

## PROPAGACIÓN DE LA MICROALGA *Chlorella sp.* EN CULTIVO POR LOTE: CINÉTICA DEL CRECIMIENTO CELULAR

### CULTIVATION OF *Chlorella sp.* MICROALGAE IN BATCH CULTURE: CELL GROWTH KINETICS

**Cherlys Infante<sup>1\*</sup>, Edgardo Angulo<sup>2</sup>, Ana Zárate<sup>2</sup>, July Z. Florez<sup>2</sup>, Freddy Barrios<sup>1</sup>, Cindy Zapata<sup>1</sup>**

(1) Universidad de Cartagena-sede Zaragocilla, campus de la salud, Facultad de Ciencias Farmacéuticas,  
calle de la Universidad No 36-100, Cartagena - Colombia

(2) Universidad del Atlántico, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología,  
Km 7 antigua vía a Puerto Colombia, Barranquilla - Colombia

\*autor de contacto (e-mail: fabencal2003@yahoo.com)

Recibido: 23/03/2011 - Evaluado: 30/05/2011 - Aceptado: 20/07/2011

#### RESUMEN

En este trabajo, se estudia el crecimiento de *Chlorella sp.*, un alga microscópica, ampliamente distribuida en aguas marinas, con el fin de observar su comportamiento en cultivo por lote. El diseño experimental contempló la obtención de la biomasa de la microalga, utilizando un medio preparado con sales inorgánicas. Se obtuvo información acerca de la reproducibilidad de los ensayos realizados, estableciendo que se trata de un microorganismo de fácil propagación. Este resultado a su vez posibilita la aplicación de la microalga a diferentes estrategias para la remoción de sustancias nocivas presentes en los ecosistemas. El cultivo por lotes resulta adecuado para la obtención de biomasa de *Chlorella sp.* observándose un ajuste lineal para la cinética de crecimiento. Los resultados obtenidos son una contribución al proyecto de investigación en el área de biosorción, que actualmente se desarrolla en conjunto la Universidad de Cartagena y la Universidad del Atlántico (Colombia).

#### ABSTRACT

Around this problem it was proposed to study the growth of *Chlorella sp.*, a microscopic algae, widely distributed in marine waters, in order to observe their behavior in batch culture. The experimental design allowed growing the microalgae biomass by using a medium prepared with inorganic salts. Information was obtained about the reproducibility of the tests, yielding an easily spreading culture. This result in turn enables the application of microalgae to different strategies for the removal of harmful substances in ecosystems. The batch culture is suitable for obtaining biomass of *Chlorella sp.* a linear fit to observed growth kinetics. The results are a contribution to the research project in the field of biosorption, which is currently developed in conjunction Cartagena University and the Atlántico University (Colombia).

Palabras clave: microalgas; *Chlorella sp.*; cultivo por lote; crecimiento celular  
Keywords: microalgae; *Chlorella sp.*; batch culture; cell growth

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas marinas son productores primarios y como tales cumplen una función esencial en esos ecosistemas. Su importancia en el consumo humano se basa en su contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Las algas han sido utilizadas ampliamente en procesos de biorremediación con el fin de remover metales pesados y materia orgánica. Los componentes de su pared celular contribuyen a su capacidad para retener variados contaminantes ambientales presentes en cuerpos de agua. Es deseable obtener suficiente biomasa algal para poder aplicarla al desarrollo de materiales biosorbentes.

*Chlorella sp.*, es un alga verde de forma elipsoidal, la cual crece en forma de células simples. Pertenece a la división Chlorophyta y a la clase de las Chlorophyceae. Se ha cultivado de forma intensiva con fines de alimentación y obtención de metabolitos. El sistema por lote es el más utilizado a gran escala por su bajo riesgo de contaminación y fácil implementación.

Este género ha sido aplicado al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y metales (Garza *et al.*, 2010). Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos (Garza *et al.*, 2010).

La cinética de crecimiento lineal bajo condiciones autótrofas ha sido observada en presencia de aire en experiencias realizadas durante doce días con cultivos de *Chlorella vulgaris* (Liang *et al.*, 2009). Otros estudios se han orientado a la determinación de la influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo sobre el peso seco, el porcentaje de lípidos y proteínas de esta microalga, obteniendo variaciones mínimas en el peso seco pero bastante significativas en el contenido proteico y lipídico (Mutlu *et al.*, 2011).

Las aplicaciones que tienen como objetivo la producción de lípidos, han realizado observaciones sobre cultivos por lote con limitación del nitrógeno ureico, obteniendo tanto un aumento en el peso seco celular, debido a la acumulación de lípidos, como un aumento de velocidad específica de crecimiento celular hasta un valor límite de concentración de urea (Hsieh & Wu, 2009).

Entre las ventajas de su uso como biosorbente, resaltan su abundancia, facilidad de cultivo, presencia de sitios ligantes para iones metálicos y habilidad para crecer tanto autotróficamente como mixotróficamente (Fu-Ying *et al.*, 2005).

Este trabajo se realizaron cultivos por lote a nivel de laboratorio de la microalga *Chlorella sp.* para garantizar la disponibilidad de esta biomasa en condiciones reproducibles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo puro de la cepa de *Chlorella sp.* fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad del Atlántico (Colombia).

Para la obtención de la biomasa de *Chlorella sp.*, se preparó el medio de cultivo con una concentración 4mM de N, a partir de un fertilizante comercial, éste fue distribuido en seis recipientes de vidrio de 5000 ml y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C. Cada recipiente se inoculó con  $1 \times 10^6$  ufc de microalgas de una suspensión de un cultivo puro de la cepa de *Chlorella sp* con densidad óptica (D.O) de 0.1.

Los cultivos se mantuvieron a 30°C, con aireación y en presencia de luz durante 15 días, fotoperíodo de 12:12h, para favorecer el crecimiento del microorganismo (Sánchez *et al.*, 2008). La iluminación fue suministrada con lámparas fluorescentes a todos los cultivos.

Los procesos estuvieron en constante agitación mediante bombas de aire ac-1500, las cuales proporcionaron 2.25 LO<sub>2</sub>/min para evitar la sedimentación de las algas y permitir su homogenización en el reactor

El crecimiento se determinó mediante turbidimetría a 660 nm, utilizando un espectrofotómetro Cole Parmer modelo s2100uv+, monitoreando cada cultivo en intervalos fijos de 24 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El seguimiento a los cultivos por lote realizado cada 24 horas mostró un aumento progresivo de los valores de absorbancia, evidenciando el crecimiento celular. La Tabla 1 contiene los resultados correspondientes a cada ensayo.

La Figura 1 muestra el comportamiento de la cinética del crecimiento celular, en todos los casos se puede observar una lenta fase de adaptación y una fase de crecimiento que se aleja del modelo exponencial. Los datos de absorbancia tienen poca variación entre procesos, especialmente los primeros ocho días de cultivo.

Tabla 1: Valores de absorbancia obtenidos en el seguimiento de los cultivos de *Chlorella sp.*

| Días \ cultivo | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1              | 0,12  | 0,112 | 0,1   | 0,11  | 0,106 | 0,121 |
| 2              | 0,133 | 0,146 | 0,128 | 0,134 | 0,137 | 0,148 |
| 3              | 0,222 | 0,22  | 0,171 | 0,173 | 0,22  | 0,221 |
| 4              | 0,307 | 0,301 | 0,242 | 0,252 | 0,302 | 0,29  |
| 5              | 0,392 | 0,383 | 0,313 | 0,331 | 0,384 | 0,36  |
| 6              | 0,434 | 0,46  | 0,34  | 0,44  | 0,507 | 0,511 |
| 7              | 0,524 | 0,547 | 0,518 | 0,484 | 0,534 | 0,535 |
| 8              | 0,648 | 0,641 | 0,595 | 0,568 | 0,629 | 0,628 |
| 9              | 0,772 | 0,736 | 0,673 | 0,652 | 0,725 | 0,722 |
| 10             | 0,875 | 0,857 | 0,797 | 0,779 | 0,758 | 0,759 |
| 11             | 0,958 | 0,941 | 0,878 | 0,82  | 0,84  | 0,824 |
| 12             | 1,042 | 1,025 | 0,959 | 0,861 | 0,923 | 0,89  |
| 13             | 1,097 | 1,07  | 0,991 | 0,901 | 1,028 | 0,999 |
| 14             | 1,128 | 1,115 | 1,059 | 0,939 | 1,034 | 1,025 |
| 15             | 1,186 | 1,126 | 1,149 | 1,072 | 1,111 | 1,091 |

Las Figuras 2 y 3 muestran el crecimiento celular en los cultivos 1 y 6 con las líneas de tendencia exponencial y lineal.

Los coeficientes de correlación lineal fueron muy superiores (0.98 a 0.99) a los coeficientes de correlación exponencial en todos los ensayos.

Comparando los resultados de este trabajo con los obtenidos por Wang *et al.* (2010), quienes cultivaron esta microalga en aguas residuales durante un periodo de nueve días, se puede establecer que los valores de densidad óptica fueron similares en tres de los casos reportados por estos autores, pero inferiores a los obtenidos con un tipo especial de agua residual. La tendencia lineal en la curva de crecimiento celular también se puede observar en los datos reportados por estos autores.

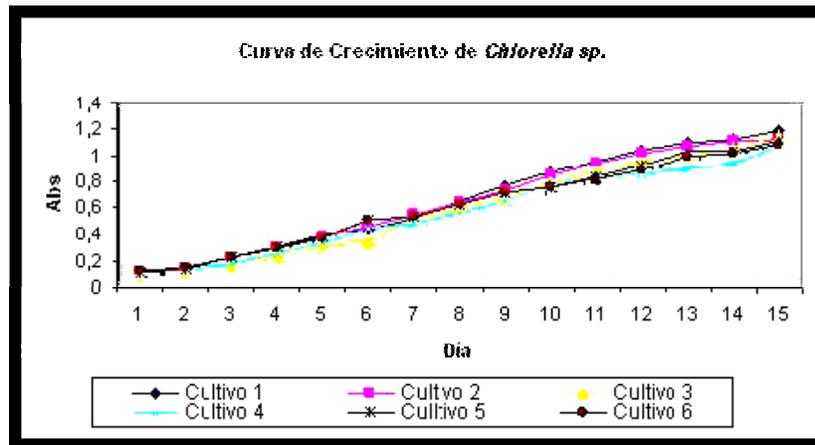


Fig. 1: Curva de crecimiento de *Chlorella sp.* Cultivo 1 al 6

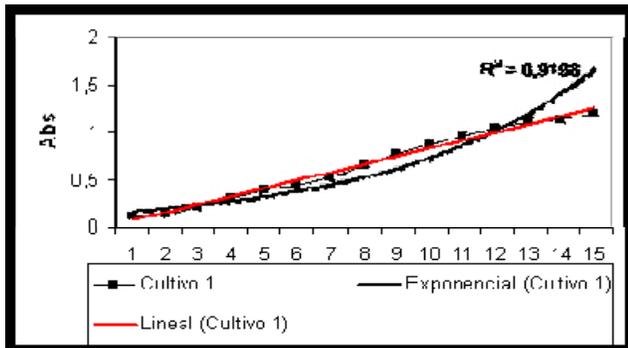


Fig. 2: Curva de crecimiento de *Chlorella sp.* cultivo 1

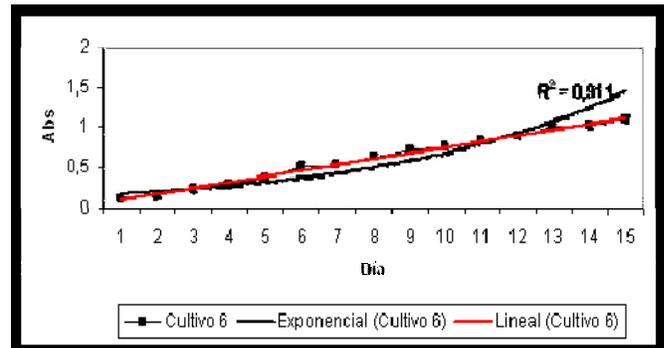


Fig. 3: Curva de crecimiento de *Chlorella sp.* Cultivo 6

Kastanek *et al.* (2010), cultivaron esta microalga utilizando como fuente de carbono el CO<sub>2</sub> de una unidad de cogeneración. El crecimiento celular expresado como peso seco mostró un comportamiento lineal, lo cual está de acuerdo con los resultados generados en este estudio.

Los resultados obtenidos por Bashan *et al.* (2002), cuando realizaron el cultivo por lote con algas de este mismo género, también mostró una cinética de crecimiento de tipo lineal, en este caso utilizaron agua residual sintética como medio de propagación y co-inmovilización en esferas de alginato; en nuestro estudio la microalga creció en forma libre como célula simple, sin embargo, se repite la tendencia al modelo lineal.

En estudios de propagación de *C. vulgaris* en cultivo continuo Ras *et al.* (2011), obtuvieron valores altos de concentración celular en un proceso acoplado a una unidad de digestión anaeróbica; a diferencia de los resultados de este estudio, las muestras requirieron de previa dilución a fin de lograr una buena precisión en las lecturas realizadas en el espectrofotómetro. Estos autores, además observaron la sedimentación de la biomasa, evento este ausente en nuestros ensayos.

El comportamiento de la curva de crecimiento celular es similar al observado por Chiu *et al.* (2008), quienes realizaron cultivos por lote de *Chlorella sp.* en fotobiorreactores aireados por ocho días, con el fin de probar el efecto de varias concentraciones de CO<sub>2</sub> sobre la propagación; al igual que en este estudio, se utilizó la relación entre la absorbancia de las muestras y la concentración celular para obtener los valores de biomasa por unidad de volumen en cada intervalo de tiempo.

Para probar si la diferencia entre las medias era significativa, se realizó el análisis de la varianza al conjunto de datos. El resultado de la prueba acepta la hipótesis nula, permitiendo afirmar que la probabilidad de que al realizar este proceso, bajo las mismas condiciones, se repita el mismo resultado, es de 98.5%. Es decir, no existen diferencias significativas entre las medias obtenidas para cada ensayo.

## CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación resaltan la robustez de estos cultivos a nivel de laboratorio, la cual se manifiesta en su reproducibilidad.

El cultivo por lotes resulta adecuado para la obtención de biomasa de *Chlorella sp* observándose un ajuste lineal para la cinética de crecimiento.

El cultivo de *Chlorella sp.*, se mantiene viable por un periodo de 15 días en las condiciones de este estudio.

La velocidad específica de crecimiento celular del cultivo es constante como lo indica la cinética lineal.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Cartagena y a la Universidad del Atlántico por el apoyo a esta investigación.

## REFERENCIAS

1. Bashan, L., Moreno, M., Hernandez, J. & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research: 36*, 2941-2948.
2. Chiu, S., Kao, C., Chen, C., Kuan, T., Ong, S. & Lin, C. (2008). Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology: 99*, 3389-3396.
3. Fu-Ying, F., Wen Y., Gui-Zhen, J., Yi-Nong, X. & Ting-Yun K. (2005). Enhancement of fatty acid production of *Chlorella sp.* (chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. *Process Biochemistry: 40*(3-4), 1315-1318.
4. Garza, M.T., Almaguer, V., Rivera, J. & Loredó, J. (2010). Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chlorella sp.* Inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UNAL: 13*(2), 174-177.
5. Hsieh, C. & Wu, W. (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology: 100*, 3921-3926.
6. Kastanek, F.S., Abata, S., Solcova, S., Maletérova, Y., Kastanek, P., Branyikova, *et al.* (2010). In-field experimental verification of cultivation of microalgae *Chlorella sp.* using the flue gas from a cogeneration unit as a source of carbon dioxide. *Waste Management & Research: 28*(11), 961-966.
7. Liang, Y., Sarkany, N. & Cui, Y. (2009). Biomass and Lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters: 31*, 1043-1049. DOI 10.1007/s10529-009-9975-7.
8. Mutlu, Y.B., Isik, O., Uslu, L., Koc, K. & Durmaz, Y. (2011). The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *African Journal of Biotechnology: 10*(3), 453-456.

9. Ras, M., Lardon, L., Bruno, S., Bernet, N. & Steyer, J. (2011). Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*: 102, 200-206.
10. Sánchez, E., Garza, M., Almaguer, V., Sáenz, I. & Liñán, A. (2008). Estudio cinético e isotermas de adsorción de Ni (II) y Zn (II) utilizando biomasa del alga *Chlorella sp.* inmovilizada. *Ciencia UNAL*: 11(2), 168-176.
11. Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., *et al.* (2010). Cultivation of Green Algae *Chlorella sp.* in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.*: 162(4), 1174-86.