

MODELADO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS NATIVAS EN MEDIO CON BICARBONATO

Roa Uribe Jhon Anderson (1), Torres Zúñiga Jesús Ixbalank (2), Cea Barcia Glenda Edith (3)

1 [Ingeniería Ambiental, Unidades Tecnológicas de Santander] | [Dirección de correo electrónico: andersonuribeog@hotmail.com]

2 [Departamento de Ingeniería Electrónica, División de Ingenierías, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [Dirección de correo electrónico: ixbalank@ugto.mx]

3 [Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Salamanca] | [Dirección de correo electrónico: glendaceea@gmail.com]

Resumen

En este estudio se utilizó un sistema de cultivos por lotes o tipo Batch compuesto por tres muestras en recipientes de 500 mL, en donde cada una se hizo crecer de manera paralela con su respectivo duplicado. Cada uno de los recipientes contenía una solución de 300 mL preparada con 80% de medio basal Bold y 20% de inóculo de *Chlorella* sp.; no obstante, dos de las muestras contaban, además, con una adición de bicarbonato (HCO_3^-) 0.29 M. Con ello, se buscó evaluar la cinética de crecimiento de *Chlorella* sp. en un medio alcalino y bajo condiciones de incidencia de luz constante (sin fotoperiodo), pH superior a 8 y agitación por placa, a través de la simulación virtual con la aplicación del modelo matemático de Gompertz para conocer -y también predecir- la tasa de crecimiento específica y la cantidad de biomasa aproximada en un tiempo determinado.

Abstract

In this study a Batch cultures system composed by three samples in 500 mL flasks was used, where each one was growth in a parallel way with their respective duplicate. Besides, each one of the flasks contained a 300 mL solution prepared with 80% of Bold medium and 20% of *Chlorella* sp. inoculum; nevertheless, two of the three samples had bicarbonate (HCO_3^-) 0.29 M. In line with this, an evaluation of the growth kinetics of *Chlorella* sp. in an alkaline medium was sought and under constant light incidence (no photoperiod), pH above 8 and using a rotary shaker, through the virtual simulation with the Gompertz mathematical model application to know -and also predict- the specific growth rate and the approximate biomass concentration in a determined time.

Palabras clave

Chlorella sp.; Modelo de Gompertz; Cinética de crecimiento.

INTRODUCCIÓN

El campo de investigación en microalgas ha venido adquiriendo gran importancia principalmente por dos razones: (i) su elevada tasa de crecimiento [1], debido a que son organismos autótrofos, es decir, que sintetizan su propio alimento a partir de compuestos inorgánicos, pero también en algunos casos pueden ser heterótrofos simultáneamente, es decir, son mixotróficos [2]; y (ii) las aplicaciones que estos microorganismos tienen en la industria, salud o sector comercial. Tal es el caso de la obtención de combustible con fines energéticos -que es posiblemente, la aplicación más destacada-, por ejemplo, el biodiesel; o para generar calor, por ejemplo, el bioetanol [3].

Además, una de las características más importantes de las microalgas es la absorción de dióxido de carbono y su posterior transformación en oxígeno [4], con lo que su aplicación en el tratamiento de aguas residuales es muy bien valorada.

Varios autores relacionan varias de las aplicaciones mencionadas de las microalgas. Por ejemplo, Muñoz et al. [5] se centró en los efectos de la luz y la temperatura en el crecimiento de la biomasa, utilizando un sistema de cultivos por lotes con 18 fotobiorreactores dentro de un incubador. La temperatura incide en la absorción y la cinética de crecimiento [6], mientras que la luz afecta directamente sobre la tasa de asimilación de carbono.

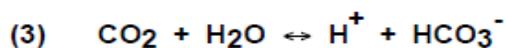
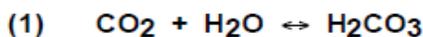
Por otro lado, Bernard [7] estudió la eficiencia de la obtención de biocombustible a partir de la limitación de nitrógeno en las microalgas, lo que genera que estas contengan una cantidad significativa de lípidos [8]. Asimismo, modeló la cantidad de dióxido de carbono industrial consumido por estos microorganismos.

La aplicación de modelos matemáticos en el cultivo de microalgas permite la reducción de esfuerzos, tiempo y dinero. Su importancia radica en que con ellos se puede conocer de manera automatizada la concentración aproximada de biomasa en un tiempo determinado, además del comportamiento de los microorganismos bajo diferentes condiciones (por ejemplo, de temperatura, intensidad de luz y pH) y la optimización de esas condiciones para fomentar su crecimiento [9].

Y es que la influencia de estos factores en el crecimiento de las microalgas es algo muy importante a tener en cuenta. Por ejemplo, aparte de lo ya mencionado, el pH incide drásticamente en las reacciones que se llevan a cabo en el medio [10].

Para el caso de los compuestos carbonados, el pH influye en la forma y cantidad en que estos se presentan, por ejemplo, en un medio alcalino, a valores de pH entre 7.5 y 8.3 predominan los bicarbonatos, entre 8.3 y 10.6 las formas carbonatadas que se encuentran son bicarbonatos y carbonatos y, finalmente, a valores superiores a 10.6 se encontrarán principalmente carbonatos e hidróxidos [11].

El dióxido de carbono al entrar en contacto con un medio acuoso experimenta diferentes transformaciones [11,12], descritas a continuación:



En este apartado, destacamos el modelo de Gompertz, debido a su alta aplicabilidad en Biología, por ejemplo, en la descripción del crecimiento de plantas y animales, así como del volumen de bacterias y células cancerígenas [13].

Asimismo, el modelo de Gompertz es útil para determinar la cinética de crecimiento de la biomasa de microalgas. Por

medio de este, se puede conocer el tiempo de latencia, la tasa específica de crecimiento y el volumen máximo de (o estacionario) de biomasa [14].

Ante esto, el objetivo del presente estudio es la aplicación del modelo de Gompertz para evaluar la cinética de crecimiento de *Chlorella* sp. en un sistema de cultivo por lotes o Batch compuesto por un medio alcalino con adición de bicarbonato (HCO_3^-), bajo condiciones de intensidad de luz constante (sin fotoperiodo), pH inicial superior a 8 y con el uso de la agitación por placa para estimular el crecimiento de la biomasa, que se medirá utilizando un espectrofotómetro con una longitud de onda única.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Chlorella* sp.

En un recipiente de 500 mL, se dispuso una alícuota de 60 mL de inóculo de *Chlorella* sp. junto con un volumen de 240 mL de medio basal Bold [15]. Se hizo uso de una placa de agitación a 100 - 120 rpm (modelo 120460, Heathrow Scientific) y de un sistema de cuatro lámparas de tubo tipo LED (modelo LA-LED/10w, Geopower) con una intensidad de luz promedio de $5.51 \mu\text{mol m}^2/\text{seg}$ por un par de días para fomentar su crecimiento antes de lanzar el experimento con el bicarbonato de sodio. La intensidad de luz fue medida con un luxómetro (modelo HER-410, Steren) a la altura del nivel del agua y de la base de los recipientes, para tener en cuenta la parte de la biomasa que precipita.

2. Crecimiento de los cultivos por lotes.

2.1. Primer lanzamiento.

Con base en lo reportado por González & Posten [12], y con una biomasa mucho más representativa, se procedió a lanzar el primer experimento (muestra 1) con su duplicado (muestra 2) utilizando una concentración de 0.29 M de bicarbonato (HCO_3^-) y estableciendo un pH inicial de 8.1 con ayuda de hidróxido de sodio para subir el valor hasta el esperado, debido a que, a valores de pH por encima de 8, el crecimiento de las microalgas es mucho más eficiente. El pH se midió en 10 de los 12 días del primer experimento, mientras que la biomasa se midió en promedio cada dos días.

2.2. Segundo lanzamiento.

A los 10 días del primer lanzamiento, se diluyó la muestra original a 240 mL para realizar el segundo lanzamiento de manera paralela, pero en recipientes más anchos en busca de una mejor agitación de la solución. Se tomó nuevamente una alícuota de 60 mL del inóculo, sólo que en este caso se usaron cuatro recipientes y se agregaron 240 mL de medio basal Bold como en el caso anterior.

De igual forma, se adicionó bicarbonato a una concentración 0.29 M en dos de los recipientes (la muestra 3 y su duplicado) y en los dos restantes (la muestra 5 y su duplicado) se dejó que el inóculo de *Chlorella* sp. creciera en un medio sin bicarbonato añadido. En cuanto al pH, se estableció un valor inicial de 8.1 para cada uno de los lotes y sus duplicados.

Para los dos lanzamientos, se hizo uso de la placa de agitación previamente descrita con una velocidad de 100 y 120 rpm respectivamente, y una intensidad de luz de $5.51 \mu\text{mol m}^2/\text{seg}$.

3. Análisis y evaluación.

3.1. Concentración de la biomasa.

Se utilizó un espectrofotómetro (modelo DR1900, Hach) con una longitud de onda única de 665 nm bajo la cual se determina la clorofila a [16]. Primero, se calibró el equipo usando agua destilada como blanco, para luego, con alícuotas de 5 mL en diferentes tubos de ensayo, hacer las mediciones de las diferentes muestras de cada uno de los cultivos. Las mediciones se repitieron tres veces para cada muestra y se sacó un promedio para obtener un dato de mayor confianza.

3.2. Modelamiento.

En orden para explicar el crecimiento de *Chlorella* sp. en un sistema de cultivo por lotes o Batch, los datos experimentales de absorbancia obtenidos en laboratorio se procesaron en el programa Excel 365 para ajustarlos a la curva de calibración representada por la Ecuación (1), en donde cada punto de la curva corresponde a una concentración específica de la biomasa.

$$y = 257,74x - 5,5711 \quad (1)$$

Se realizó un promedio entre los datos de concentración de biomasa para la muestra 1 y su duplicado del primer lanzamiento (las dos con bicarbonato 0.29 M). De la misma forma, para la muestra 3 y su duplicado (también con bicarbonato 0.29 M), la muestra 5 y su duplicado (sin bicarbonato) del segundo lanzamiento también se realizó un promedio.

Con ello, sobre los datos de biomasa calculados, se aplicó modelo no lineal de Gompertz [13] dado en la Ecuación (2) para evaluar el crecimiento de *Chlorella* sp.

$$W(t) = A \exp(-\exp(-KG(t-T_i))) \quad (2)$$

En donde $W(t)$ es el valor de concentración de biomasa esperado en función de un tiempo t , A representa la asíntota máxima, KG la tasa de crecimiento y T_i es el tiempo de latencia a ponderar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Incidencia del bicarbonato en el crecimiento.

Con base en los datos obtenidos mediante el modelado, el crecimiento de *Chlorella* sp. sin adición de bicarbonato alcanzó una tasa específica máxima de crecimiento de 0.39 d^{-1} aproximadamente, que es similar a lo reportado por González & Posten [12] para *Chlorella* sp. bajo condiciones con cierta similitud, pero con mayor porcentaje de dióxido de carbono y control de pH. Sin embargo, en los valores reportados en la Tabla 1 se observa que el crecimiento de *Chlorella* sp. fue menor cuando se le adicionó bicarbonato 0.29 M, con una reducción superior al 50%, provocada por la alta presión osmótica inducida a las microalgas.

Tabla 1: Concentración de biomasa de *Chlorella* sp. (g L^{-1}).

Tiempo (días)	Biomasa de la muestra 1	Biomasa de la muestra 2 (duplicado)	Biomasa de la muestra 3	Biomasa de la muestra 4 (duplicado)	Biomasa de la muestra 5	Biomasa de la muestra 6 (duplicado)
0	0,01783	0,00014	0,00216	0,00242	0,00545	0,00267
2	0,02845	0,0239	0,00975	0,01025	0,02794	0,0191
3	No se midió	No se midió	0,02011	0,01783	0,06181	0,06965
4	0,03654	0,02997	No se midió	No se midió	No se midió	No se midió
6	No se midió	No se midió	0,02162	0,02061	0,06409	0,0843
7	0,04159	0,03502	0,02137	0,02365	0,06585	0,0881

8	0,04058	0,03401	0,03275	0,02112	0,07217	0,10427
9	0,05499	0,03123	0,02339	0,02162	0,09239	0,13258
10	0,05423	0,02971			No se midió	No se midió
11	0,05246	0,02466			No se midió	No se midió
12					0,19374	0,20562

2. pH

En el primer lanzamiento, para el día cero la muestra 1 y su duplicado tenían un pH de 8.1 que fue en aumento conforme avanzaban los días, debido a que el proceso de fotosíntesis llevado a cabo por las microalgas aumenta el pH hasta valores por encima de 10. En este caso, el pH llegó a un tope máximo de 9.7.

Para el segundo lanzamiento, las muestras 3 (con bicarbonato) y 5 con sus duplicados respectivos se dejaron a un pH inicial de 8.1 también. En este caso, las muestra 3 y 4 (duplicado) alcanzaron un pH máximo de 9.8, mientras que las muestra 5 y 6 (duplicado) llegaron a un pH de 10.1.

3. Cinética de crecimiento.

En la Figura 1a, b y c se observa el valor promedio de la absorbancia medida experimentalmente en laboratorio en el eje X y la biomasa de *Chlorella* sp. calculada con base en la ecuación (1) para cada una de las muestras, siendo A la muestra promedio entre 1 y 2, B la muestra promedio entre 3 y 4, y C la muestra promedio entre 5 y 6.

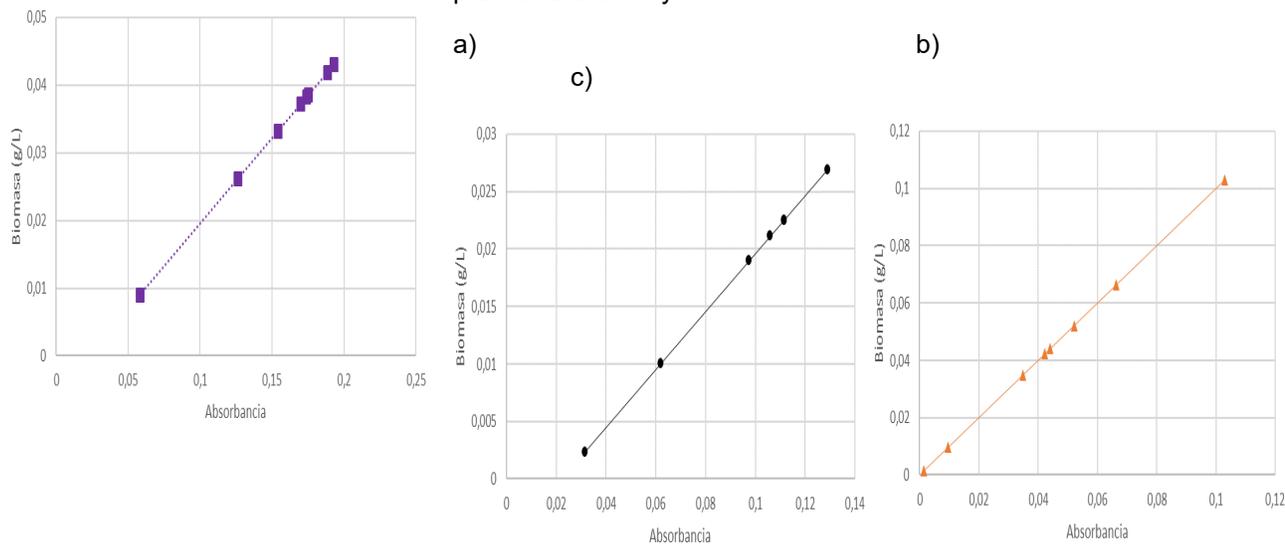


Figura 1: Biomasa (g L⁻¹) vs absorbancia durante el sistema de cultivos por lotes, a) biomasa vs absorbancia de la muestra A, b) biomasa vs absorbancia de la muestra B, c) biomasa vs absorbancia de la muestra C.

En las muestras que contaron con bicarbonato, el valor máximo de absorbancia fue de 0.24 (correspondiente a una concentración de biomasa de 0.055 g L⁻¹). Por otro lado, para las muestras en las cuales no había adición de bicarbonato en el medio, el valor máximo de absorbancia fue de 0.836 (0.206 g L⁻¹), por lo que se asume que el bicarbonato, por lo menos a esta concentración, fue un factor limitante en el crecimiento de las microalgas.

Ahora, en la Figura 2a, b, c y d se evidencia el resultado de la aplicación del modelo matemático de Gompertz, con el cual se representa de manera exponencial el crecimiento de la biomasa de cada una de las muestras en función del tiempo. Los puntos en color azul indican los valores de la concentración real o experimental, mientras que la línea de color naranja indica la curva de crecimiento exponencial graficada utilizando la Ecuación (2).

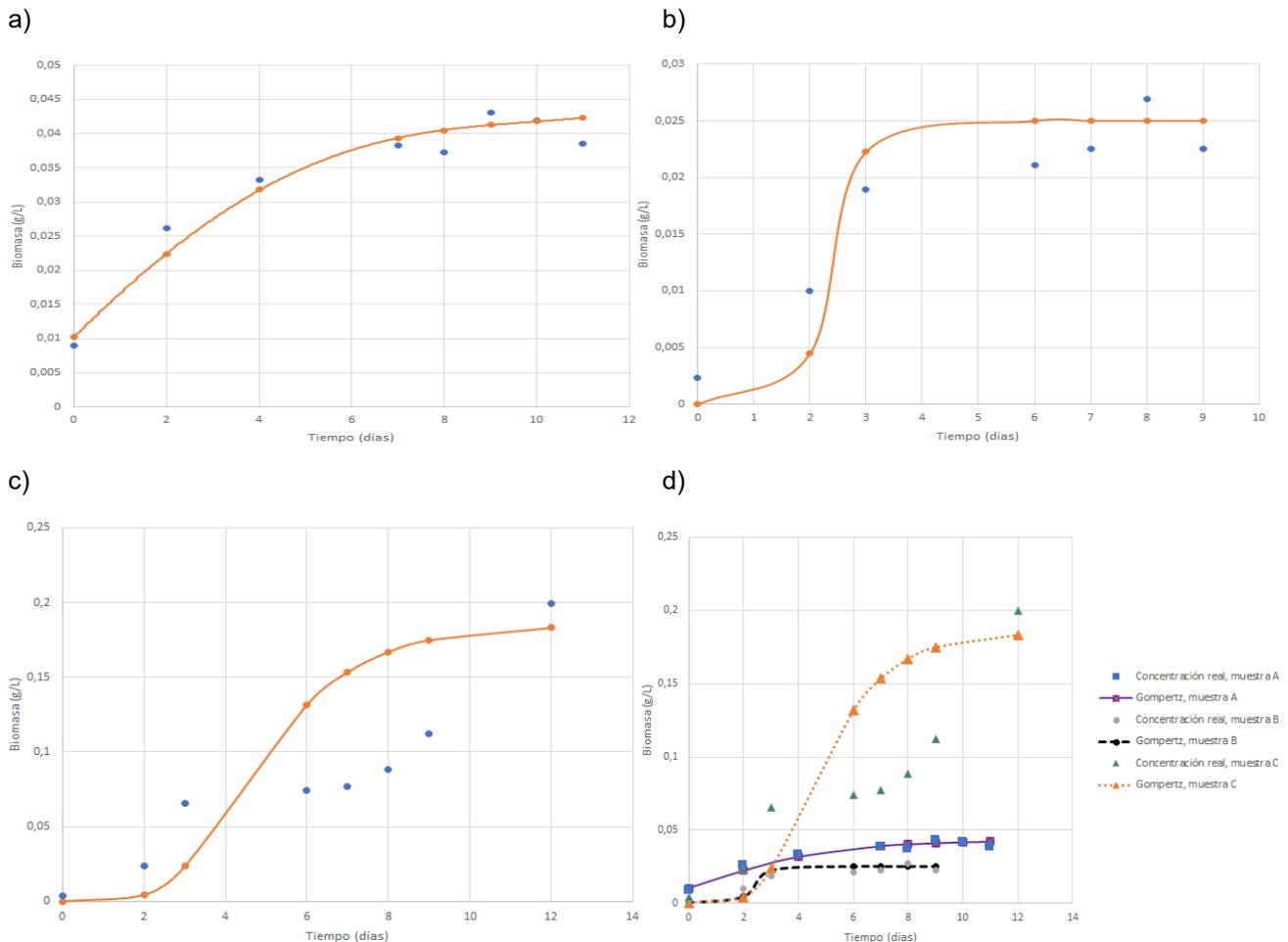


Figura 2: Concentración de la biomasa de *Chlorella* sp. (g L^{-1}) en función del tiempo (días), con base en la aplicación del modelo de Gompertz, a) biomasa vs tiempo de la muestra A, b) biomasa vs tiempo de la muestra B, c) biomasa vs tiempo de la muestra C, d) biomasa vs tiempo de las muestras A, B y C.

Para la muestra A, el punto de estabilización de la curva de crecimiento se encuentra entre los días 9 y 12, en donde las microalgas llegan a un estado estacionario; mientras que para la muestra B, este punto está entre el tercer y quinto día desde el lanzamiento. Como se mencionó, el crecimiento en estas dos muestras (las cuales contaban con bicarbonato 0.29 M) no fue tan significativo como en la muestra C (sin adición de bicarbonato). En esta última, el pico de la curva (punto a partir del cual se estabiliza) se encuentra entre los días 10 y 12 al igual en la muestra A, pero con una concentración de biomasa mayor.

CONCLUSIONES

A partir de datos experimentales tomados en laboratorio, se puede estimar la concentración de biomasa aproximada en un tiempo determinado y su tasa máxima de crecimiento con la aplicación del modelo matemático de Gompertz, es decir, sin necesidad de realizar más experimentos, este modelo nos puede dar una idea bastante cercana de cómo será el comportamiento de las microalgas incluso días después del último dato experimental, lo que contribuye a reducir costos e inversión de tiempo.

La presencia de dióxido de carbono como bicarbonato a una concentración 0.29 M causó una reducción en el crecimiento de *Chlorella* sp. debido a la presión osmótica generada sobre las microalgas. Con base en esto, se asume que al adicionar bicarbonato, al menos a esta concentración, se limita el crecimiento de las microalgas, por lo que se recomienda para experimentos futuros trabajar con concentraciones menores.

AGRADECIMIENTOS

Este documento va dedicado a mi familia en Colombia. También a la Universidad de Guanajuato por la oportunidad brindada y a las Unidades Tecnológicas de Santander, por su apoyo durante esta estancia.

REFERENCIAS

- [1] Pulz, O., Scheibenbogen, K. & Gross, W. (2000) Biotechnology with cyanobacteria and microalgae. En: H. Rehm, G. Reed (Eds.), *Biotechnology* (pp. 105-136). Weinheim: Wiley-VCH.
- [2] Chojnacka, K. & Noworyta, A. (2004). Evaluation of *spitulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and microbial technology*, 34(5), 461-465. doi: 10.1016/j.enzymitec.2003.12.002
- [3] Santos, A.M., González, Y. & Martín-Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de mecánica y electricidad*, 91(1), 20-21. Recuperado de <https://www.iit.comillas.edu/docs/IIT-14-027A.pdf>
- [4] Li, Y., Horsman, N., Lan, C.Q. & Dubois-Calero, N. (2008) *Biofuels from microalgae*. *Biotechnol*, 24(4), 815-810. doi: 10.1021/bp.070371k
- [5] Muñoz-Tamayo, R., Martinon, P., Bougaran, G., Mairet, F. & Bernard, O. (2013). Design of optimal experiments for parameter estimation of microalgae growth models. *IFAC Proceedings Volumes*, 46(31), 315-320. doi: 10.3182/20131216-3-IN-2044.00043
- [6] Geider, R.J. (1987). Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll a ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton. *New Phytologist*, 106(1), 1-34. doi: 10.1111/j.1469-8137.1987.tb04788.x
- [7] Bernard, O. (2011) Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. *Journal of Process Control*, 21(10), 1378-1389. doi: 10.1016/j.jprocont.2011.07.012
- [8] Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112. doi: 10.1002/bit.22033
- [9] Çelekli, A., Balci, M. & Bozkurt, H. (2008). Modelling of *Scenedesmus obliquus*: function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresource Technology*, 99(18), 8742-8747. doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.028
- [10] Franco-Morgado, M., Alcántara, C., Noyola, A., Muñoz, R. & González-Sánchez, A. (2017). A study of photosynthetic biogas upgrading based on a high rate algal pond under alkaline conditions: influence of the illumination regime. *Science of the Total Environment*, 592, 419-425. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.077
- [11] Romero, J.A. (2002). Análisis fisicoquímico del agua. s.d. Calidad del agua. 117-155. Bogotá: Escuela Colombiana de Ingeniería.
- [12] González-Sánchez, A. & Posten, C. (2017). Fate of H₂S during the cultivation of *Chlorella* sp. deployed for biogas upgrading. *Journal of Environmental Management*, 191, 252-257. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.01.023
- [13] Tjørve, K. & Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *Plos One*, 12(6), 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0178691
- [14] Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. & Van't Riet, K. (1990). Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875-1881. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184525/?page=1>
- [15] Bahar, M., Megharaj, M. & Naidu, R. (2016). Influence of phosphate on toxicity and bioaccumulation of arsenic in a soil isolate of microalga *Chlorella* sp. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2663-2668. doi: 10.1007/s11356-015-5510-7
- [16] Millán Núñez, R. & Álvarez, S. (1978). Ecuaciones espectrofotométricas tricromáticas para la determinación de clorofilas a, b y c y sus feofitinas. *Ciencias marinas journal*, 5 (1), 47-55. doi: 10.7773/cm.v5i1.315