

Aislamiento e identificación de microalgas en la región de la planta geotermoeléctrica CFE de “los azufres” en el estado de Michoacán

J. G. Bravo, A. T. Morales, A. Ayala

J. G. Bravo, A. T. Morales y A. Ayala

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Carretera Irapuato-Silao Km 12.5, El Copal, Irapuato, Guanajuato, CP 36821.
IS08110128@es.itesi.edu.mx

M. Ramos.,V.Aguilera.,(eds.). Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

Abstract

In the following study, two samplings were taken in the “Los Azufres” region in the CFE geothermal power plant located in the state of Michoacán, in which a number of areas for sampling were selected to later be analyzed and studied for the presence of microalgae. From the samples of areas selected were streaked on solid medium; in the first sampling the agar medium BG11 was selected and the PBS like buffer for the dilutions; in the second sampling the agar medium CHU10 amended by Gerloff was selected and distilled water for dilutions. In the results no growth was observed in the solid medium BG11, while with the CHU10 medium amended by Gerloff the growth was in almost all Petri dishes. Starting with these growths were able to isolate three types of microalgae.

1 Introducción

Las microalgas son un grupo polifilético de organismos fotótrofos oxigénicos, auxotróficos o facultativamente heterótrofos, restringidos a ambientes húmedos por la ausencia de mecanismos de protección contra la desecación (Moreno et al., 2012). La importancia de las microalgas radica en su gran capacidad de fijar CO₂ y convertirlo en O₂; debido a esto, son una parte importante de las cadenas alimenticias acuáticas. Tan solo el 80% del O₂ en la tierra es producido por microalgas (Tortora J. G., 2007). Sin embargo, no es lo único por lo que las microalgas son importantes, en estudios recientes se ha demostrado que las algas pueden producir biocombustibles alternos a los del petróleo. Sin embargo, los suministros de agua, de nutrientes y el consumo de energía se han señalado como cuestiones clave en los sistemas de producción de biocombustibles con microalgas (Mottet, Habouzit, & Steyer, 2014). También cabe resaltar que se les menciona como el alimento del futuro por destacarse en tener un alto poder nutritivo y su variado contenido de grasas y calorías (Valdés & Blanco Soto, 2008). Las algas, así como otros organismos, se han caracterizado por desarrollarse perfectamente a condiciones ambientales variadas, ya sean de temperatura, presión o pH, por lo que se ha demostrado que algunos organismos pueden vivir en condiciones extremas. La zona donde se tomaron las muestras se ubica en el estado de Michoacán, en una planta geotermoeléctrica de la Comisión Federal de Electricidad llamada “Los Azufres”. Esta zona es caracterizada por contener altas concentraciones de azufre, pH variado y temperaturas que pueden alcanzar los 80°C, lo cual convierte a esta zona interesante para investigar. A pesar de esto, no existen estudios sobre la presencia de algas en esta zona, teniendo en cuenta que estas pueden tener un impacto positivo significativo sobre el ambiente y los seres humanos, debido a su capacidad de desarrollarse en este tipo de ambientes un tanto inusuales. El presente trabajo está enfocado en aislar e identificar microalgas provenientes de la zona geotérmica de “Los Azufres” que presenta ambientes extremos (alta concentración de azufre, pH bajo y altas temperaturas) para posteriores estudios con un enfoque biológico, ecológico o biotecnológico.

1.1 Materiales y métodos

Muestreo:

Primer muestreo. Se esterilizaron por calor húmedo frascos de vidrio con capacidad de 1 litro para las muestras de agua y tubos Falcon de 50 ml para las muestras de sedimento. Se designaron ocho zonas de donde se tomaron las muestras (Tabla 1), cuatro de agua y cuatro de sedimento, y se tomaron medidas de temperatura, pH (Potenciómetro) y las coordenadas de cada zona (GPS). Las cuatro muestras de agua fueron superficiales, se etiquetaron adecuadamente y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Las cuatro muestras de sedimento se tomaron de las zonas que se observaban con mayor abundancia de algas, se etiquetaron adecuadamente y se almacenaron a temperatura ambiente.

Tabla 1 Propiedades físicas y coordenadas de cada zona que se muestreó en el primer muestreo.

	Latitud	Longitud	(°C)	
3	19°49.355' N	100°40.065' W	20	-
4	19°49.356' N	100°40.078' W	27	-
4.1	19°49.354' N	100°40.078' W	27	-
5	19°49.350' N	100°40.079' W	40	-
7	19°49.351' N	100°40.080' W	30	-
9	19°49.334' N	100°40.101' W	55	-
10	19°49.346' N	100°40.105' W	30	-

Segundo muestreo. Se esterilizaron por calor húmedo frascos de vidrio con capacidad de 1 litro y se almacenaron para el muestreo de agua. Se designaron 8 zonas (Tabla 2) para las muestras de agua. Se midió la temperatura, el pH (tiras de pH) y se tomaron las coordenadas de la cada zona. Se tomaron muestras superficiales (800 ml aproximadamente) de cada una de las ocho zonas, se etiquetaron correctamente y se almacenaron a temperatura ambiente y en presencia de luz hasta su tratamiento.

Tabla 2 Propiedades físicas y coordenadas de cada zona que se muestreó en el segundo muestreo.

	Latitud	Longitud	(°C)	
A	19°49.366' N	100°40.07' W	18.5	5.5
B(7)	19°49.365' N	100°40.014' W	33	3
C	19°49.356' N	100°40.084' W	35	3
D(10)	19°49.347' N	100°40.103' W	25	5.5
E	19°49.335' N	100°40.110' W	25	5
F	19°49.334' N	100°40.113' W	35	5.5
G	19°49.337' N	100°40.089' W	35	3.5
H	19°49.338' N	100°40.092' W	46	5.5

Tratamiento de la muestra y siembra:

Primer muestreo. Se prepararon 450 ml de medio BG11 y se esterilizó en una olla de presión a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Posteriormente se vertieron 15 ml de medio en cada caja de Petri y se almacenaron en refrigeración a 4°C para la siembra de las algas. Se esterilizaron perlas de vidrio en tubos Falcon en una olla de presión a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Se preparó una solución reguladora de fosfatos (PBS) y se vertieron 0.9 ml de la solución en cada tubo Eppendorf y se esterilizaron en una olla de presión a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra tanto de agua como de sedimento desde 100 hasta 10⁻², tomando 0.1 ml de cada muestra y vertiéndolos en los 0.9 ml de los tubos Eppendorf, tomando como ésta la dilución 10⁻¹, y se agitó para que se homogeneizara la dilución. Posteriormente se tomaron 0,1 ml de esta dilución y se vertieron en otro tubo Eppendorf con los 0.9 ml de solución de PBS y se agitó, tomando esta dilución como la 10⁻².

Cada dilución se sembró por goteo con ayuda de una micropipeta de 0.01-0.1 ml. Se tomaron 0.1 ml de cada dilución y se vertieron sobre las cajas Petri con medio BG11, posteriormente se le agregaron de 4 a 6 perlas de vidrio a cada caja y se agitaron las perlas hasta que se secase la dilución en el medio y las perlas pudiesen resbalar sin problemas. Se sellaron las cajas y se dejaron a temperatura ambiente (23-25°C) y con iluminación las 24 horas.

Segundo muestreo. Se tomaron alícuotas de 0.1 ml de cada muestra y se hicieron diluciones seriadas con agua destilada estéril desde 100 hasta 10⁻². Se prepararon 450 ml de medio agar CHU 10 y se vertieron en cajas de Petri. Se etiquetaron adecuadamente las cajas y se dejaron a temperatura ambiente y con iluminación las 24 horas durante 7 días.

Almacenamiento de la muestra:

Primer muestreo. Se desinfectaron con benzal 4 botes de plástico con tapa con capacidad de 1 litro, 4 refractarios pequeños con tapa de 100 ml, 4 mangueras pequeñas y 4 aireadores para pecera. Se vertieron las cuatro muestras de agua en los botes de plástico y se le puso a cada bote un aireador con su manguera unida a una bomba de aire, filtrando el aire con un pequeño algodón a las salidas de la bomba. Las muestras de sedimento se vertieron en los refractarios de vidrio y se hidrataron con agua destilada y se sobretaparon. Todas las muestras se dejaron a condiciones ambientales y con luz las 24 horas.

Se le agregó una solución de nutrientes (nitratos, sulfatos y sulfuros) a cada muestra según la relación que hay en el medio BG11.

Segundo muestreo. Se desinfectaron con benzal 8 botes de plástico con tapa con capacidad de 1 litro, con sus respectivas mangueras y aireadores. Se dejaron a temperatura ambiente, con iluminación y aireación las 24 horas.

Figura 1. Almacenamiento de las muestras del primer muestreo (A) y del segundo muestreo (B).



Identificación y aislamiento:

El seguimiento de los pasos para la identificación y aislamiento se hizo de la misma manera tanto en el primer como en el segundo muestreo. Para las muestras de agua se tomaron aproximadamente 0.1 ml de muestra y se observó al microscopio con objetivos 40X y 100X (aceite de inmersión). Para las muestras de sedimento se tomó con una espátula lo menos posible de éste, y se observó al microscopio a 40X y 100X (aceite de inmersión). Para tomar una muestra donde se presencie crecimiento de algas (adheridas a las paredes del bote), se tomó muestra con un hisopo previamente esterilizado.

Se raspó levemente sobre una pared y posteriormente se observó al microscopio a 40X y 100X (aceite de inmersión). Se fotografiaron las diferentes células que se observaron, para finalmente comparar por medio de referencias (manuales, artículos o guías) las células observadas.

El aislamiento se llevó a cabo por medio de la técnica de estriado por agotamiento de cada colonia observada macroscópicamente en los medios sólidos, para que posteriormente cada colonia se observara en el microscopio y se identificaran cuantos tipos de células había.

1.2 Resultados y discusión

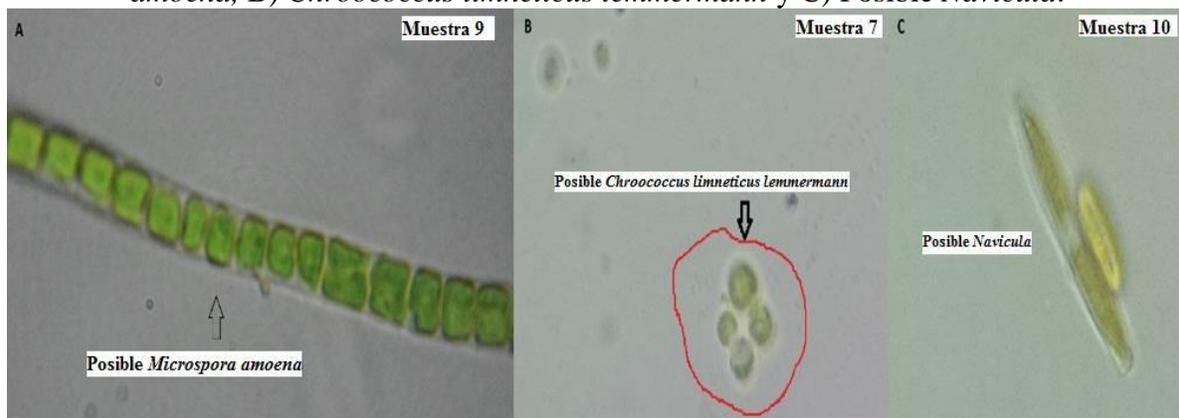
Los resultados denotados a continuación son resultados parciales que se tiene del proyecto. Primer muestreo:

En el primer muestreo no hubo crecimiento de microalgas en el medio sólido BG11, el cual es un medio general para las algas.

Esto se pudo deber a varios factores que no se tuvieron en cuenta, uno de ellos fue que se utilizó agua destilada para la elaboración del medio y no agua proveniente de la zona donde se muestreo; otro de los factores es que las diluciones se hicieron con la solución reguladora de fosfatos PBS; esto pudo afectar en el pH y evitar que proliferaran de manera adecuada las microalgas. Sin embargo, en los botes donde se almacenaron las muestras, las algas crecieron y se mantuvieron sin ningún problema.

En la tabla 1 a comparación de la tabla 2 no aparece el pH de cada zona debido a que en el primer muestreo el pH que se tomó era erróneo, puesto que el potenciómetro estaba descalibrado. No se logró aislar alguna especie de microalga, pero si se pudieron identificar algunas posibles dentro de estas muestras con ayuda de un microscopio óptico y observando con el objetivo de 100 X, para posteriormente comparar las fotografías tomadas, con ayuda de la página web www.algaebase.org. También cabe resaltar que se encontró una gran diversidad de diferentes células en cada muestra pero solo tres de ellas se pudieron identificar con su posible nombre.

Figura 1.1 Algunas microalgas posibles de las muestras 9, 7 y 10 del primer muestreo. A) *Microspora amoena*, B) *Chroococcus limneticus lemmermann* y C) Posible *Navicula*.



Segundo muestreo:

En el segundo muestreo se tuvo éxito con las muestras que se sembraron en el medio sólido CHU10 modificado por Gerloff.

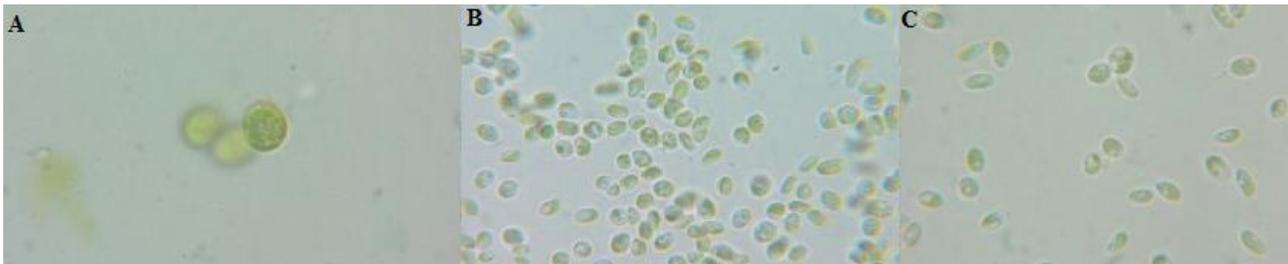
Hubo crecimiento de todas las zonas de donde se tomó la muestra para sembrar en las cajas de Petri, con excepción de dos zonas las cuales no se observó macroscópicamente ningún crecimiento o alguna proliferación de colonias de microalgas.

Las zonas que tuvieron crecimiento en las cajas fueron la A, D, E, F, G y H; mientras que las que no tuvieron crecimiento fueron la B y la C. Es interesante recalcar que todas las cajas estuvieron bajo las mismas condiciones.

Lo más probable es que las condiciones estrictas a las que se mantuvieron las muestras pudo afectar que ese tipo de microalga no se desarrollara con éxito.

Se seleccionaron las cajas donde hubo colonias de microalgas y se observaron al microscopio con el objetivo de 100X para poder distinguir si había más de una sola célula diferente. Se logró observar en la zona E, D y G un solo tipo de célula aislada, pero sin aún poder identificar a que género de microalga pertenece.

Figura 1.2 Microalgas aisladas de una sola célula de las zonas D (A), G (B) y E (C) del segundo muestreo.



1.3 Conclusiones

Se obtuvieron tres células aisladas de tres zonas muestreadas. Sin embargo, no se han podido identificar de manera precisa los géneros y especies de las microalgas observadas en el microscopio, así como las microalgas aisladas en el medio sólido CHU10 modificado por Gerloff. Se ha encontrado una gran diversidad de morfologías de células en la región geotérmica de Los Azufres, por lo que es necesario continuar con su identificación y estudios de crecimiento.

1.4 Agradecimientos

Se agradece al cuerpo académico en formación Biotecnología aplicada a la sustentabilidad agrícola y ambiental, ITESI-CA-8 de la carrera de Ingeniería Bioquímica en el Instituto Tecnológico Superior del Itesi por los apoyos recibidos para esta investigación.

1.5 Referencias

- Arellano, M. V., Torres, M. A., & Barragán, R. M. (2005). Thermodynamic evolution of the Los Azufres, Mexico, geothermal reservoir from 1982 to 2002. *Geothermics*, 592-616.
- Escudero, R. M. (2012). Planta de producción de microalgas con fines energéticos. Almería, España.
- González Reyes, A. M. (2000). Alternativas en el cultivo de microalgas. Guayaquil, Ecuador.

Moreno, R. J., Medina, D. C., & Albarracín, H. V. (2012). Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas. *Reduca*, 110-125.

Mottet, A., Habouzit, F., & Steyer, J. P. (2014). Anaerobic digestion of marine microalgae in different salinity levels. *Bioresource Technology*, 300-306.

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiología*. Madrid: McGraw-Hill. Romo, A. K. (2002). Manual para el cultivo de microalgas. Baja California Sur, México.

Talec, A., Philistin, M., Ferey, F., Walenta, G., Irisson, J.-O., Bernard, O., & Sciandra, A. (2013). Effect of gaseous cement industry effluents on four species of microalgae. *Bioresource Technology*, 353–359.

Tortora J. G., F. R. (2007). *Introducción a la microbiología*. México: Médica Panamericana. Valdés, Y. A., & Blanco Soto, M. F. (2008). Algas, aliadas en el pasado y sustento para el futuro. *Tecnología Química*, 46-50.