

**Efecto del uso de distintas
concentraciones de cloro en la calidad inicial
del agua de para el cultivo de la microalga
*Nannochloropsis oculata***

Juan José Boccanfuso

Trabajo Final para optar el Título de "Técnico en Acuicultura y Procesamiento Pesquero" dictado en la Universidad Tecnológica Nacional

Lugar de realización de la Tesis : Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero- Mar del Plata

Dirigido por: Lic. Andrea V. López- Investigadora INIDEP

AÑO 2010

Efecto del uso de distintas concentraciones de cloro en la calidad inicial del agua de para el cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata*

Juan José Boccanfuso

Fundamento

La calidad del agua de mar inicial es de fundamental importancia si se quiere obtener un cultivo de microalgas en buen estado fisiológico sobre todo si dichas algas se quieren utilizar posteriormente con fines alimenticios o para una producción masiva (Coll Morales, 1983) .- Un cultivo que se inicia con agua de mar sin ser tratada previamente con algún método de desinfección (cloración, U.V., ozono, etc.) constituye una fuente no deseada de desarrollo para todo tipo de microorganismos oportunistas, tales como bacterias, protozoos etc.,) que van a crecer en ese medio enriquecido con nutrientes e inhibirán o dificultarán el desarrollo de la especie de microalga objetivo que se desea producir (Nicolas *et al*, 2004)-

La cloración es uno de los métodos más eficaces y prácticos para la desinfección del agua de mar, sobre todo cuando se trata de grandes volúmenes(Blanco *et al*, 1989; Coll Moraes, 1983).- La dosis de cloro empleada depende del origen del agua de mar, en general se utiliza entre 10 – 20 ppm de cloro comercial de 55 g/litro, los cuales luego de actuar durante un tiempo mínimo de dos horas a un máximo de 24 horas, se declora con tiosulfato de sodio (López *et al*, 2008). De esta manera se logra la neutralización del cloro que pueda quedar en el agua evitando que el mismo pueda afectar a los cultivos de microalgas.-

En el presente ensayo, se pretenden evaluar dos aspectos: -si el uso de cuatro concentraciones de cloro para desinfectar el agua de mar (5, 10, 50 y 100 ppm), con su correspondiente neutralización, puede interferir en la calidad del agua inicial de los cultivos de microalgas afectando el crecimiento microalgal en el tiempo (0, 5, 10 y 15 días de cultivo) y -determinar que concentración de cloro es más efectiva para eliminar las bacterias presentes en el agua de mar sin que afecte el desarrollo del cultivo.-

Materiales y Métodos

La presente experiencia se realizó en las instalaciones de la Estación Experimental de Maricultura (INIDEP).

Se trabajó con la especie de microalga marina *Nannochloropsis oculata* cepa CCMP 525. La misma fue adquirida en el Guillard National Center of Culture of Marine Phytoplankton (USA) en el año 2005 y desde entonces, mantenida en la Estación Experimental de Maricultura (INIDEP) donde se produce en forma masiva desde el año 2000.- El agua de mar para esta experiencia (un bidón de 5 litros, sin tratamiento alguno y salinidad de 33 ups) fue traída de la Universidad Tecnológica Nacional sede Puerto. El agua provino de una toma de agua de mar que tiene la Universidad en la Escuela de Pesca., y que sólo es sometida a un proceso de filtración y posterior decantación. Luego, para ser utilizada para cultivos masivos de microalgas, ésta es desinfectada con diferentes concentraciones de cloro según la época del año.

A partir del agua de mar , se procedió a realizar el proceso de desinfección utilizando hipoclorito de sodio comercial de 55 g/l. Para ello, se utilizaron 5 vasos de precipitado

de vidrio de 500 ml. A cada uno de ellos se le agregaron 400 ml de agua de mar y luego fueron clorados con las siguientes concentraciones:

Tratamiento	Dosis ppm ó g/l	Dosis de Cloro agregada (ml)	Tiosulfato de sodio (gramos)
A	0	-	-
B	5	0.036	0.00198
C	10	0.072	0.00396
D	50	0.36	0.0198
E	100	0.727	0.039

El volumen de cloro agregado fue medido con una pipeta automática graduada (Nichiryo-Nichipet EX). Todos los recipientes (excepto el del tratamiento A) fueron clorados al mismo tiempo.

Luego de haber transcurrido 24 horas de cloración se les añadió el tiosulfato de sodio correspondiente para cada tratamiento con el fin de neutralizar el cloro restante y mediante una piedra difusora se les suministró aireación fuerte por espacio de dos horas. La cantidad de tiosulfato empleada en cada recipiente fue pesada con una balanza analítica *Adventurer-Ohaus*- Precisión 0.001 g.

Preparación de la experiencia

Un total de 15 erlenmeyers de 250 ml de capacidad (tres para cada uno de los tratamientos) fueron llenados con 100 ml de agua enriquecida con medio de cultivo *Conwy* (Walne, 1974) (tabla 1).

Para sembrar cada uno de los Erlenmeyers se utilizó una alícuota de 1.3 ml proveniente de un cultivo madre de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* (concentración: 170×10^6 cel.*ml⁻¹). De manera tal que todos los recipientes iniciaron con una concentración entre $1-2 \times 10^4$ cel.*ml⁻¹.

Con una salinidad inicial de 33 ups, los 15 recipientes fueron incubados a una temperatura de 20°C e iluminación continua (3000 luxes) en una cámara de cultivo *EYELA Multi Thermo Incubator, modelo MTI-202*. (Foto 1)

Para observar el crecimiento celular, se realizaron conteos diarios (todos a la misma hora) de la cantidad de células/ml de los 15 erlenmeyers para lo cual se empleó un microscopio óptico y un hematocitómetro o Cámara de *Neubauer* (Fig.1). Se tomó una pequeña alícuota del recipiente con una pipeta *Pasteur*, previamente lavada y esterilizada en estufa a 90°C durante 12 horas, se cargó la cámara y se contaron 4 extremos de la cuadrícula A, B, C y D (figura 3). Se dividió por cuatro y se multiplicó el resultado por 10.000. El valor obtenido se expresó en número de células algales por mililitro (cel.*10⁴/ml).

Durante los 15 días de duración de la experiencia, cada Erlenmeyer fué agitado manualmente dos veces al día (9 am y 16 pm). La agitación es necesaria para evitar sedimentación ya que estas microalgas no poseen flagelo, así como la difusión efectiva de los nutrientes y el intercambio gaseoso con el ambiente.

Todos los recipientes dentro de la cámara de incubación fueron alternados posicionalmente a diario para minimizar los efectos de la diferencia de intensidad

lumínica que puedan afectar el crecimiento del alga y generar desigualdad entre tratamientos.

Fig. 1- Esquema de la cámara de Neubauer utilizada para los conteos celulares.-

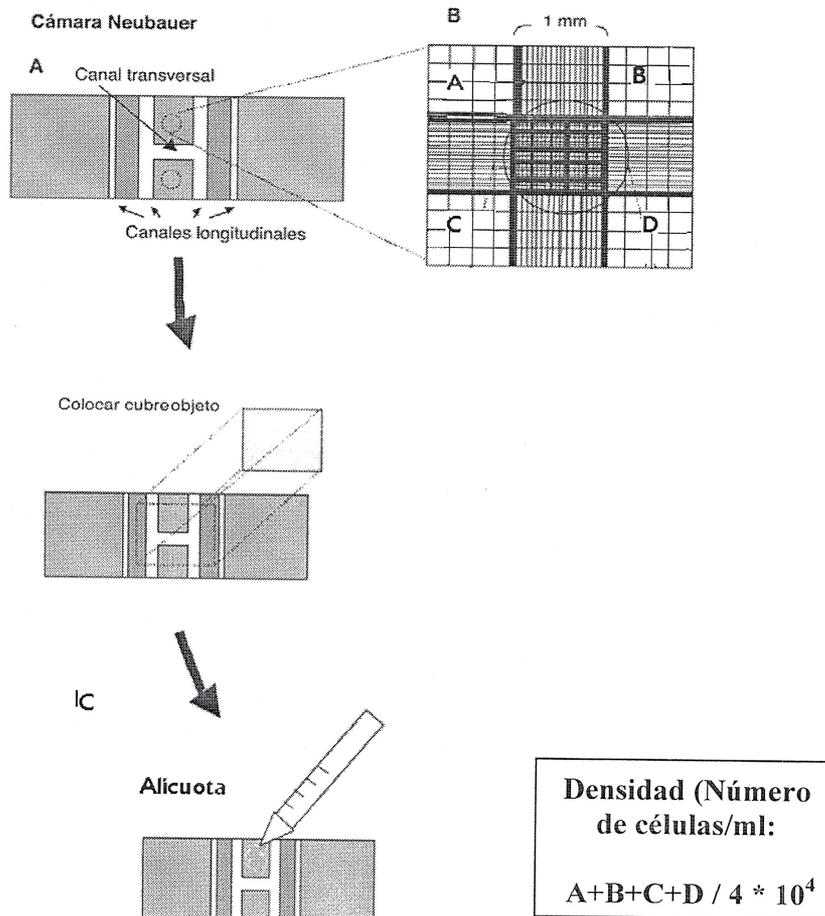


Tabla 1.- Medio de cultivo *Conwy*

Nitrato de sodio	100 g.
Na ₂ Edta	45 g.
Acido bórico	33.6 g.
Fosfato de sodio	20 g.
Cloruro férrico	0.8 g.
Cloruro de manganeso	0.4 g.
Solución de metales	1 ml
Mezcla de vitaminas	100 ml
Agua destilada	hasta completar 1000 ml

Solución de metales Traza

Cloruro de Zinc	2.1 g
Cloruro de Cobalto	2.1 g
Molibdato de Amonio	2.1 g
Sulfato de Cobre	2.0 g
Agua destilada	100 ml

Mezcla de Vitaminas

Vitamina B ₁	20 mg
Vitamina B ₁₂	10 mg
Agua destilada	200 ml

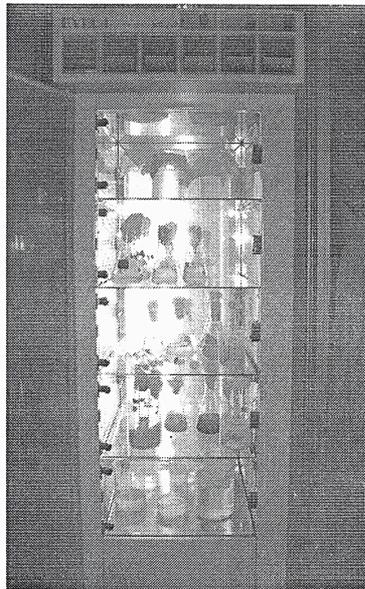


Foto 1.- Cámara de incubación utilizada para mantener los erlenmeyers a temperatura constante de 20° C e iluminación 3000 luxes.-

Bacteriología . Para observar el crecimiento bacteriológico se realizaron recuentos de bacterias heterótrofas mesófilas totales (RHT). Heterótrofas es una clasificación de las bacterias de acuerdo al tipo de nutrición, pudiendo ser , autótrofas o heterótrofas . Autótrofas : capaces de utilizar la luz como única fuente de energía y el dióxido de carbono como única fuente de carbono para la biosíntesis; las heterótrofas son incapaces de utilizar la luz como fuente de energía y el dióxido de carbono para la biosíntesis, por eso utilizan moléculas orgánicas (tales como azúcares, aminoácidos o ácidos grasos, como fuente de carbono y energía) . Mesófilas es una clasificación de las bacterias de acuerdo a la temperatura de crecimiento, pudiendo ser psicrófilas(0-15°C), mesófilas (20-35°C) y termófilas (más de 40°C).

Los recuentos de bacterias fueron realizados al tiempo 0, 5, 10 y 15 días de cultivo. Para observar el desarrollo de las colonias (UFC: unidades formadoras de colonias) se utilizó el medio de cultivo Agar Zöbell para bacterias marinas (tabla 2), el cual fue preparado gentilmente por el Laboratorio de Microbiología del INIDEP en botellas de 300 ml.- La composición del agar fué la siguiente:

Tabla 2.- Composición del Agar Zöbell para bacterias marinas

❖ Peptona	1.5 g
❖ Extracto de levadura	0.3 g
❖ Fosfato férrico	0.03 g
❖ Agar	4.5 g
❖ Agua de mar	225 ml
❖ Agua destilada	75 ml
❖ pH	7.2

Este agar solidificado, fue fundido y plaqueado para la presente experiencia, en placas estériles en condiciones asépticas. Luego, fué secado en estufa 24 horas a 30°C.

Con la misma secuencia que los muestreos microbiológicos (a los días 0, 5, 10 y 15), se controlaron los parámetros físico-químicos :

- pH, con un Ph metro marca *TOA modelo HM- 20 P*.
- salinidad, con un salinómetro marca *TANAKA modelo New S-100*.
- amonio, nitritos y nitratos con kits colorimétricos marca *HANNA Instruments Ion Specific Meters: nitrite reagent hi -3873-0; nitrate reagent hi-3874-0; y ammonia reagent. hi: 3826*

El muestreo microbiológico se realizó en cuatro momentos de la experiencia:

Tiempo 0: siendo considerado éste a las 24 horas de la neutralización con tiosulfato posterior a la cloración para el tratamiento B, C, D y E. Para el tratamiento A (sin cloración) el agua fue tomada en crudo.

Tiempo 5: a los 5 días de iniciado el cultivo

Tiempo 10: a los 10 días de iniciado el cultivo

Tiempo 15: a los 15 días de iniciado el cultivo, siendo éste el día de finalización de la experiencia.-

Técnica de siembra en superficie (Standard Methods, 1995): una muestra del agua de mar (0.1 ml) de cada uno de los 5 tratamientos (A, B, C, D y E) fué tomado con una pipeta estéril graduada, sembrada y esparcida por la superficie del agar, por duplicado para cada tratamiento. Estas placas se incubaron en una caja de telgopor a temperatura ambiente durante 48 horas para ver el recuento inicial de bacterias presentes en el agua de mar sin tratar y luego de ser tratada con las distintas concentraciones de cloro.-

Recuento bacteriano: finalizado el tiempo de incubación, las placas fueron retiradas de la caja incubadora y colocadas en una lupa para observar el desarrollo de bacterias y proceder a su recuento. Para facilitar este procedimiento, la tapa de la placa fue dividida en cuatro sectores. El conteo de las colonias fue hecho con la ayuda de un contador manual (tipo cuenta-ganado) y al mismo tiempo marcando las colonias sobre la tapa con una fibra indeleble. Se contó cada sector y luego se sumó para obtener el total del número de bacterias presentes. Este procedimiento fue hecho de la misma manera para todas las placas. Como la siembra fue de 0.1 ml, multiplicamos por 10 para saber el número de bacterias totales presentes en 1 ml de muestra, ya que es una regla en microbiología informar el resultado en Unidades formadoras de colonias por mililitro.

$$CFU/ml = N (\bar{x} s_1, s_2) \times 10$$

CFU/ml: unidades formadoras de colonias / ml

N: Número de bacterias

\bar{x} : Promedio entre la muestra 1 y la muestra 2

Resultados obtenidos y discusión

Crecimiento

A partir de los conteos diarios de cada uno de los erlenmeyers para cada tratamiento se obtuvo un valor promedio (triplicado /tratamiento) del número de cél/ ml* 10⁴(Figura 1)

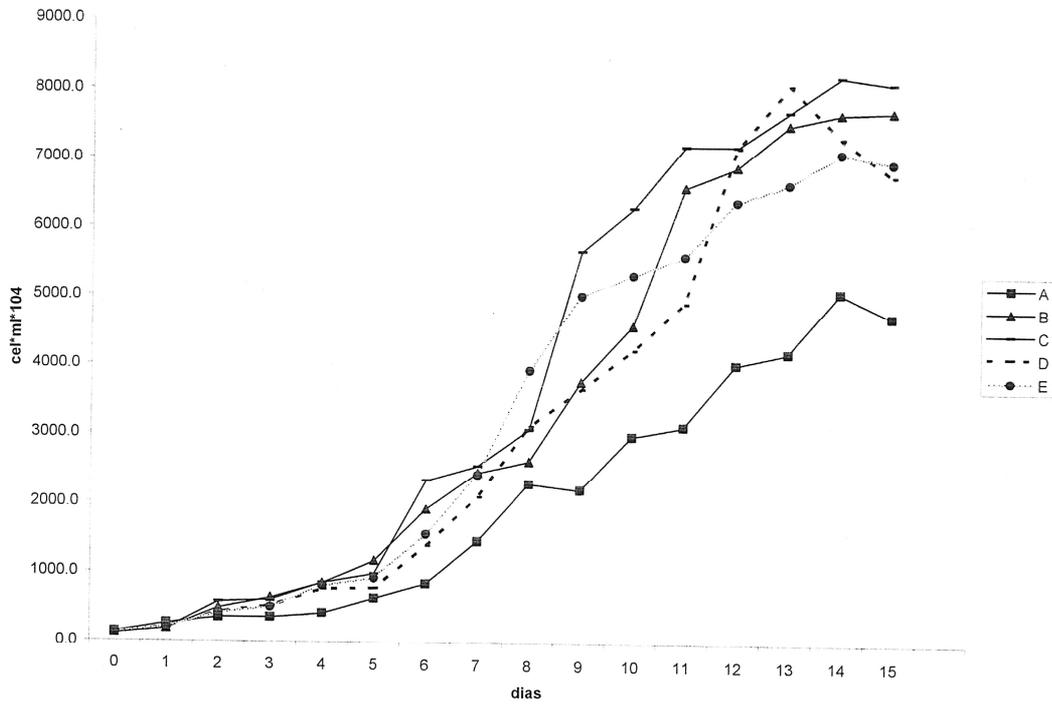


Figura 1.- Crecimiento de la microalga *Nannochloropsis oculata* bajo distintos tratamientos de cloración inicial. A: sin clorar, B: 5 ppm de cloro; C: 10 ppm de cloro; D: 50 ppm de cloro; E: 100 ppm de cloro

Podemos observar una marcada diferencia en relación al crecimiento: las curvas de crecimiento correspondientes a los tratamientos B, C, D y E se diferencian a simple vista de la curva del tratamiento A. En el caso de los tratamientos B, C, D y E las mayores concentraciones (7000×10^4 cel /ml promedio) se lograron entre los días 13 y 14 de la experiencia, partiendo, en todos los casos, de un inóculo inicial promedio de 123×10^4 cel /ml y entrando en fase exponencial a partir del quinto-sexto día. En el caso del tratamiento A (sin clorar) las concentraciones alcanzadas, partiendo del mismo inóculo inicial fueron bastante menores, llegando al día 14 con un máximo de 5083.3×10^4 cel /ml, casi un 30% menos que el agua previamente tratada.

En el caso de los parámetros físico-químicos, en lo que se refiere a nitratos, nitritos y amonio no se observaron alteraciones de los mismos, durante los días muestreados, en ninguno de los tratamientos (tabla 3). En el caso del pH los rangos registrados fueron entre 7 y 9.68 y la salinidad varió entre 33 y 36 ‰.-

Tabla 3. Parámetros físico-químicos – Tratamientos A, B, C, D y E. Día 0, 5, 10 y 15 días de la experiencia.

parametros	dia 0	dia 5	dia 10	dia 15
ph	7.72 - 7.86	9.35 - 9.9	9.13 - 9.68	9.3 - 9.68
salinidad	33- 34	33- 34	33 - 34	34- 36
nitrato	<10 mg/lt	<10 mg/lt	<10 mg/lt	<10 mg/lt
nitrito	<0.2 mg/lt	<0.2 mg/lt	<0.2 mg/lt	<0.2 mg/lt
amonio	<0.5 mg/lt	<0.5 mg/lt	<0.5 mg/lt	<0.5 mg/lt

Microbiología

Los resultados obtenidos de los conteos totales de bacterias heterótrofas totales se observan en la Tabla 4, Figura 2.

Tabla 4.- Recuentos de Bacterias heterótrofas totales/ml a tiempo 0, 5, 10 y 15 días para los tratamientos A, B, C, D y E.

DIA	A UFC/ml*10 ²	B UFC/ml*10 ²	C UFC/ml*10 ²	D UFC/ml*10 ²	E UFC/ml*10 ²
0	32.3	0	0	0	0
5	39.3	10.8	11.9	4.17	0.65
10	59.5	19.25	17.45	6.95	3.5
15	175.6	37.3	33.3	14.3	5.6

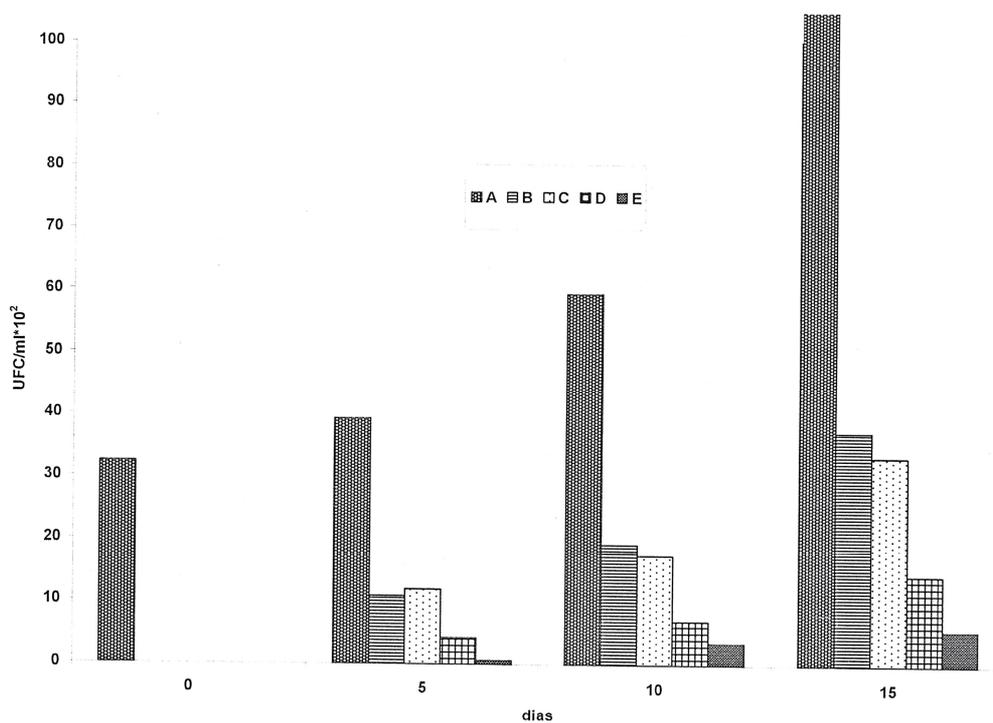


Figura 2.- Gráfico comparativo de los Recuentos de Bacterias heterótrofas totales/ml a lo largo de la experiencia. Tratamiento A: sin tratar; B: 5 ppm de cloro; C: 10 ppm; D: 50 ppm de cloro y E: 100 ppm de cloro.

Observando la Figura 2, notamos que en el tratamiento A, donde el agua de mar no se ha sometido a la cloración, existe una carga bacteriana inicial, siendo ésta de $32.3 \cdot 10^2$ UFC/ml. En el resto de las muestras de agua a tiempo cero, donde el agua fué tratada con 5, 10, 50 y 100 ppm de cloro, no se registraron bacterias, asegurando una desinfección total del agua inicial para la posterior siembra de los inóculos de microalgas. Al respecto, Torrentera Blanco y Tacon, (1989) reportan que la esterilización química con el uso de hipoclorito de sodio asegura un 100 % de reducción de la carga bacteriana de un agua de mar con una carga inicial de $1,70 \cdot 10^2$ UFC/ml

siendo junto con el autoclavado y la luz ultravioleta los tratamientos más eficientes para la esterilización.-

Continuando con la figura 2, la carga bacteriana del tratamiento A, sigue en notable aumento a medida que pasan los días, llegando a tener el día 15 un recuento de $175.6 * 10^2$ UFC/ml. Para el tratamiento B y C (5 y 10 ppm), cuya carga bacteriana era 0 después de la cloración, se observa que en el día 5, los recuentos promedios ascienden a 10.8 y $11.9 * 10^2$ UFC/ml respectivamente, alcanzando los 37.3 y $33.3 * 10^2$ UFC/ml para el día 15.- En el tratamiento D y E, (50 y 100 ppm de cloro respectivamente, cuya carga bacteriana era 0 después de la cloración, el desarrollo de las bacterias es muy bajo, en relación a los otros tratamientos en cualquiera de los días analizados, llegándose a detectar 14.3 y $5.6 * 10^2$ UFC/ml al final de la experiencia (día 15).

Si bien el inóculo microalgal puede tener una carga bacteriana propia (cultivos no axénicos) y sabiendo que todos los tratamientos poseen células pertenecientes al mismo inóculo inicial, la aparición bacteriana posterior a la cloración en los tratamientos B, C, D y E podría estar dada por la carga propia del inóculo (Nicolas *et al*, 2004), aunque en ese caso debería ser similar para todos los tratamientos ya que parten del mismo inóculo inicial. Según este mismo autor, las especies stocks de algas usadas en acuicultura son mantenidas cuidadosamente para evitar contaminación con bacterias, ciliados y otras algas, A pesar de estas precauciones, los cultivos algales son generalmente no axénicos y bacterias desconocidas están a menudo asociadas a ellos.

En el presente estudio, se observó que luego de realizar los recuentos de las bacterias a las 48 horas de la siembra como lo indica la técnica, en el caso del tratamiento B y C (5 y 10 ppm de cloro), 24 horas después de la lectura aparecían colonias en el agar correspondiente a ambos tratamientos. Esto podría estar indicando que un porcentaje de bacterias que formaban parte de la carga inicial del agua de mar, no hayan sido eliminadas por completo en el caso de 5 y 10 ppm de cloro. Esto es de sumo cuidado, ya que si queremos usar estos inóculos como cultivos iniciadores de una producción masiva de microalgas, no podemos arrastrar en el proceso de escalonamiento cultivos que presenten altas cargas bacterianas que pueden perjudicar toda la producción final.- Además el hecho de haber enriquecido el agua de mar con micronutrientes, permite crear un medio propicio para el crecimiento bacteriano y estimular aún más su desarrollo.

En la curva de crecimiento de la cepa de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Fig.1) obtenida en esta experiencia podemos ver claramente que el cultivo de algas en agua sin tratar presenta crecimiento pero no alcanza concentraciones tan elevadas como el resto de los tratamientos (B,C,D y E) lo que nos estaría indicando que el agua inicial sin tratar no es de buena calidad por presentar una gran cantidad de bacterias (Fig.2) que compiten por los nutrientes y el espacio ejerciendo un efecto inhibitorio en el desarrollo de las microalgas. Al día final de la experiencia (día 15), en relación a las concentraciones celulares alcanzadas, todos los tratamientos(B,C,D y E), excepto el A llegan a densidades entre los $7000-8000 * 10^4$ cel/ml pero los tratamientos B y C son los que tienen mayor recuento bacteriológico (casi un 40% más que el tratamiento D y un 84% más de bacterias que el tratamiento E). Esto estaría indicando en este caso que la presencia de bacterias hasta un número de $37 * 10^2$ UFC/ml no estaría afectando el crecimiento microalgal.-

Se deberían hacer recuentos de bacterias separando las algas por filtración y contando las bacterias presentes en la masa de microalgas y el agua de cultivo por separado ya que se ha demostrado que existen asociaciones entre comunidades bacterianas y cultivos de *Nannochloropsis* (Nakase and Eguchi, 2007) que pueden resultar benéficos para los cultivos.-

En relación a las concentraciones más elevadas de cloro (50 y 100 ppm) se observó que ambas tienen buen efecto inhibitorio sobre la carga bacteriana y no afectan el crecimiento de la microalga.-

Conclusiones:

1. El agua de mar sin tratamiento de desinfección no es recomendable para el cultivo de microalgas ya que genera altas densidades bacterianas que afectan el estado fisiológico celular, disminuyendo el crecimiento y la calidad sanitaria del cultivo sobre todo si se empleará como alimento vivo o producción masiva.-
2. Los tratamientos empleados: B, C, D y E (5, 10, 50 y 100 ppm de Cloro) con su correspondiente neutralización resultaron efectivos para eliminar el total de la carga bacteriana del agua inicial para el cultivo (tiempo 0) .
3. El crecimiento celular de la microalga *Nannochloropsis oculata* utilizada para ser cultivada con el agua tratada no es afectado de manera significativa por ninguno de los tratamientos de cloración empleados.
4. Cloraciones altas (50 y 100 ppm) aseguran una calidad de agua bacteriológicamente más aptas que cloraciones menores (5-10 ppm).

Bibliografía

APHA, WEF, AWWA, 1995.- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19 th edition. American Public Association. Washington D.C.-

COLL MORALES, J. 1983. Acuicultura marina animal. Edición Mundi-Prensa, Madrid, 670 pp.-

LOPEZ,A, ; MÜLLER,& BOCCANFUSO,J.J. 2007.- Producción masiva de la microalga *naanaochloropsis oculata* en tanques exteriores,2001-2003. Informe Técnico INIDEP N°: 03-07. 8 pp-

NAKASE,G & EGUCHI MITSURI, 2007.- Analysis of bacterial communities in *Nannochloropsis* sp. Cultures used for larval fish production. Fisheries Science, Vol. 73- Issue 3, 543-549 pp.-

NICOLAS, J.L., CORRE, S., & COCHARD,J.C. 2004.- Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. Microbial Ecology, Vol: 48, 400-413 pp.-

TORRENTERA BLANCO, L. & TACON, A.G. 1989.- La preproducción de alimento vivo y su importancia en acuicultura.- Programa Cooperativo Gubernamental FAO-ITALIA GCP/RLA/075/ITA Documento de campo N: 12.-