









# **AISLAMIENTO DE ESPECIES DE MICROALGAS CON INTERÉS BIOTECNOLÓGICO**

**PASANTÍA DE  
Delfina Castiglioni**

**AUTORES  
Delfina Castiglioni  
Regina Toranzo  
Gisela Ferraro  
Carolina Bagnato**

*Todos los autores contribuyeron  
en igual medida a la  
realización de esta obra*

**REVISOR  
Carolina Bagnato**

**2018**

**INSTITUTO DE ENERGÍA Y  
DESARROLLO SUSTENTABLE**

**Comisión Nacional de  
Energía Atómica**



## PRÓLOGO

Una de las líneas de investigación del Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable (IEDS) abarca el estudio de las posibles aplicaciones biotecnológicas de las microalgas, las cuales cuentan entre otras, con potencial tanto para la generación de combustibles de tercera generación como para la remoción de distintas sustancias de efluentes o del ambiente.

En el presente documento se presentan ensayos preliminares para el aislamiento de cepas ambientales mediante técnicas comúnmente utilizadas para la obtención de cultivos unialgales. Estas técnicas constan de una serie de pasos que además permiten obtener cultivos limpios, sin presencia de bacterias u otros microorganismos. Todas las cepas aisladas pertenecen a las microalgas del grupo de las Chlorophytas y fueron aisladas de dos ambientes de agua dulce del país con distinto grado de contaminación.

Se realizó una caracterización de las distintas cepas mediante tinciones, curvas de crecimiento y se evaluaron los tipos de metabolismo de cada una de las mismas. De esta manera finalmente se obtuvo un cepario perteneciente al IEDS, que cuenta con quince cepas y se encuentra actualmente en uso para la realización de ensayos biotecnológicos.

Además, el presente informe presenta una descripción detallada de los métodos empleados convirtiéndolo en una herramienta metodológica experimental de gran utilidad para consulta de integrantes del IEDS así como para la comunidad científica en general.

Carolina Bagnato



## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>OBJETIVOS</b> .....	11
Objetivo general .....	11
Objetivos específicos .....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
Selección y enriquecimiento de las muestras de suelo .....	12
Obtención de cepas individuales .....	14
<b>CHARACTERIZACIÓN</b> .....	14
Tinciones con Oil Red O .....	14
Curvas de crecimiento .....	15
Evaluación de tipos de metabolismo .....	16
Obtención de cultivos axénicos .....	16
Tratamiento con antibióticos para la obtención de cultivos axénicos .....	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	17
Enriquecimiento .....	17
Obtención de cepas individuales .....	18
Caracterización .....	21
Tinción con Oil Red O .....	21
Curvas de crecimiento .....	22
Evaluación de tipos de metabolismo .....	24
<b>CEPAS AISLADAS</b> .....	25
<b>CONCLUSIONES</b> .....	28
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	29



## RESUMEN

Se llevó a cabo el aislamiento de cepas de distintos géneros de Chlorophytas provenientes del el Río Reconquista (RR) en la provincia de Buenos Aires y el humedal natural ubicado en el Centro Tecnológico Pilcaniyeu (CTP) de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), en la localidad de Pilcaniyeu, provincia de Río Negro, con el objetivo de evaluar su potencial utilización en futuros estudios con aplicaciones en biorremediación y producción de biodiesel.

Las cepas se caracterizaron mediante tinciones con *Oil Red O* (O.R.O), curvas de crecimiento, analizando el tipo de metabolismo y las características de las mismas bajo microscopio óptico. Se obtuvieron cepas axénicas de los distintos géneros mediante distintas técnicas de aislamiento.

Se constituyó, de esta forma, un cepario de algas con potencial biotecnológico que pertenece al Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable de la CNEA.

## INTRODUCCIÓN

### Ventajas de las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas

Las microalgas son los principales productores primarios de oxígeno en el mundo y exhiben un gran potencial para su utilización en la industria biotecnológica. El cultivo de microalgas representa una buena opción para la biorremediación de aguas cloacales, ya que estos organismos son particularmente eficientes en la remoción de altos niveles de nitrógeno, fósforo inorgánico y metales pesados, provenientes de efluentes domésticos e industriales. También contribuyen a la reducción de CO<sub>2</sub> en efluentes gaseosos y de la atmósfera [1] y se considera que comprenden la única fuente de biodiesel potencialmente capaz de desplazar los combustibles líquidos derivados del petróleo [2]. Por otra parte, la biomasa microalgal puede ser utilizada para la producción de pigmentos, lípidos, alimentos y energías renovables [1], [3], [4].

Diversos géneros de microalgas han sido estudiados para su aplicación biotecnológica, incluyendo tanto especies marinas como de agua dulce. Podemos mencionar entre otras a *Botryococcus spp.* o *Nannochloropsis spp.* [5], [6]. Particularmente, varios géneros del grupo de

las Chlorophytas han sido estudiados para su aplicación en la producción de biocombustibles y la biorremediación, entre otras aplicaciones. Éstos incluyen a especies del género *Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Chlamydomonas sp.*, *Dunaliella sp.* y *Scenedesmus sp.* Algunos ejemplos se detallan en la Tabla 1.

GÉNERO	ALGUNAS APLICACIONES	FUENTE
<i>Chlamydomonas sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocombustibles</li> <li>• Biorremediación</li> <li>• Proteínas recombinantes de interés terapéutico</li> </ul>	[7] [8] [9]
<i>Chlorella</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocombustibles</li> <li>• Biorremediación</li> <li>• Alimento</li> </ul>	[10] [7] [4] [11]
<i>Chlorococcum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocombustibles</li> <li>• Biorremediación</li> </ul>	[12] [13] [14]
<i>Dunaliella</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocombustibles</li> </ul>	[15] [16]
<i>Scenedesmus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocombustibles</li> <li>• Biorremediación</li> </ul>	[17]

Tabla 1: Géneros de Chlorophytas y algunas de sus aplicaciones biotecnológicas.

Cabe mencionar que pueden encontrarse especies pertenecientes a todos estos géneros en diversos ecosistemas de Argentina, dado que son géneros cosmopolitas con una amplia distribución en nuestro territorio, incluyendo la región andino-patagónica norte [18]. Esto implica una gran ventaja para su estudio y utilización debido a que existen regulaciones y trámites para el transporte de microorganismos, con un costo asociado a los mismos, no necesarios al aislar y trabajar con especies de la región. Por otra parte, se espera que las cepas

de microalgas aisladas de hábitats locales sean las mejores adaptadas a las condiciones locales específicas, haciendo de ellas las más indicadas para cultivo a gran escala [19]. En este contexto, el aislamiento de cepas de hábitats altamente impactados, tiene la ventaja de que dichas microalgas puedan presentar una mayor tolerancia para sobrevivir a distintas situaciones de estrés [20]. Esta condición las haría más adecuadas para las aplicaciones biotecnológicas que se pretenden.

En el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento de cepas de distintos géneros de Chlorophytas con el objetivo de evaluar su potencial utilización en futuros estudios con aplicaciones en biorremediación y producción de biodiesel. Este informe presenta la metodología desarrollada en los aislamientos y la caracterización de las cepas y como resultados se presentan algunos de los análisis más relevantes. Cabe mencionar que el material presentado en los resultados no es un análisis exhaustivo de todas las cepas aisladas, sino ejemplos representativos. En la actualidad, todas las cepas aisladas constituyen el cepario del Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Aislar especies de algas de áreas afectadas por actividad industrial, con potencial interés biotecnológico, para su aplicación en el área de biorremediación y producción de biodiesel.

### **Objetivos específicos**

- Realizar aislamientos de las áreas del RR y CTP.
- Evaluar su potencial para ser aplicadas en biorremediación de metales y producción de biodiesel.
- Generar un cepario de algas con potencial biotecnológico perteneciente al Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable de la CNEA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se procedió al aislamiento de microalgas de dos sitios de interés, el RR y el CTP. Ambos sitios presentan contaminación por el vertido de efluentes industriales y en el caso del RR, también en gran medida por efluentes domésticos. Un detalle de las áreas de muestreo se representa en la Fig. 1.

Para los aislamientos se contó con dos muestras de barro provenientes del RR y con una muestra de barro obtenido del horizonte superficial de uno de los tres puntos con mayor concentración de uranio del humedal del CTP.



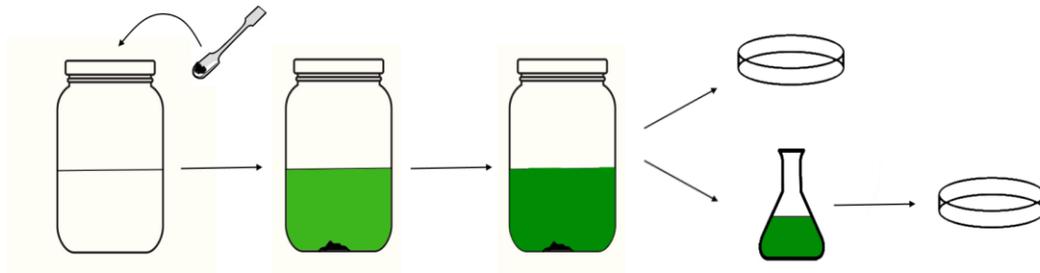
Fig. 1: A) Punto de muestreo en el RR, el cual se encuentra en una zona altamente urbanizada.

B) Punto de muestreo en el CTP.

### Selección y enriquecimiento de las muestras de suelo

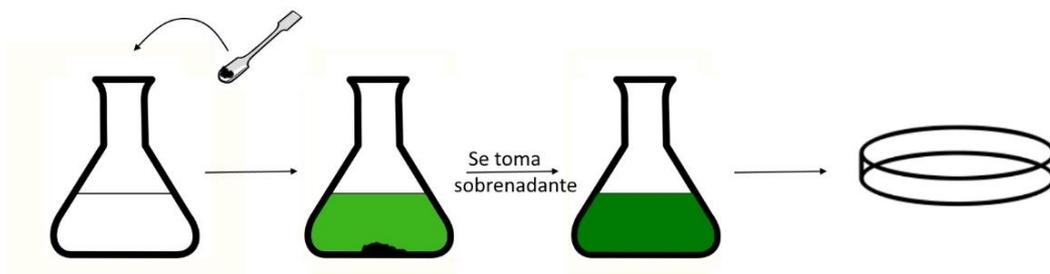
Luego de recibidas las muestras de barro se procedió al enriquecimiento de las mismas. Se colocó en un frasco de vidrio 0.1 g de barro del RR con medio Bold [21] y se enriqueció por seis semanas. Se decidió cuándo sembrar la muestra enriquecida según la coloración verde del

medio, la cual indica la presencia de algas fotosintéticas y una alta probabilidad de predominancia de especies de Chlorophytas. Partiendo de las muestras enriquecidas se procedió con dos metodologías: 1) Se sembró en placa para el aislamiento de colonias individuales, o alternativamente 2) Se realizó un segundo enriquecimiento en Erlenmeyer en medio líquido y renovado, para luego sembrar en placa (Fig. 2).



*Fig. 2: Pasos del enriquecimiento del cultivo de microalgas del RR en medio Bold, para su posterior pasaje a placa o Erlenmeyer.*

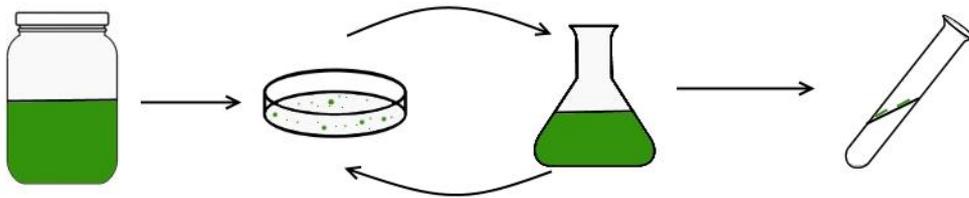
En cuanto al enriquecimiento de las muestras del CTP, se tomó 0.1 g de barro de las muestras del punto con mayor concentración de uranio y se colocó en Erlenmeyer con medio Bold. Se enriqueció por dos semanas y se pasó el sobrenadante a un nuevo Erlenmeyer, para continuar enriqueciendo por dos semanas más y posteriormente realizar un sembrado en placa (Fig. 3).



*Fig. 3: Pasos del enriquecimiento del cultivo de microalgas del CTP en medio Bold para su posterior pasaje a placa.*

## Obtención de cepas individuales

Uno de los métodos utilizados para la obtención de cultivos monoespecíficos y axénicos, consiste en el estriado sucesivo en agar. Se realizó un primer sembrado de los enriquecimientos originales (los frascos), en placa con medio Bold y agar al 1%, de manera de comenzar a aislar colonias individuales y con una menor carga de bacterias. Se seleccionaron colonias individuales de estas placas y se transfirieron a Erlenmeyers con medio Bold. En este paso, se realizó un monitoreo de los cultivos al microscopio para determinar el posible género de los organismos aislados. También se observó la posible presencia de más de un género de microalgas en el cultivo. De ser así, se sembró nuevamente en placa, para poder aislar un único género en el siguiente pasaje a Erlenmeyer. Se repitieron estos pasos de sembrado y repique hasta lograr cultivos unialgales, para posteriormente sembrar en tubos de ensayo con medio Bold agar 1% o mantener los cultivos en Erlenmeyer (Fig. 4).



*Figura 4: Pasos para el aislamiento de cepas de microalgas. A partir del cultivo original se siembra en placa para luego transferir a Erlenmeyer los repiques de las colonias seleccionadas a la lupa. Se repiten estos pasos hasta obtener cultivos unialgales correspondientes a una única especie y/o cepa. Las cepas así obtenidas se siembran en tubo de ensayo (pico de flauta) o se mantiene en Erlenmeyer para la realización de determinaciones de caracterización.*

## CARACTERIZACIÓN

### Tinciones con Oil Red O

Se realizaron tinciones con el colorante O.R.O al 0.5% en isopropanol, a fin de observar si alguna de las cepas aisladas presentaba acumulación de lípidos neutros. Se registró si las células

individuales o los agregados de células eran teñidas. Para realizar la tinción se tomaron 0.5 mL de cada uno de los cultivos (13 del RR y 3 del CTP), se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Luego se agregaron 200  $\mu$ L de glutaraldehído 2.5% y se dejó actuar por 40 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras nuevamente y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 100  $\mu$ L de solución O.R.O al 0.5% en isopropanol y se mantuvo en heladera aproximadamente 19 horas (tinción *overnight*). Se realizó una nueva centrifugación, luego de la cual se descartó el sobrenadante y posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de PBS para lavar el exceso de colorante. Se realizó una última centrifugación para descartar el sobrenadante de PBS con colorante y se agregaron 100  $\mu$ L de PBS limpio. Una vez teñidos los cultivos fueron observados y analizados al microscopio óptico.

### Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento, por conteo en cámara de Neubauer, de los tres cultivos de *Scenedesmus* sp. del RR (Cepas: RR 7, 8 y 9). Para esto se partió de una densidad inicial de  $1 \times 10^4$  células por mL. Durante el tiempo de realización de la curva los cultivos se desarrollaron a 21 °C, en incubador con fotoperíodo 12/12 con una intensidad lumínica de  $50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ S}^{-1}$ , con agitación y sin CO<sub>2</sub> agregado. A partir de los datos obtenidos se calculó la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) utilizando los datos de densidad celular (número de células por mililitro) registrados durante la fase exponencial (ecuación 1):

$$\mu = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t}$$

A partir del dato de tasa de crecimiento específica se obtuvieron los tiempos de duplicación ( $T_2$ ) (ecuación 2):

$$T_2 = 0,6931/\mu$$

## Evaluación de tipos de metabolismo

Las microalgas son consideradas organismos fotoautótrofos en general, pero se han observado varias especies que habitan lugares donde el metabolismo autótrofo no es viable. De esto se dedujo y comprobó que tenían la capacidad de crecer a base de compuestos carbonados tales como glucosa, sacarosa o acetato [22]. A esta condición se la denomina mixotrofia y describe la capacidad de un organismo de vivir de manera autótrofa y heterótrofa. Para evaluar la posible mixotrofia de los cultivos se testeó el tipo de metabolismo de las microalgas sembrando algunos de los cultivos en *medio de cultivo rico*, conteniendo una fuente orgánica de carbono (tripteína 0.5%, glucosa 0.5%, NaCl 0.5%, extracto de levadura 0.3% P/V), tanto expuestas a la luz (control), como en oscuridad. Los cultivos se observaron periódicamente y pasados 10 días se registraron las cepas que presentaron crecimiento en oscuridad.

## Obtención de cultivos axénicos

Se realizaron tinciones con *azul de metileno* para comprobar la presencia de bacterias, así como cultivos en *medio rico*.

Para la tinción se tomó un ansa de cultivo líquido que se desparramó en un portaobjetos formando una película delgada y se secó al aire. Se realizó una fijación en llama, con la película de cultivo hacia arriba, pasando tres veces el portaobjetos sobre la misma. Luego se añadió una gota del colorante y se esperó por entre 30 y 60 segundos. Pasado este tiempo se inclinó el portaobjetos, se enjuagó con agua (no directamente sobre la muestra) y se secó. Se observaron los preparados en el microscopio óptico en busca de bacterias.

El cultivo en *medio rico* también se utilizó para testear la presencia de bacterias en los cultivos de algas, ya que la fuente de carbono promueve el crecimiento de las mismas, haciéndose evidentes a la brevedad, si están presentes. Esto permite hacer un rápido diagnóstico del grado de pureza del cultivo. Para la detección de bacterias, los cultivos a testear se sembraron en placas de medio rico agar 1%, se cultivaron a 21 °C en oscuridad y se monitorearon periódicamente para evaluar de colonias de las mismas.

## **Tratamiento con antibióticos para la obtención de cultivos axénicos**

Para obtener un cultivo de microalgas axénico es necesario eliminar otros tipos de microorganismos, incluidos bacterias y hongos presentes en el mismo, lo cual puede llevarse a cabo mediante la utilización de antibióticos. Se debe tener en cuenta cuáles antibióticos se emplearán, en qué concentraciones y por cuánto tiempo, ya que la combinación de antibióticos puede no ser letal para las bacterias pero sí para las microalgas [21]. Una opción para realizar el tratamiento con antibióticos sería la transferencia secuencial del cultivo algal a través de varios Erlenmeyer, cada uno conteniendo antibióticos diferentes (por ejemplo: penicilina, estreptomicina y cloranfenicol) a niveles que permitieran el crecimiento y supervivencia del alga. Luego de cada paso del tratamiento se debería realizar un cultivo en *medio rico* por un mes, para descartar la presencia de bacterias. También se podría utilizar otra metodología alternativa a la planteada [23], por ejemplo, se podría realizar la dilución de una combinación y/o mezcla de antibióticos en un cultivo celular. La mezcla se puede realizar utilizando Penicilina G, cloranfenicol, neomicina y cicloheximida, a diferentes concentraciones. La desventaja de este método reside en que las algas se encuentran expuestas a altas concentraciones de antibióticos.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Enriquecimiento**

Luego de algunos días de agregado del barro al medio se observó una coloración verdosa del mismo, pero con mucho sedimento de la muestra de barro. Luego se tomó el sobrenadante y se lo colocó en un nuevo Erlenmeyer con el agregado de medio limpio. En los días posteriores, la coloración verde se intensificó, por lo que se realizó un sembrado en placa (*Fig. 5*).

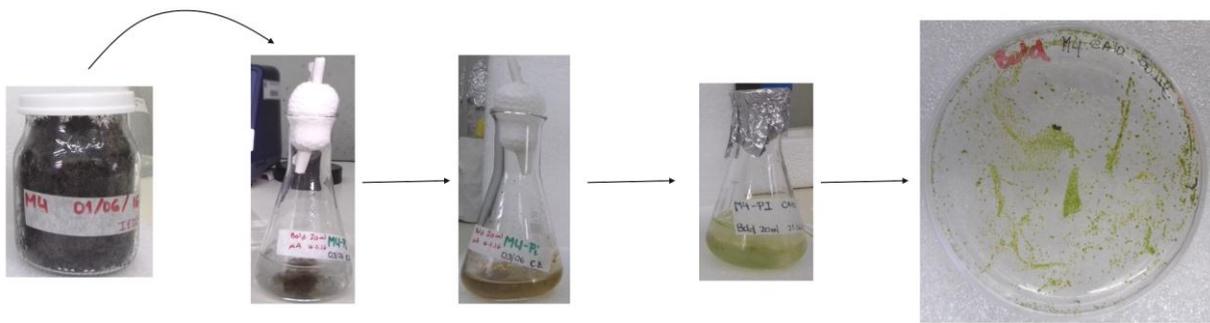


Fig. 5: Pasos del enriquecimiento del barro del CTP.

### Obtención de cepas individuales

A partir de un primer estriado en placa se seleccionaron colonias individuales (Fig. 6) y se realizaron repiques utilizando palillos estériles en Erlenmeyers de 50 mL conteniendo medio Bold. Para el monitoreo microscópico se realizaron frotis de colonias de distinta morfología y de los cultivos en Erlenmeyer. A modo de ejemplo, la Fig. 7 muestra frotis de repiques en los que se observaron especies de los géneros de *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.* y *Chlorococcum sp.*



Fig. 6: Cultivo en placa. Se observan colonias de microalgas (verdes) y de bacterias (amarillo claro), de las cuales se tomaron colonias individuales para el repique a Erlenmeyer.

Las colonias individuales pasadas a Erlenmeyer se rotularon, indicando el sitio de aislamiento y número de cepa, y se volvieron a sembrar en placa. En algunos casos, como el de la colonia 6 del RR, solo se requirió un pasaje más a Erlenmeyer para obtener un cultivo unialgal que pudiera ser sembrado en pico de flauta. La secuencia del aislamiento se muestra en la Fig. 8.

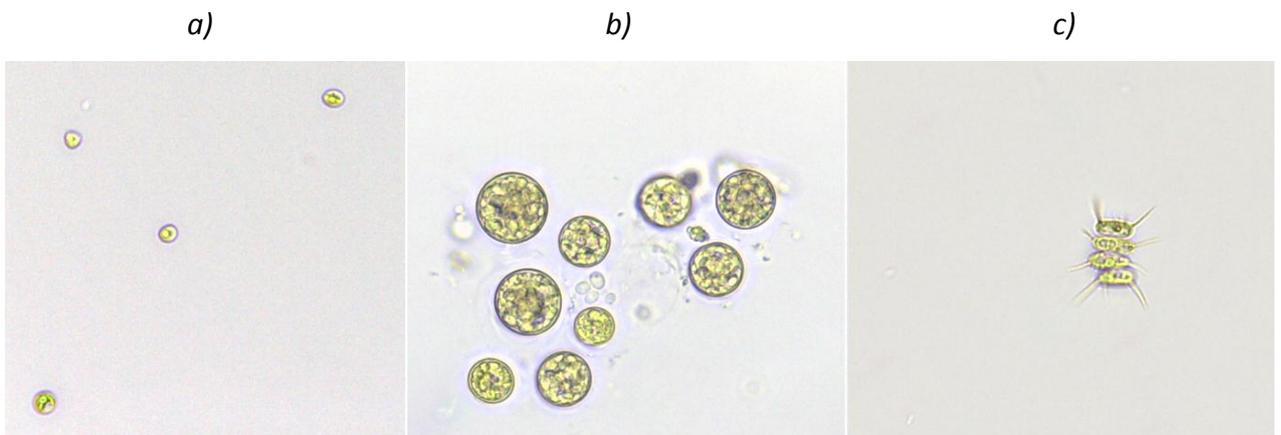


Fig. 7: Frotis de cultivos de distintas microalgas aisladas, observadas en microscopio óptico a 40x.  
 a) *Chlorella* spp. b) *Chlorococcum* spp. c) *Scenedesmus* spp.

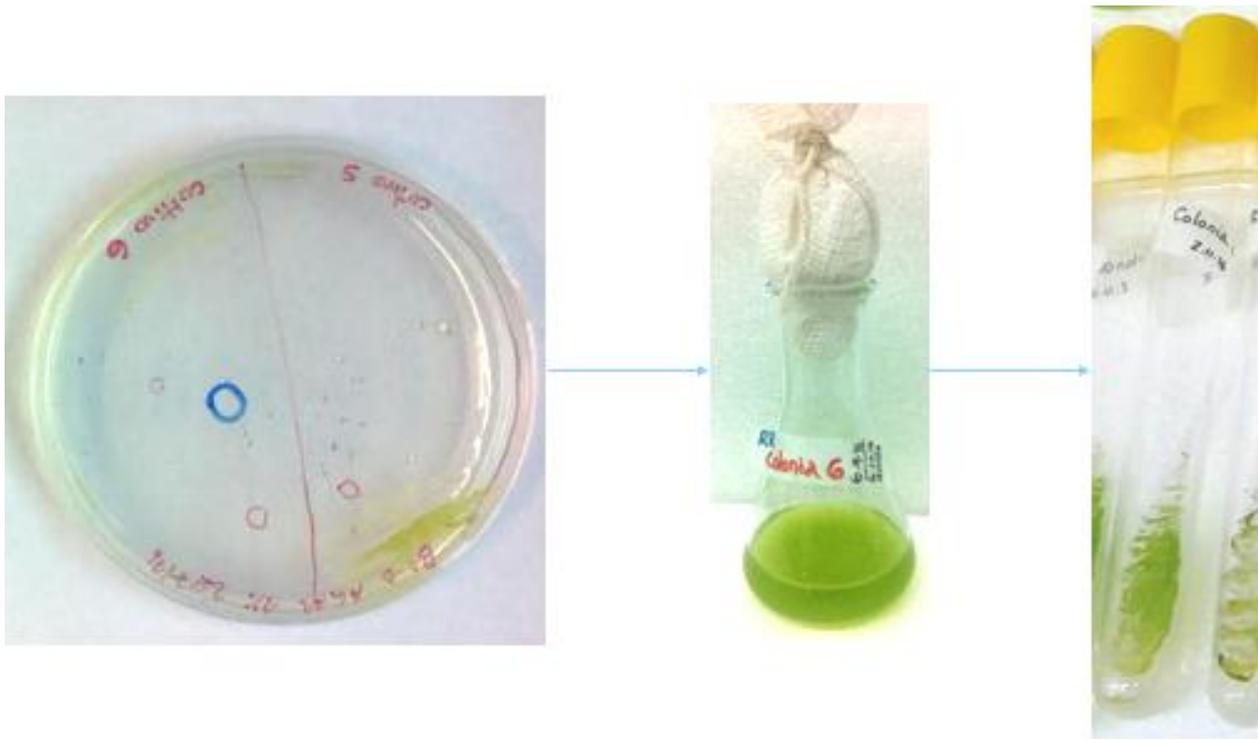


Fig. 8: Colonia individual 6, perteneciente al RR. Placa de la cual se tomaron nuevas colonias individuales para pasaje a Erlenmeyer y posterior sembrado en pico de flauta.

En el caso de *Scenedesmus* sp., se requirió de mayor cantidad de pasajes entre enriquecimientos y placas/Erlenmeyers debido a que no se observaba su crecimiento en placas, en las cuales se probó sembrar con medio Bold, agar al 1% y 2%, obteniéndose los mismos resultados para ambas concentraciones de agar. Se consideró la posibilidad de que existiera competencia con otras microalgas, por lo que se sembró el cultivo enriquecido en bajas concentraciones para obtener colonias más aisladas. No se observaron colonias claramente visibles de *Scenedesmus* sp., en este caso. Prolongando el tiempo de monitoreo de las placas sembradas, provenientes del enriquecimiento diluido, se observó que las colonias de *Scenedesmus* sp. se desarrollaron de manera más lenta que las de otras microalgas como *Chlorococcum* sp. Varias de estas colonias tardías fueron picadas y pasadas a medio líquido, de esta manera se obtuvieron tres cepas de *Scenedesmus* sp. del RR.

Producto de los protocolos de enriquecimiento y aislamiento se obtuvieron tres cultivos unialgales provenientes de las muestras del CTP y trece provenientes de las muestras del RR. Ejemplos representativos de aislamientos de ambos sitios se detallan al final de la sección de

resultados. En estos se incluyen el aspecto macroscópico de los cultivos y las características microscópicas de las cepas.

## **Caracterización**

### **Tinción con Oil Red O**

Se realizó la tinción de todos los cultivos. En los casos en los que se observó una tinción positiva y notoria del interior de la célula se consideró al cultivo como potencialmente oleaginoso. En la *Fig. 9 A* se muestra, a modo de ejemplo, una tinción negativa, tanto para agregados como células individuales. En el caso del panel B de la misma figura, que corresponde a la colonia 7 de *Scenedesmus* sp. del RR, no se observó tinción de los agregados pero sí de las células. La flecha indica un cenobio de 4 individuos, todos ellos positivos para O.R.O. Dada esta evidencia, esta cepa es considerada potencialmente oleaginoso. En el panel C se muestra un ejemplo de lo que se ha considerado como tinción positiva de agregados (material extracelular) y negativa de las células. Este ejemplo corresponde a la colonia 3 aislada del CTP.

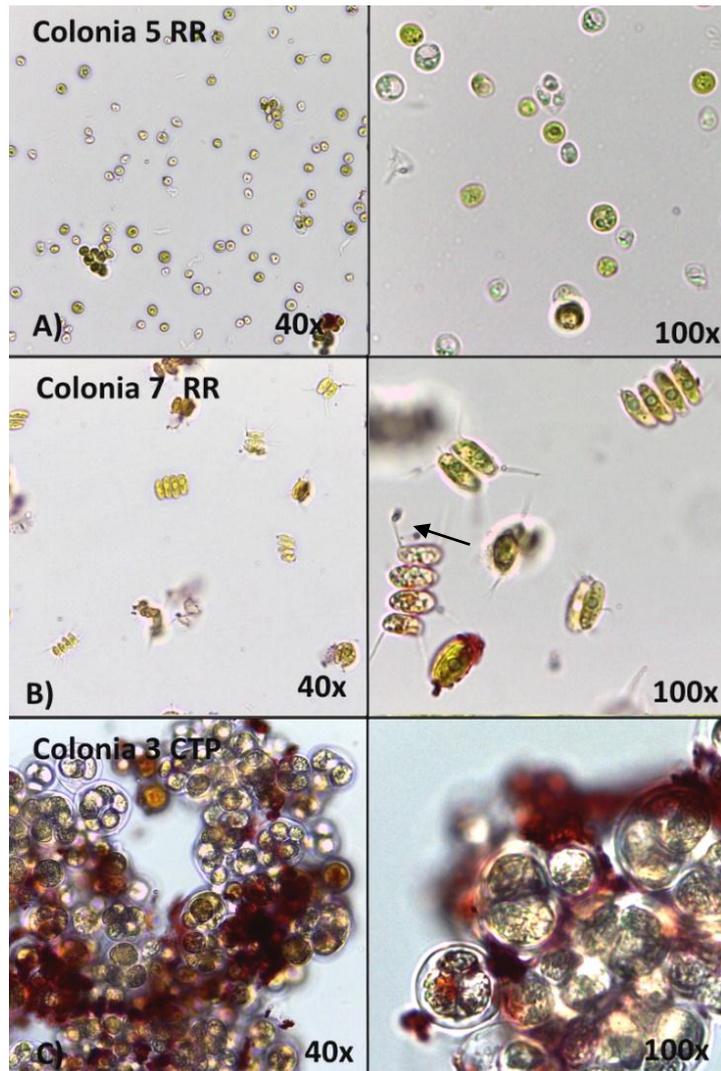


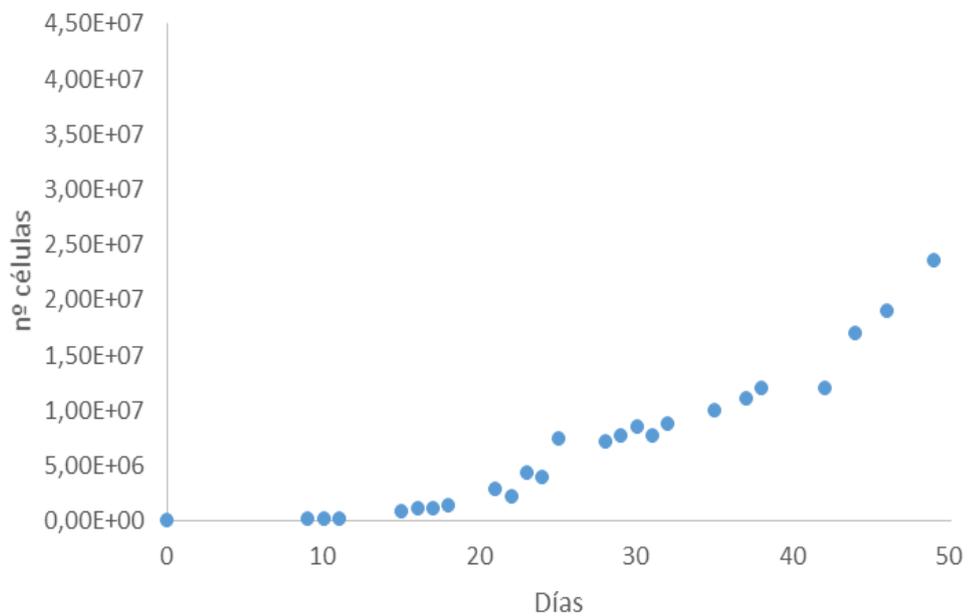
Fig. 9: Tinciones con Oil Red O de colonias del RR y del CTP.

### Curvas de crecimiento

Uno de los parámetros *especie* específicos que reviste especial importancia y utilidad es la tasa de crecimiento. Esta depende de determinadas variables de cultivo, siendo las más relevantes para especies fotosintéticas: la *intensidad lumínica* y la *temperatura*. Por otra parte, en otro orden de importancia, se encuentra la concentración de dióxido de carbono y la de nutrientes como nitrógeno y fósforo. Es por esto que parte de la caracterización de una cepa nueva consiste en determinar la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación en condiciones determinadas y controladas. A continuación se presenta, a modo de ejemplo, la determinación de la tasa de crecimiento de una de las cepas de *Scenedesmus* sp. del RR. Para esto se mantuvieron cultivos en las siguientes condiciones: 21 °C, cultivos en agitación, 50  $\mu\text{mol}$  foton

$m^{-2} S^{-1}$ . Sobre estos se realizaron conteos en cámara de Neubauer, por duplicado. Los conteos fueron suspendidos antes de alcanzar la fase estacionaria y la tasa de crecimiento específica se calculó en base a la fase de crecimiento exponencial. A partir de la pendiente de la gráfica del logaritmo de los datos del conteo en la fase exponencial (Fig. 10) se obtuvo un  $\mu=0.236$  para el cultivo de *Scenedesmus* sp. (cultivo 8 de RR), por lo que su tiempo de duplicación fue de 2.7 días en fase exponencial. El tiempo de duplicación, relativamente alto, se puede deber a la baja intensidad de luz del incubador.

A)



B)

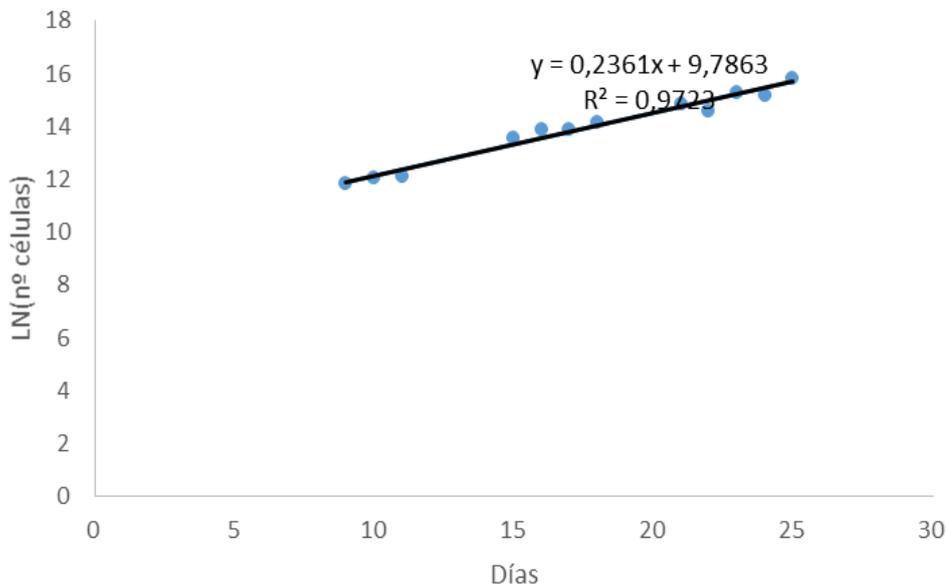


Fig. 10: A) Curva de crecimiento de la colonia 8 de *Scenedesmus sp.* de RR en fase exponencial, B) Logaritmo de los datos de la curva de crecimiento de la colonia 8.

### Evaluación de tipos de metabolismo

Los cultivos en *medio rico* presentaron crecimiento de bacterias en el caso de RR 12 y además un crecimiento de microalgas solo cuando se encontraron expuestas a la luz, es decir, no se consideraría mixotrófica. En cambio, RR 14 no presentó bacterias, por lo que se consideró como un cultivo axénico. Por otra parte, se observó un crecimiento de microalgas similar, tanto en luz como en oscuridad (se observaron colonias pequeñas). Estos resultados indican que RR 14 sería una cepa mixotrófica (Fig. 11).

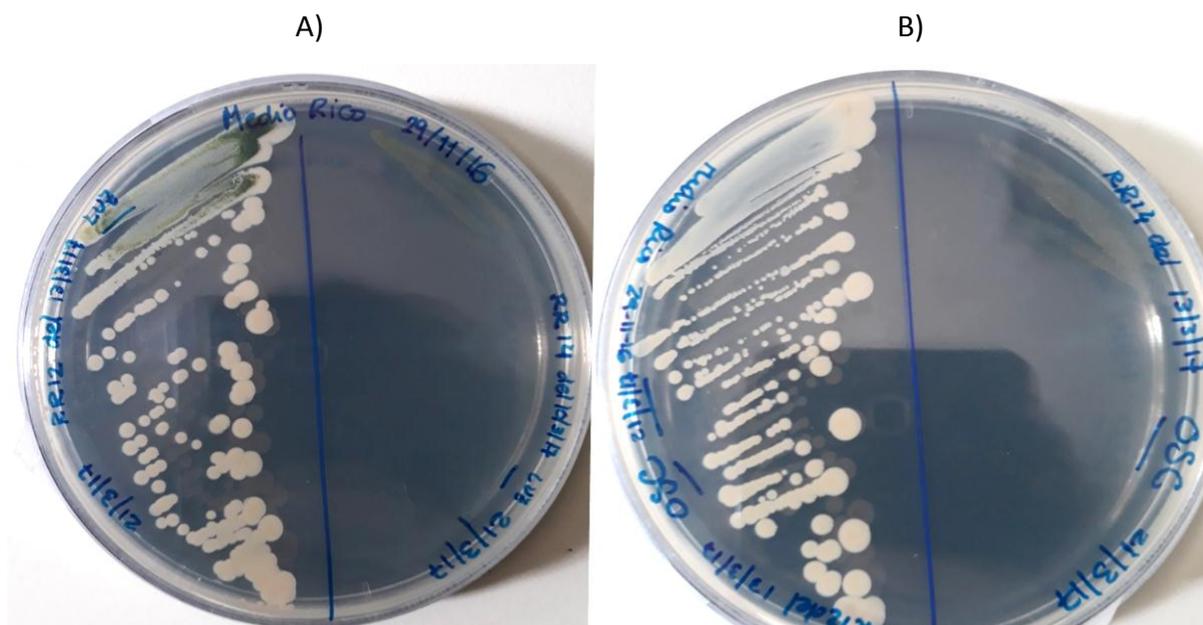
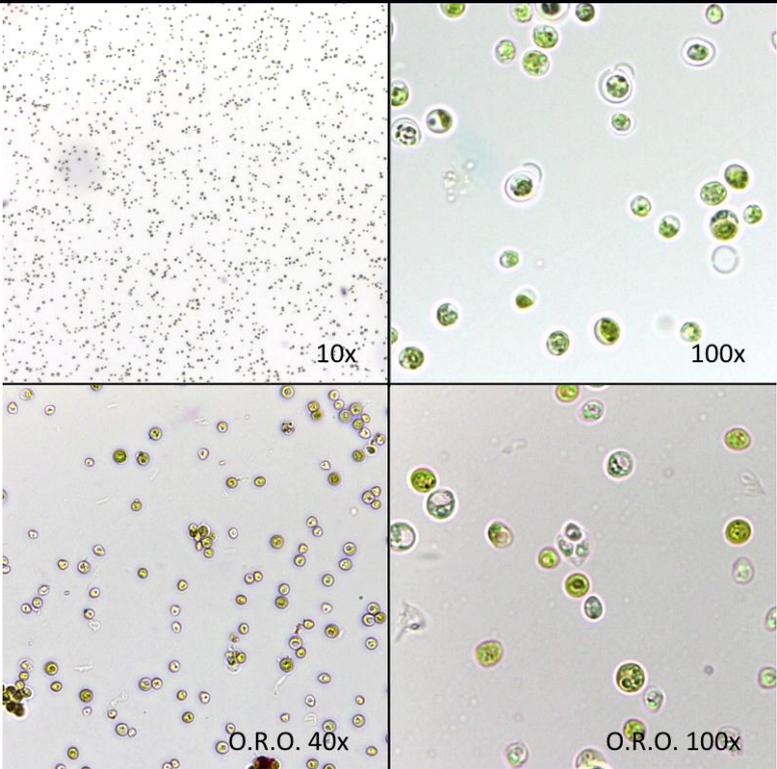
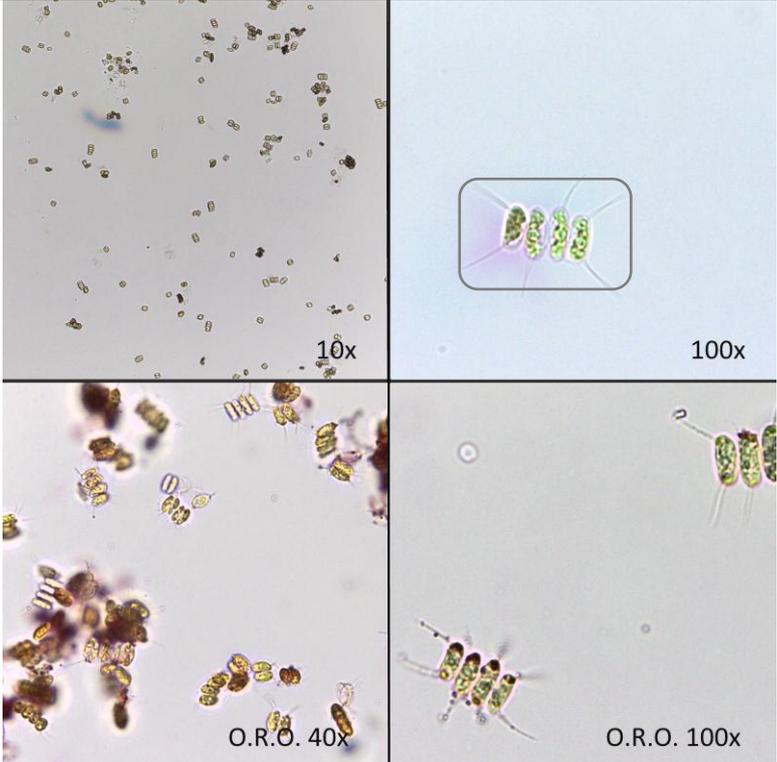


Fig. 11: Cultivos en medio rico en luz (A) y oscuridad (B) de las cepas RR 12 y RR 14.

## CEPAS AISLADAS

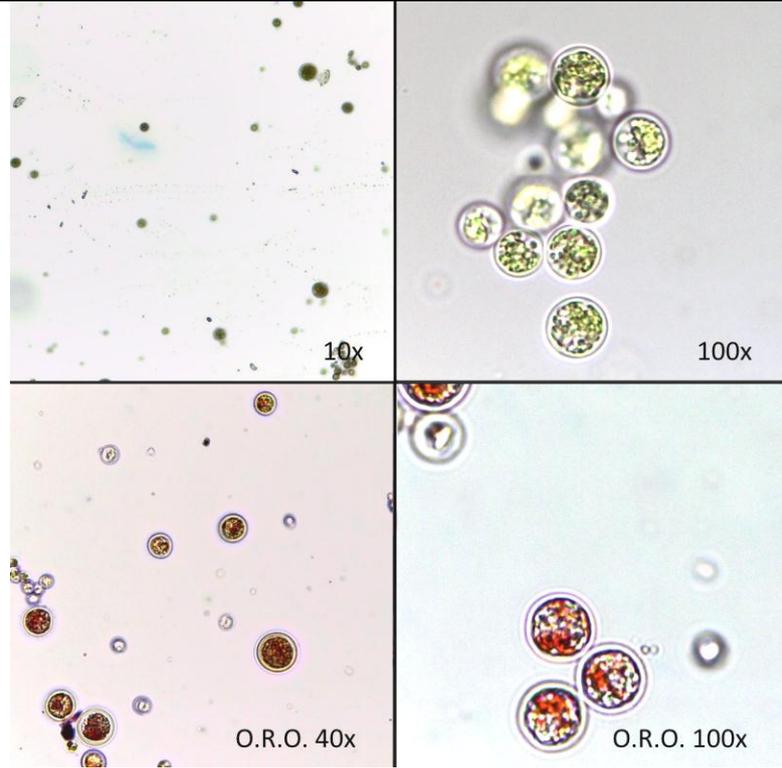
A continuación se presentan algunos ejemplos representativos de algunas de las cepas aisladas de ambos sitios (RR y CTP) (Fig. 12).

RÍO RECONQUISTA	
<p><b>Colonia 5</b></p>  <p>Observaciones: Se consideró que esta cepa pertenece al género <i>Chlorella</i>. En general no se observó en agregados sino como células individuales.</p>	
<p><b>Colonia 9</b></p>  <p>Observaciones: Esta cepa se consideró del género <i>Scenedesmus</i> y en general se observó en cenobios de 4 células con espículas (recuadro en 100x).</p>	

**Colonia 13**

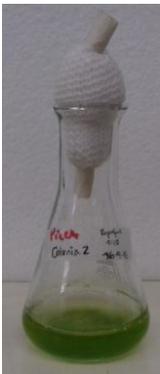


Observaciones:  
Potencial *Chlorococcea*, la cual se observó tanto en agregados como células individuales. Se la consideró potencialmente oleaginosa (tinción dentro de las células).

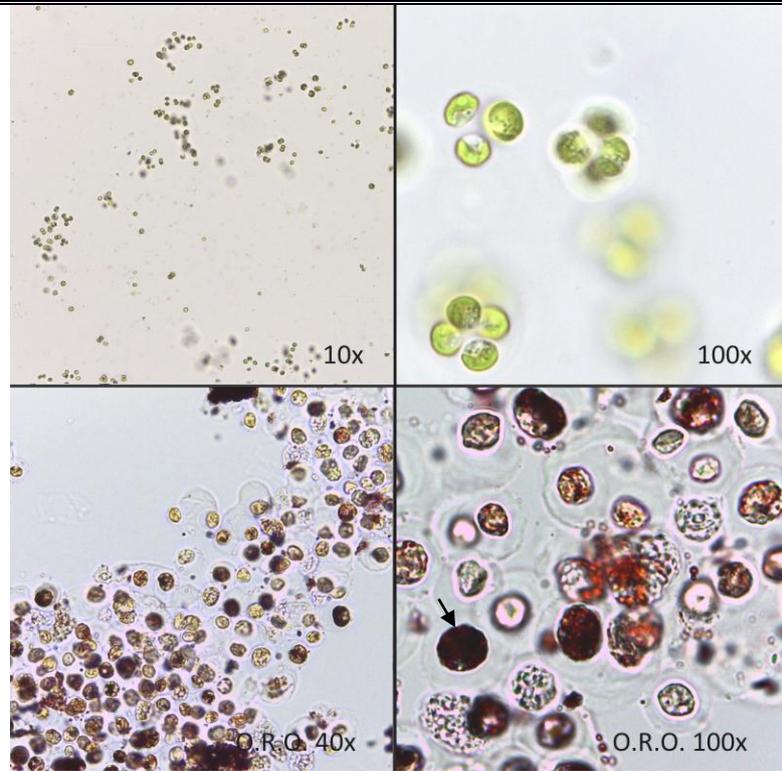


**CENTRO TECNOLÓGICO PILCANIYEU**

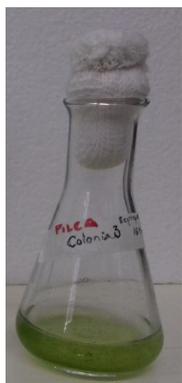
**Colonia 2**



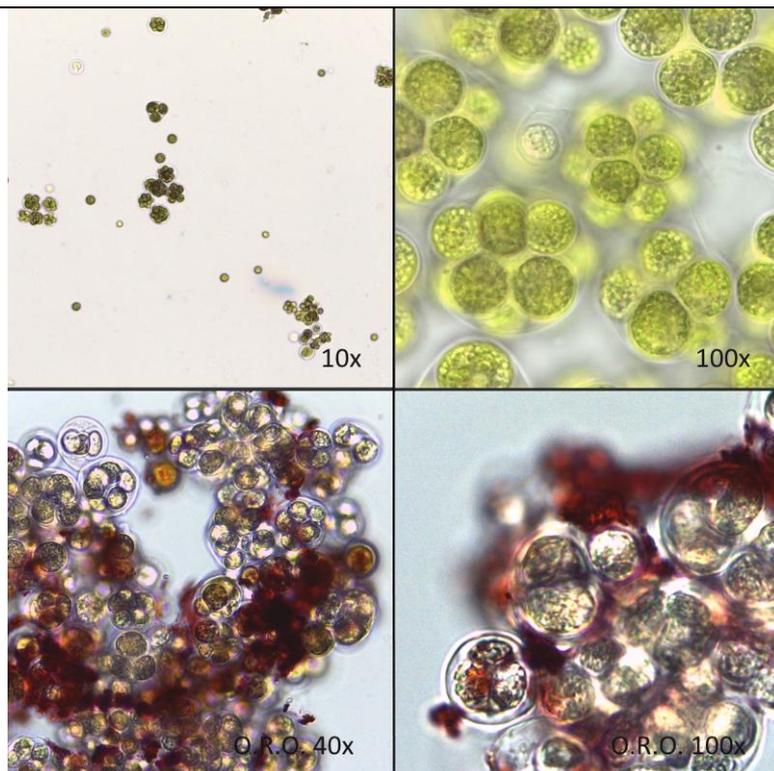
Observaciones:  
Se la observó en pequeños agregados o células individuales, en general. Potencialmente oleaginosas ya que se observó tinción dentro de las células (flecha en O.R.O 100x).



**Colonia 3**



Observaciones:  
 Se consideró esta cepa como Chlorococcacea. Se la observó generalmente en agregados pequeños. Presentó tinción de los agregados pero no de las células (no coloreadas).



Para mayor información respecto a las cepas contactarse con:

[carolina.bagnato@cab.cnea.gov.ar](mailto:carolina.bagnato@cab.cnea.gov.ar)

[gisela.ferraro@cab.cnea.gov.ar](mailto:gisela.ferraro@cab.cnea.gov.ar)

**CONCLUSIONES**

Se aislaron trece colonias a partir de las muestras de sedimento del RR y tres a partir de sedimentos del CTP. Se obtuvo, de esta forma, un cepario de algas con potencial biotecnológico perteneciente al Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable. Cabe mencionar que el cepario sigue aumentando en número de cepas, dado que continúan realizándose aislamientos de cuerpos de agua de la región de Bariloche. El presente informe compila la metodología a seguir en el aislamiento de especies de *algas verdes* (cloroficeas) y su caracterización, con vista a su aplicación en biotecnología. A lo largo del documento se presentan distintas cepas para ejemplificar las diferentes secciones.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] R. B. Derner, S. Ohse, M. Villela, S. M. De Carvalho, and R. Fett, "Microalgas, produtos e aplicações," *Ciência Rural*, vol. 36, no. 6, pp. 1959–1967, 2006.
- [2] Y. Chisti, "Biodiesel from microalgae beats bioethanol," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 3, pp. 126–131, 2008.
- [3] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 217–232, 2010.
- [4] S. H. Al-Iwayzy, T. Yusaf, and R. A. Al-Juboori, "Biofuels from the fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* (FWM-CV) for diesel engines," *Energies*, vol. 7, no. 3, pp. 1829–1851, 2014.
- [5] T. T. Y. Doan, B. Sivaloganathan, and J. P. Obbard, "Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock," *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 7, pp. 2534–2544, 2011.
- [6] M. Hannon, J. Gimpel, M. Tran, B. Rasala, and S. Mayfield, "Biofuels from algae: challenges and potential.," *Biofuels*, vol. 1, no. 5, pp. 763–784, 2010.
- [7] R. Hasan, "Bioremediation of Swine Wastewater and Biofuel Potential by using *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Chlamydomonas debaryana*," *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, vol. 5, no. 3, pp. 1–20, 2014.
- [8] S.-H. Ho et al., "Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy.," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, no. 1, p. 97, 2014.
- [9] M. A. Scranton, J. T. Ostrand, F. J. Fields, and S. P. Mayfield, "Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production," *Plant J.*, vol. 82, no. 3, pp. 523–531, 2015.
- [10] H. Xu, X. Miao, and Q. Wu, "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters," *J. Biotechnol.*, vol. 126, no. 4, pp. 499–507, 2006.
- [11] A. Guccione, N. Biondi, G. Sampietro, L. Rodolfi, N. Bassi, and M. R. Tredici, "Chlorella for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor.," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, no. 1, p. 84, 2014.
- [12] D. M. Mahapatra and T. V. Ramachandra, "Algal biofuel: Bountiful lipid from

- chlorococcum sp. proliferating in municipal wastewater,” Curr. Sci., vol. 105, no. 1, pp. 47–55, 2013.*
- [13] A. Karemore and R. Sen, “Green integrated process for mitigation of municipal and industrial liquid and solid waste mixes for enhanced microalgal biomass and lipid synthesis for biodiesel,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 87, pp. 70929–70938, 2015.
- [14] S. Swati, D. Sanjaykumar, and P. Raghunath, “Biodiesel Synthesis from Modern Energy Fuel Crop Green Algae *Chlorococcum humicola* and Its Chemical,” vol. 5, no. 8, pp. 6–9, 2015.
- [15] H. Tang, N. Abunasser, M. E. D. Garcia, M. Chen, K. Y. Simon Ng, and S. O. Salley, “Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel,” *Appl. Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3324–3330, 2011.
- [16] E. M. Fakhry and D. M. El Maghraby, “Fatty Acids Composition and Biodiesel Characterization of *Dunaliella salina*,” *J. Water Resour. Prot.*, vol. 2013, no. September, pp. 894–899, 2013.
- [17] M. K. Ji, H. S. Yun, Y. T. Park, A. N. Kabra, I. H. Oh, and J. Choi, “Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO<sub>2</sub> for biomass production,” *J. Environ. Manage.*, vol. 159, pp. 115–120, 2015.
- [18] M. Diaz and L. Pedrozo, “Seasonal sucesion of phytoplankton in a small Andean patagonian lake (Rep. Argentina) and some considerations about the PEG Model,” *Arch. Hydrobiol.*, vol. 127, no. 2, pp. 167–184, 1993.
- [19] K. Lee, L. Eisterhold, F. Rindi, P. Swaminathan, and P. Nam, “Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the Midwestern United States of America for biomass and biodiesel ... Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and bio,” *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, vol. 5, no. 2, 2014.
- [20] P. L. Klerks and J. S. Weis, “Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review,” *Environ. Pollut.*, vol. 45, no. 3, pp. 173–205, 1987.
- [21] R. A. Andersen, *Algal Culturing Techniques*, 2005th ed. 2005.
- [22] A. Bhatnagar, S. Chinnasamy, M. Singh, and K. C. Das, “Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters,” *Appl.*

*Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3425–3431, 2011.

- [23] M. R. Droop, “A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics,” vol. 6534, no. September, pp. 4–7, 2017.





En el presente documento se presentan ensayos preliminares para el aislamiento de cepas ambientales mediante técnicas comúnmente utilizadas para la obtención de cultivos unialgales. Estas técnicas constan de una serie de pasos que además permiten obtener cultivos limpios, sin presencia de bacterias u otros microorganismos. Todas las cepas aisladas pertenecen a las microalgas del grupo de las Chlorophytas y fueron aisladas de dos ambientes de agua dulce del país con distinto grado de contaminación.

Se realizó una caracterización de las distintas cepas mediante tinciones, curvas de crecimiento y se evaluaron los tipos de metabolismo de cada una de las mismas. De esta manera finalmente se obtuvo un cepario perteneciente al IEDS, que cuenta con quince cepas y se encuentra actualmente en uso para la realización de ensayos biotecnológicos.

Además, el presente informe presenta una descripción detallada de los métodos empleados convirtiéndolo en una herramienta metodológica experimental de gran utilidad para consulta de integrantes del IEDS así como para la comunidad científica en general.

INSTITUTO DE ENERGÍA Y DESARROLLO SUSTENTABLE  
Comisión Nacional de Energía Atómica

SEDE CENTRAL  
Av. del Libertador 8250  
1429 - C. A. de Buenos Aires  
Tel.: 011 4704 1485

CENTRO ATÓMICO BARILOCHE  
C.C. 439 - 8400 Bariloche  
Pcia. de Río Negro  
Tel.: 0294 444 5221

[www.cab.cnea.gov.ar/ieds](http://www.cab.cnea.gov.ar/ieds)  
[ieds@cnea.gov.ar](mailto:ieds@cnea.gov.ar)

DISEÑO DE TAPA E INTERIOR: Lic. Stella Maris Spurio