteria, estuvo muy enriquecido con diversas fuentes nitrogenadas.

Salinidad. Las densidades celulares en fase estacionaria más elevadas se alcanzaron en medio no salino con $59,18 \pm 3,63 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ para los cultivos no axénicos y de $109,11 \pm 1,07$ y $89,70 \pm 1,0 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ para los cultivos mixotróficos y heterotróficos con diferencias significativa ($P < 0,05$) (figura 4). Sin embargo, el incremento de la salinidad produjo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la microalga. A 25 y 35 ppm, la densidad celular disminuyó en un 97,9% y en un 98,5% respectivamente, en cultivos no axénicos. En cultivos mixotróficos, la microalga creció a todas las salinidades, con un descenso hasta del 61,8% cuando se cultivó a 40 ppm. En cultivos heterotróficos también creció a todas las salinidades, hasta crecer sólo 1,3% respecto a los cultivos no salinos.

Estos resultados indican que el

efecto de la salinidad fue más drástico en cultivos axénicos autotróficos y heterotróficos que en los no axénicos. Sin embargo, cuando la microalga creció en cultivos mixotróficos fue capaz de mantener elevadas densidades celulares hasta salinidades de 25 ppm. En cambio, a 35 ppm llega a alcanzar el 62,3% del crecimiento obtenido en ausencia de salinidad (figura 4). Es importante indicar, que el medio de cultivo organotrófico utilizado favoreció el crecimiento de la microalga y al parecer, en presencia de iluminación, la microalga toleró más la salinidad. En este sentido, la salinidad ejerció un efecto más drástico bajo oscuridad, siendo la relación de crecimiento mixotrofia/heterotrofia 30 veces mayor. Es decir, en cultivos mixotróficos se produjo un aumento de la inhibición hasta 38,3%; mientras que, en los heterotróficos llegó a alcanzar hasta 98%.

Asimismo, la salinidad produjo un incremento del contenido celular de clorofila y carotenoides totales, en condiciones no axénicas. Los valores más altos se alcanzaron a 25 y 35 ppm con relación a los cultivos no salinos

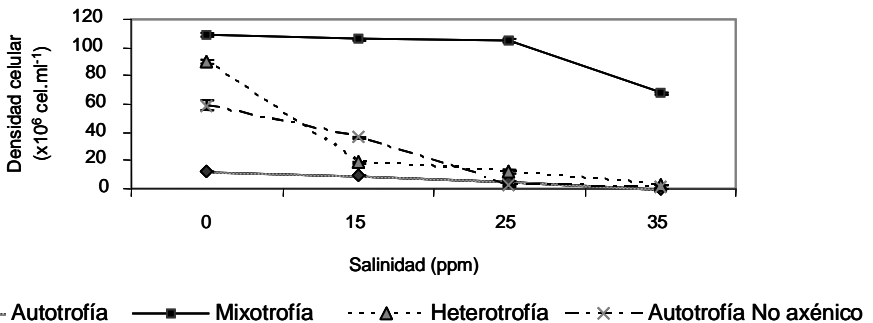


Figura 4. Influencia de la salinidad (ppm) sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel.ml⁻¹) de la microalga *Chlorella sorokiniana* en cultivos axénicos y no axénicos.

(figura 5). Probablemente la mayor talla celular producto de una baja velocidad de crecimiento de la microalga con la salinidad, estuvo relacionada con la acumulación de metabolitos y por lo tanto, el contenido celular de clorofila y carotenoides fue superior a los encontrados en las células no expuestas a medio salino. La microalga acumuló 20 y 24 veces más clorofila y carotenoides en medio dulceacuícola, respecto a las cultivadas a 35 ppm en mixotrofia. Sin embargo, cuando creció en oscuridad sólo produjo 1,8 y 1,6 veces más clorofila y carotenoides respectivamente, comparadas con las mantenidas a 35 ppm (figura 5).

El análisis estadístico demostró que hubo diferencia significativa ($P < 0,05$) en cuanto a clorofila, entre los cultivos a 35 ppm y los controles (cuadro 4). Para los carotenoides también se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el control y los cultivos a 15 y 25 ppm. Esto se debió

quizás a la presencia de sales de Mg, Ca, SO_4 y Fe en el agua de mar, con lo cual se logró una mayor disponibilidad de nutrientes para mejorar la producción de biomasa y de clorofila en microalgas como *Chlorella*.

En ambas condiciones de cultivos, la relación clorofila/carotenoides disminuyó con la salinidad (cuadro 3). El incremento de la salinidad estimuló la síntesis de carotenoides por efecto de estrés salino, de tal manera que aumentó la proporción de moléculas de estos pigmentos en relación a las de clorofila.

Aunque estos resultados sugirieron que la microalga fue sensible a la salinidad en su hábitat natural, en condiciones axénicas fue capaz de mantener un elevado crecimiento en un medio de cultivo enriquecido y hasta salinidades de 35 ppm. Se desconoce la razón por la cual las células toleran más la salinidad bajo iluminación que en oscuridad cuando crecieron en medio organotrófico.

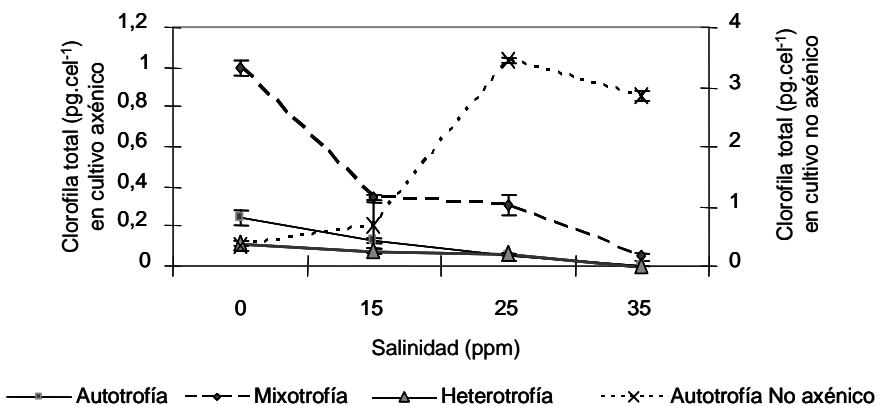


Figura 5. Influencia de la salinidad (ppm) sobre la producción de clorofila ($pg.cel^{-1}$) en cultivos axénicos y no axénicos de la microalga *Chlorella sorokiniana*.

Cuadro 3. Relación clorofila/carotenoides en cultivos axénicos y no axénicos de la microalga *Chlorella sorokiniana* en función de la salinidad.

Relación Clorofila total/Carotenoides				
Salinidad (ppm)	Autotrofia	Mixotrofia	Heterotrofia	No axénico autotrófico
0	1,60	1,41	1,44	4,71
15	1,30	1,43	1,40	5,30
25	1,25	1,11	1,29	3,05
35	NC	1,00	NC	1,04

NC: No hubo crecimiento

Temperatura. En cultivos no axénicos la microalga creció a todas las temperaturas estudiadas, con un óptimo a 30°C. Sin embargo, a 37°C el crecimiento disminuyó en un 25,4% en relación a la temperatura óptima (figura 6). Las elevadas densidades celulares producidas entre 25 y 35°C, indicaron la adaptación de esta microalga a cuerpos de aguas tropicales. Por lo tanto, esta cepa de

Chlorella puede desarrollarse eficientemente en cultivos abiertos en nuestras zonas tropicales (26).

En cultivos axénicos, *Chlorella* manifestó un excelente crecimiento entre 25 y 42°C, con un óptimo a 37°C. En condiciones mixotróficas se alcanzó el mayor crecimiento a 37°C, el cual fue de 2 y 15 veces superior al obtenido en cultivos heterotróficos y autotróficos, respectivamente. De

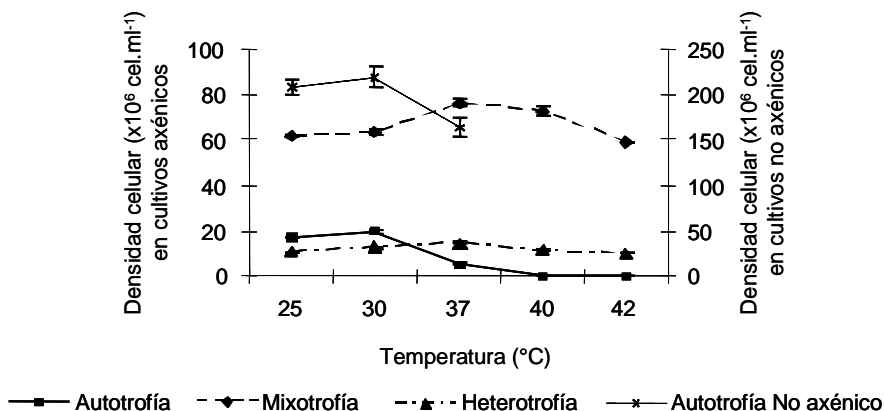


Figura 6. Influencia de la temperatura en el crecimiento. (x10⁶ cel.ml⁻¹) de la microalga *Chlorella sorokiniana*, en condición axénica y no axénica.

igual manera, a 40°C y 42°C, la microalga exhibió un crecimiento elevado con $72,62 \pm 0,75$ y $58,79 \pm 0,04 \times 10^6$ cel. ml^{-1} , mientras que en cultivos autotróficos la microalga sólo toleró temperaturas hasta de 37°C, aunque el crecimiento fue siempre menor en relación a mixotrofia y heterotrofia (figura 6). Esto fue debido a que las microalgas en cultivos no axénicos, requirieron de nutrientes adicionales derivados de la flora bacteriana asociada. En este sentido, que su crecimiento no fue estimulado cuando estuvo libre de bacterias.

Estos resultados encontrados en relación a la temperatura coinciden con los reportados en cultivos axénicos de la microalga *Tetraselmis suecica*, donde también se produjo un bajo crecimiento en condiciones autotróficas, en ausencia de sustancias orgánicas (18).

Los resultados indicaron que esta cepa de *Chlorella* fue capaz de crecer a elevadas temperaturas entre 37 y 42°C. Esta característica, además de la tolerancia a pH ácidos y elevada salinidad, también permitió ubicar a esta cepa en la especie *C. Sorokiniana* (17, 19, 38 y 39). En cultivos no axénicos de *Chlorella vulgaris* se ha reportado una temperatura óptima para su crecimiento de 32,4°C (20 y

30). Sin embargo, el comportamiento de las microalgas en condiciones axénicas y unialgales en relación a la temperatura pueden variar, ya que en cultivos no axénicos de la especie de *Chlorella* estudiada, se obtuvo una temperatura óptima de 30°C (resultados no reportados).

Es importante destacar que la elevada productividad de ciertas microalgas en condiciones mixotróficas está relacionada con la utilización simultánea y eficiente de compuestos orgánicos y de CO₂ como fuente de carbono, y de luz como fuente de energía, de tal manera que la producción de biomasa fue incrementada respecto a cultivos heterotróficos o autotróficos (6 y 34).

Los cultivos axénicos de microalgas constituyen los de mayor rigidez científica; puesto que aportan resultados directos producto de diversos factores ambientales sobre su crecimiento, fisiología o bioquímica. Es así como, estos cultivos son necesarios para estudios taxonómicos (38), remoción de metales (2), biotransformación (29). En este caso, *Chlorella sorokiniana* en condiciones axénicas presentó características diferenciales con respecto a su comportamiento en presencia de su flora bacteriana asociada.

Conclusiones

La respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura, varió en función de la presencia o ausencia de su flora bacteriana acompañante. En condiciones no axénicas sólo fue capaz de crecer satisfactoriamente a pH

entre 6 y 9, optimizar su densidad celular a 30°C y crecer en ausencia de salinidad.

En condiciones axénicas cambió su respuesta de tolerancia a pH ácidos; a temperaturas de hasta 42°C y de salinidades de 25 ppm.

Este comportamiento sugiere que la respuesta fisiológica de la microalga ante el ambiente natural, fue modificada cuando eximió la relación con sus bacterias asociadas. Además, la mixotrofia demostró ser la condición más adecuada que favoreció el crecimiento de la microalga frente a cambios ambientales.

Por lo tanto, esta microalga autóctona, bajo condiciones axénicas presenta un gran potencial

biotecnológico por su capacidad de crecimiento en cultivos mixotróficos y heterotróficos en presencia de nutrientes orgánicos y a un intervalo de pH muy amplio. Esto puede servir como alternativa a la condición autotrófica de crecimiento para la producción de biomasa a elevadas temperaturas, con lo cual puede inducirse la producción de enzimas, de proteínas o de compuestos con actividad biológica con fines farmacológicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al FONACIT por el apoyo financiero a

través del proyecto S1-2000000786.

Literatura citada

1. Abalde, J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidad de la Coruña. España. 210 p.
2. Akhtar, N., A. Saeed y M. Iqbal. 2003. *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrica*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. Bioresource Technology, 88: 163-165.
3. APHA. 1995. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater. 27th edition. American Public Health Association, AWWA, WPCF. Washington.
4. Borowitzka, M. 1986. Microalgae as source of chemicals, Microbiol. Sci. 3: 372- 375.
5. Borowitzka, M. y I. Borowitzka. 1989. Microalgal Biotechnology. Eds. Cambridge University Press España.
6. Brown, M., S. Jeffrey y C. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature Review. C. Siro Marine Laboratories, Report, 205 p.
7. Cañizarez, R. y C. Ontiveros. 1993. Comportamiento cinético de un cultivo mixto de la microalga *Tetraselmis chuii* y dos bacterias. Revista de Investigaciones Marinas. 14: 86-91.
8. Cid, A., J. Abalde y C. Herrero. 1992. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae). Journal of Applied Phycology. 4: 31-37.
9. Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. p.421-454. In: Richmond, A. (ed). Handbook of microalga mass culture. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida.
10. Day, J., A. Edwards y G. Rodgers. 1991. Development of an industrial-scale process for the heterotrophic production of a microalgal mollusc feed. Bioresource Technology. 38: 245-249.

11. Endo, H., H. Sansawa, y K. Nakajima. 1.977. Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration. *Plant & Cell Physiol.* 18: 199-205.
12. Fábregas, J., J. Abalde, C. Herrero y B. Cabezas. 1984. Growth, Chlorophyll *a* and Protein of the Marine Microalgae *Isochrysis galbana*. Parque in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture.* 50: 1-11.
13. Fábregas, J., J. Abalde, C. Herrero y B. Cabezas. 1985. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* Parque in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture.* 49: 231-244.
14. Fábregas, J., J. Abalde y C. Herrero. 1.989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquacul-ture.* 83: 289-304.
15. Fábregas, J., M. Patiño, E. Morales, B. Cordero y A. Otero. 1996. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuos cultures: Applied Environ. Microbiol. 62: 266-268.
16. Fogg, G. 1977. ALGAL cultures and phytoplankton ecology. Second Edition. The University of Wisconsin Press. 126 p.
17. Goldman, J. 1980. Physiological aspects in ALGAL mass culture. In: G. Shelefand C., Soeder (eds) *Algae Biomass: Production and use.* 343-360 p.
18. Herrero, C. y J. Fábregas. 1984. Cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* con diferentes fuentes de carbonato orgánico. *Acta Científica Compostelana.* 11: 301-306.
19. Huss, V., C. Frank, E. Hartmann, M. Hirmer, A. Kloboucek, B. Seidel, P. Wenzeler y E. Kessler. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *J. Phycol.* 35: 587-598.
20. Infante, A. 1988. El Plancton de las aguas continentales. Secretaría General de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington (USA). 130 p.
21. Kessler, E. y V. Huss, 1.992. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the university of texas at austin. *J. Phycol.* 28: 550-553.
22. Laing, I. y F. Ayala. 1990. Introduction to Applied Phycology (Ed. Akatsuka) Volumen 1, SPB Academic Publishing Bv, The Hague. 447-477 p.
23. Laliberté, G. y J. de la Noue. 1.993. Auto-hetero-, and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* on acetate. *J. Phycol.* 29: 612-620.
24. Lee, Y., H. Tam y C. HEW. 1985. The effect of growth temperature on the bionergetics of photosynthesis algal culture. *Biotechnology. Bioengng.* 27: 555-561.
25. Lee, H., S. Lee y B. Park. 1.989. The estimation of algal yield parameters associated with mixotrophic and photoheterotrophic growth under batch cultivation. *Biomass* 18: 153-160.
26. Mayo, A. 1.997. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. *Water Environment Research.* 69 (1): 64-72.
27. Molina, E., J. Sánchez, F. Garcia, J. Fernández, F. Ación y J. Urda. 1995. Biomass and cicosapentacnoic acid productivities from an outdoor batch culture of

- Phaeodactylum tricornutum* in an airlift tubular photobioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnology. 42: 658-663.
28. Morris, H., M. Quintana, A. Almarales y L. Hernández. 1999. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. Rev. Cubana Aliment. Nutr., 13(2): 123-128.
 29. Murray, L., A. Raab y J. Feldmann. 2003. Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*. Applied Organometallic Chemistry, 17: 669-674.
 30. Noda, K., N. Ohno, K. Tanaka y Y. Shoyama. 1996. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. Planta Médica. 423-426.
 31. Oh- Hama, T. y S. Miyachi. 1988. *Chlorella*. In: Micro-algal Biotechnology. Borowizka, M.A. & Borowizka, L. J. (eds.). Cambridge University Press. Cambridge. 3-26 p.
 32. Ortega, J., R. Moronta y E. Morales. 2004. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. CIENCIA 12(1): 25-31.
 33. Prosperi, C., L. Boluda, C. Luna y E. Fernández. 1992. Environmental factors affecting in vitro nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from rice-fields. J. Appl. Phycol. 4: 197-204.
 34. Raven, J. 1985. The CO₂ concentrating mechanism. In: W. J. Lucas, J.A. Barry, (Eds), Inorganic carbon uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms. American Society of Plant Physiologists. Rockville, M.D. 67-82 p.
 35. Richmond, A. 1986. Cell reponse to environmental factors. In: Richmond, A (Ed), Handbok of Microalgal Mass Culture. CRC Press Inc. Boca Raton. 69-99 p.
 36. Romero, T. y H. Echeverría. 1999. Grado de pureza del extracto clorofílico obtenido de *Chlorella* sp. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 33: 15-26.
 37. Roth, P. y S. Buerger. 1987. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in homocontinuous cultivation in chemostat. Acta Biothechnology. 7: 17-21.
 38. Skoda, B. 1997. Contributions to the biochemical taxonomy of the genus *Chlorella* Beijerinck s. l. – pigment composition. Algological Studies, 87: 109-136.
 39. Tam, N. y Y. Wong. 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media: Bioresource Technology. 57: 45-50.
 40. Terlizzi, D. y P. Karlandere. 1980. Growth of a cocoid nanoplankter (Eustigmatophyceae) from the Chesapeake Bay as a influenced by light, temperature, salinity and nitrogen source in factorial combination. J. Phycol. 16: 364-368.
 41. Thompson, P., M. Guo y P. Harrison. 1993. Effects of variation in temperature. On the biochemical composition of eight species of marina phytoplankton. J. Phycol. 28: 481.
 42. Wellburn, A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents wiyh spectrophotometers of different resolution. J. Plant Physiol. 144: 307-313.
 43. Yang, C., Q. Hua y K. Shimizú. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. Biochemical Engineering Journal. 6: 87-102.
 44. Yacubson, S. 1985. Algas del Río Tucuco y ambientes acuáticos de sus alrededores (Estado Zulia, Venezuela). Bol. Centro Inv. Biol. 16: 19-95.