

OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN CO-CULTIVO DE MICROALGAS INMOVILIZADAS EN ALGINATO

David Barroeta Bonilla^a, Kevin Luis Vinalay Romero^a, Bárbara Arteaga Ballesteros^b, Rocío Ramírez Rodríguez^c

^aEstudiantes de Ingeniería Biomédica, Departamento de Ciencias e Ingenierías, Universidad Iberoamericana Puebla, Pue.

189830@iberopuebla.mx, 188315@iberopuebla.mx

^bInstituto de Diseño e Innovación tecnológica (IDIT), Universidad Iberoamericana Puebla, Pue.

^cDepartamento de Ciencias e Ingenierías, Universidad Iberoamericana Puebla, Pue.

rocio.ramirez.rodriguez@iberopuebla.mx

RESUMEN

La celulosa bacteriana (CB) es un polisacárido producido por un bacterias aerobias y levaduras, tales como *Gluconacetobacter* y *Acetobacter*. Por sus propiedades la CB ha sido ampliamente recomendada como biomaterial en el campo médico, además su estructura puede ser modificada mediante la adición de otros componentes. Este trabajo desarrolló un sistema de co-cultivo de bacterias formadoras de CB y microalgas inmovilizadas (AI) en alginato (*Desmodesmus* sp.) con la finalidad de optimizar el suministro de oxígeno. Además, en uno de los experimentos se incorporó gel aloe vera (3%) para modificar las propiedades finales de la CB. Se obtuvo alta producción de biomasa húmeda (5.7 gr.) en presencia de AI y gel de aloe vera. No obstante, se observaron cambios en la coloración de las microalgas, por lo tanto, es necesario modificar el medio de cultivo para no afectar la fisiología de las microalgas.

Palabras claves: Cocultivo, Inmovilización, Alginato, SCOPY

ABSTRACT

Bacterial cellulose (CB) is a polysaccharide produced by aerobic bacteria and yeasts, such as *Gluconacetobacter* and *Acetobacter*. Due to its properties, CB has been widely recommended as a biomaterial in the medical field, also their structure can be modified by addition of other components. This work developed a system of co-culture of CB-forming bacteria and immobilized microalgae (AI) in alginate (*Desmodesmus* sp.) in order to optimize the oxygen supply. In addition, one of the experiments incorporated aloe vera gel (3%) to modify the final properties of the CB. High production of biomass (5.7 gr.) was obtained in the presence of AI and aloe vera gel. However, changes in the coloration of the microalgae were observed, therefore, it is necessary to modify the culture medium so as not to affect the physiology of the microalgae.

Keywords: Co-Culture, Immobilization, Alginate, Scoby

1. INTRODUCCIÓN

La celulosa bacteriana (CB) es un biopolímero de apariencia gelatinosa y translúcida formada por microfibras de celulosa (β -D – unidades de glucosa). Es producida de manera extracelular por diversos géneros de bacterias gran negativas como: *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Alcaligenes*, entre la que destaca *Gluconacetobacter* como la mejor productora. Se ha demostrado que la implementación de levaduras mejora la producción de CB, creando el SCOBY (symbiotic cultivo of bacteria and yeast) [1].

La CB, en comparación con la celulosa vegetal, tiene baja densidad, alta fuerza tensil, alto grado de cristalinidad (80-90%); en estado húmedo es porosa y es relativamente permeable a los gases. Además, por su alta pureza, su capacidad de retención del agua es un biomaterial con enorme potencial en el área médica [2]. No obstante, la CB carece de efecto antimicrobiano, conductividad, antioxidante que limitan su aplicación, pero son solventadas mediante la adición de otros compuestos durante el cultivo lo cual amplifica su empleo [3,4].

Comúnmente, para la CB se obtiene medios de cultivo como: BEGG, infusión de té negro o verde, agua de coco) sumado a los siguientes requerimientos ambientales: oxígeno, temperatura (20 – 30 °C), pH entre 3 y 4 [5,11]. Se han reportado diversos métodos de cultivo, tales como el cultivo estático y el dinámico, los cuales modifican morfológicamente el producto final [6,12].

Desde hace más de veinte años, la técnica de co-cultivo surgió como un método en la que se permite el crecimiento de dos (o más) especies en conjunto con la finalidad favorecer la producción celular objetivo o la síntesis de algún compuesto de interés [6,9,10]. En estos sistemas se han empleado microalgas en co-cultivos con levaduras (*Rhodotorula glutinis*) y bacterias (*Dinoroseobacter shibae*), donde las algas suministran el O₂ para los organismos heterótrofos que a su vez proveen de CO₂ requerido para las algas [7,8,11].

Con base en lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo la obtención de celulosa bacteriana en un sistema de co-cultivo con algas inmovilizadas en esferas de alginato, así mismo, identificar si el gel de aloe vera la producción de biomasa húmeda de CB.

2. PARTE EXPERIMENTAL

a. Inmovilización de microalgas

La cepa *Desmodesmus* sp (Chlorophyta) fue aislada de la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, UNAM y se cultivaron en medio BBM en matraces de 250 mL en las siguientes condiciones de laboratorio: temperatura 29 °C; intensidad luminosa: 95 μ moles s⁻¹ fotoperiodo: 12:12 horas luz: oscuridad. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de esterilidad.

Para la inmovilización del cultivo de *Desmodesmus* se siguió la metodología descrita en [cita] Ponce *et. al.* 2019 la cual consistió en la elaboración de una solución de alginato de sodio (3%) en H₂O_d, la cual fue calentada a 60 °C en agitación constante en una parrilla (Corning PC 420D) hasta su completa disolución. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. A la solución de alginato se le agregaron 10 ml de cultivo concentrado de microalgas. El concentrado de microalgas se obtuvo mediante un previo cultivo de algas (*Desmodesmus* sp.).

Para la elaboración de las esferas de alginato se empleó una solución de CaCl₂ al 2%, en las que se vertieron gotas de la mezcla de alginato con una pipeta Pasteur estéril. Las esferas resultantes fueron medidas con un vernier.

b. Elaboración de medio de cultivo para la obtención de CB

Se prepararon 1,800 ml de medio de cultivo de infusión de té negro con las siguientes proporciones: té negro (6 gr/L), azúcar de mesa (114.0 gr/ L). El pH se ajustó con ácido acético glacial hasta alcanzar un pH de 3 - 4. Se midieron los grados Brix (BX) con el refractómetro (ATAGO 1T).

c. Establecimiento de co-cultivos

Se realizaron cuatro tipos de cultivo en réplica de tres de acuerdo con la nomenclatura que se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Nomenclatura del diseño experimental

Tipo de cultivo	Clave
Cultivo control	C
SCOBY + Aloe vera	SAV
SCOBY + Algas inmovilizadas	SA
SCOBY + Algas inmovilizadas +SAAV Aloe vera	

Se agregaron 150 mL de infusión de té a frascos de cristal previamente esterilizados, todos los cultivos fueron inoculados con 1.5 ml de inóculo de SCOBY. El tipo de cultivo C únicamente contenía el inóculo de SCOBY; el cultivo SAV se le adicionó 5 ml gel aloe vera natural; el SA se añadió 100 esferas de algas inmovilizadas y finalmente el SAAV se le adicionó 100 esferas de microalgas y además 5 ml de gel de aloe vera natural.

Los cultivos se mantuvieron en el laboratorio de microalgas de la Universidad Iberoamericana Puebla a temperatura ambiente (23 °C); intensidad luminosa de 95 μ moles m⁻² s⁻¹ en un fotoperiodo de 12h:12h / luz: oscuridad simulando un ambiente natural de un ciclo circadiano. Los cultivos se revisaron diariamente y fueron mantenidos por un periodo de tres semanas.

Al finalizar la fase de experimentación, las esferas de algas inmovilizadas se les realizaron un corte transversal y fueron revisadas en un microscopio estereoscópico (Leica EZ4) y un microscopio óptico (Leica DM 500) con la finalidad de comprobar el estado de las microalgas

La CB húmeda fue pesada y medida, las muestras fueron deshidratadas por 24 horas en el invernadero de microalgas. Se obtuvieron los pesos secos de la CB (tabla 2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mayor grosor y peso húmedo de la CB se observó en el cultivo C que obtuvo valores promedio de 6.9 mm y 22.6 gr respectivamente. Contrariamente el cultivo SA presentó los valores más bajos (2.2 mm y 6.5 gr.) (Tablas 2). No obstante, de estos valores no solo indican el valor de la biomasa si no también la cantidad de agua retenida. El cultivo SAAV fue el que mayor producción de biomasa seca obtuvo (2.0 gr).

Tabla 2. Promedios de grosor, peso húmedo y peso seco de la CB

Tipo de cultivo	Grosor (mm)	Peso húmedo (gr)	Peso seco (gr)
C	6.9 ± 1.9	22.6 ± 6.1	1.9 ± 0.2
SAV	3.0 ± 0.6	8.7 ± 2.1	0.8 ± 0.1
SA	2.3 ± 0.3	6.5 ± 1.4	1.0 ± 0.1
SAAV	5.7 ± 0.7	19.5 ± 2.7	2.0 ± 0.3

Durante la fase de experimentación se observaron cambios en la coloración de las esferas con algas inmobilizadas, en la etapa inicial fue verde brillante (Fig. 1 a) y al final se presentaron tonalidades amarillentas (Fig. 1 c). Lo cortes transversales reflejaron que las células de microalgas perdieron su integridad, al sufrir daños en sus paredes celulares. Estos cambios se atribuyen a dos posibles factores, en primer lugar, la acidez (pH = 3 - 4) del medio de cultivo, generalmente, *Desmodesmus* sp. crecen en un óptimo de pH = 7, a pesar de que las algas estuvieron protegidas del medio externo, sin embargo, la matriz de alginato es lo suficientemente porosa para permitir la entrada de H⁺ por difusión simple afectando significativamente a la fisiología de las algas. En segundo, la coloración oscura del té negro impide la incidencia de fotones al interior de las esferas. Los resultados fueron favorables, ya que las microalgas lograron permanecer vivas, siendo muy parecidas las imágenes observadas de las esferas en etapa inicial y las esferas al final del cultivo (Figura 1 d).

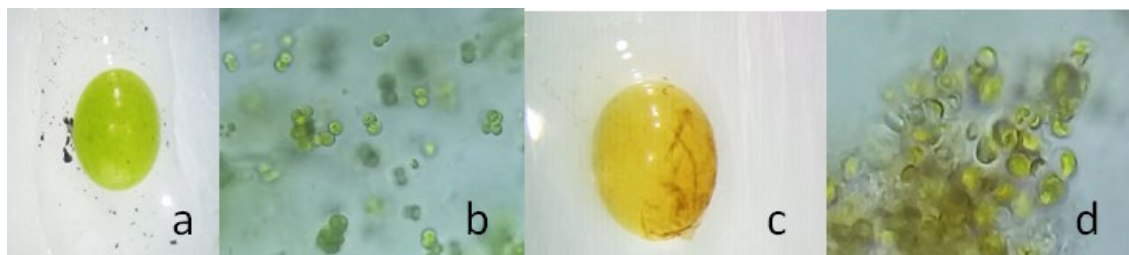


Figura 1. Algas inmobilizadas en esferas observadas en microscopio estereoscópico y corte transversal con aumento x40 en microscopio óptico. a) esfera al inicio de la experimentación; b) corte transversal al inicio x40; c) esfera al final del experimento y d) corte transversal al final del experimento x40

La obtención de CB con esferas inmobilizadas no resultó favorable porque el peso en grosor fue menor al del cultivo C (Fig. 5), lo cual se puede deber a varios factores: 1) el té negro obstruía el paso de los fotones de luz a las algas 2) el té no contaba con los nutrientes

necesarios para el crecimiento de las microalgas 3) el pH pudo fue el óptimo para el cultivo de microalgas, 6) el tamaño de las esferas pudo no ser el óptimo.

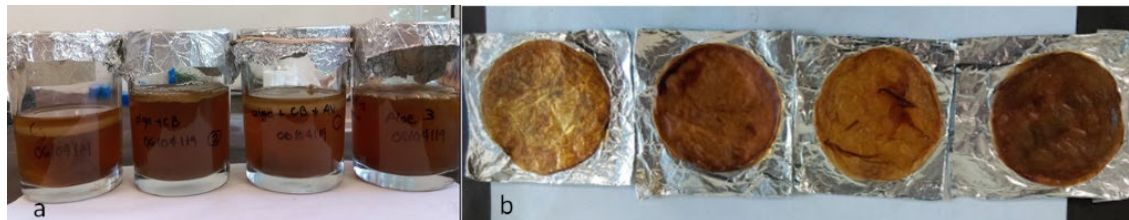


Figura 2. -a) CB obtenida al finalizar la experimentación. De izquierda a derecha se representan: C3, SA 3, SAAV 1, SAV 3. B) Muestras deshidratadas obtenidas al finalizar la experimentación. De izquierda a derecha se representan: C3, SA 3, SAAV 1, SAV 3

4. CONCLUSIONES

La producción de CB en el medio SAAV comprueba que el agregar algas y aloe vera al medio de cultivo favorece a la misma. Se obtuvieron valores estables en su producción, con la ventaja de encontrarse funcionalizada al mismo tiempo.

Las microalgas sufrieron un daño parcial en la estructura de sus paredes celulares, por lo que el medio de cultivo deberá ser modificado para proporcionar apoyo tanto a las bacterias como a las algas. Para esto se sugiere cambiar el té empleado por uno más claro para permitir el paso de los fotonones a las algas, subir el nivel del pH o encontrar una especie con una mayor resistencia al medio ácido, reemplazar el uso de las esferas por una figura con mayor superficie de contacto y agregar nutrientes para el alga en el medio.

5. REFERENCIAS

- [1] Rojas, G., Vallejo, B., & Perilla, E., [Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico], Revista de ingeniería e investigación, 57-71 (2008).
- [2] Saibuatong, O., & Phisalaphong, M., [Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis] ELSEVIER, Carbohydrate Polymers, 455-460 (2010).
- [3] Pereira, R., Mendes, A., & Bártolo, P., [Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications], The First CIRP Conference on Biomanufacturing, 210-215 (2013).
- [4] Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, [Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis], EL SEVIER, Thailand 455-460 (2009).
- [5] Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W., & Park, J., [Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material] ELSEVIER, Carbohydrate Polymers, 1585-1598 (2010).
- [6] Zeyneloğlu, H., Kahraman, S., & Pirkevi, C., [Co-culture techniques in assisted reproduction: history], Co-culture in ART, 29-40 (n.d.)

- [7] Ul- Islam, M., Khan, S., Ullah, M., & Park, J., [Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields] *Biotechnology Journal*, 184-1861 (2015).
- [8] Ponce, M., Ramírez, R., & Ramírez, M., [Algas de la Cantera Oriente, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: guía de campo y laboratorio], las prensas de ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México (2019).
- [9] Padmaperuma, G., Vijay, R., Gilmour, D., & Vaidynathan, S. [Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing], *Critical reviews in biotechnology*, 690-703 (2018).
- [10] Carter, M., & Shaieh, J. Cell culture techniques. In M. Carter, & J. Shaieh, [Guide to Research Techniques in Neurosciences], Academic press, 295-310 (2015).
- [11] Rojas, G., Vallejo, B., & Perilla, E., [Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico], *Revista de ingeniería e investigación*, 57-71 (2008).
- [12] Stumpf, T., Yang, X., Zhang, J., & Cao, X., [In Situ and Ex Situ Modifications of Bacterial Cellulose for Applications], *Material Science and Engineering*, 4-30 (2016).