

# Factores que influyen en el crecimiento de la biomasa algal

**Maximiliano Argumedo Moix, Paola Álvarez, Ricardo Mateucci, Victor Bustos, Patricia Della Rocca**

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires, Departamento de Ingeniería Química, Grupo de Investigación y Desarrollo en Tecnologías Químicas Aplicadas, IDETQA. Medrano 951 (C1179AAQ), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

*patriciadellarocca@hotmail.com*

*Recibido el 26 de junio de 2014, aprobado el 22 de julio de 2014*

## Resumen

La biomasa algal, según su composición química, puede destinarse a la producción de alimentos para consumo humano o animal, suplementos nutricionales, cosméticos, biofertilizantes, pigmentos, antioxidantes, especialidades químicas, etc. Tanto la producción de biomasa microalgal como la de sus productos derivados pueden ser optimizadas mediante una adecuada modificación de las condiciones físicas y la composición de los medios nutrientes utilizados para sus cultivos. Este trabajo se centra en el estudio de los parámetros que tienen influencia sobre la producción de la biomasa microalgal de *Spirulina Platensis*. Con respecto a la influencia de los factores físico-químicos se analizan la incidencia de la concentración inicial de inóculo, la intensidad lumínica y el método de agitación. La optimización de estos parámetros y otros como la temperatura, el pH, los ciclos de luz y oscuridad, resultan determinantes en la explotación comercial de biomasa y/o sus productos secundarios (metabolitos) de interés. Disponer de información sistemática sobre estas tecnologías constituye un desafío tecnológico fundamental en relación a la matriz productiva de nuestro país.

**PALABRAS CLAVE:** BIOMASA ALGAL - SPIRULINA SP. - CULTIVO DE ALGAS

## Abstract

According to its chemical composition, algal biomass could be used to produce food, feed, nutritional supplements, cosmetics, biofertilizers, pigments, antioxidants, fine chemicals, etc. Both the production of microalgal biomass and its derivatives can be optimized by a proper modification of physical conditions and nutrient media composition applied when their cultures. This work is focused on the study of parameters relevant to *Spirulina Platensis* microalgal biomass production. Related to the physical and chemical factors, influence of inoculum initial concentration, light intensity and stirring method were analyzed. Optimization of said parameters, including also others like temperature, pH, light-dark cycles, is critical for the commercial exploitation of biomass and/or its valuable secondary products (metabolites). The achievement of meaningful information on these technologies is a significant challenge regarding the productive matrix of our country.

**KEYWORDS:** ALGAL BIOMASS - SPIRULINA SP. - ALGAE CULTURE

<sup>1</sup> Son también autores de este artículo:, María del Carmen Gutiérrez, Ana Giulietti

## Introducción

Frente al incremento de la población y sus necesidades, el descubrimiento de fuentes sostenibles de recursos se tornó en un requerimiento imperioso. Asimismo, los ambientes acuáticos han sido y siguen siendo fuente de alimentos, minerales y otros productos naturales. La biomasa microalgal y los metabolitos obtenidos a partir de ella representan trascendentales recursos con beneficios potenciales en diferentes áreas.

Las microalgas son fuentes interesantes de una gran cantidad de compuestos (Benemann et al., 1987; Skulberg, 2000). No sólo tienen la capacidad de producir compuestos de alto valor comercial sino también la habilidad de crecer rápidamente utilizando luz solar, dióxido de carbono y nutrientes obtenidos del cuerpo de agua donde crecen. El medio tradicional de cultivo puede reemplazarse por efluentes domésticos o industriales y, luego de la adaptación de las microalgas a estos ambientes, se puede alcanzar una mayor sustentabilidad económica. Por otra parte, combinar la producción de biocombustibles a partir de microalgas y el tratamiento de efluentes constituyen una estrategia prometedora para la resolución de problemas relacionados con la crisis energética y con la eutroficación de cuerpos de agua.

La obtención de biomasa microalgal y la de productos derivados puede resultar de interés comercial si es optimizada mediante la modificación de las condiciones físicas y de la composición de los medios de cultivo utilizados para su producción. Entre los que cabe resaltar el empleo de fuentes de carbono alternativas a partir de desechos agroindustriales y aguas residuales de diferentes tipos de industrias.

En el presente trabajo se estudió la influencia de los parámetros (concentración del inóculo inicial, método de agitación e iluminación) en el crecimiento de la biomasa microalgal de la especie *Spirulina Platensis*.

La *Spirulina sp.* es una cianobacteria, microalga verde-azulada, procariota cuyo crecimiento principal es fotoautótrofo. Puede ser cultivada para la obtención de productos químicos de uso específico en la industria alimenticia, cosmética o farmacéutica. Es fuente de proteína vegetal de alta calidad, de ácidos grasos poliinsaturados, vitamina E, ácido fólico y vitaminas del complejo B y pigmentos como carotenoides, ficocianobilinas

y clorofilas. Se presenta como células cilíndricas de 3 a 12 µm de diámetro, agrupándose en tricomas helicoidales de aspecto filamentosos. La fuente principal de nitrógeno es el nitrato, que también puede ser aportado por amoníaco o urea. En caso de tener un medio deficiente en nitrato, puede metabolizar la ficocianina, tornándose de color rojo. Los minerales, potasio y sodio son indispensables. Son alcalófilas, es decir, se cultivan en condiciones de pH elevado, siendo el óptimo entre 9,5 y 9,8. Por encima de pH = 11, el alga no crece y tampoco soporta cambios bruscos del mismo.

El rango óptimo de temperatura es de 35 a 38 °C. Por encima de los 40 °C y por debajo de los 12 °C puede sufrir lesiones. Tolerancia a salinidades bajas del orden de 10 a 100 mM de NaCl.

La *Spirulina Platensis* posee estructuras superficiales adicionales tales como vainas, cápsulas o mucílago disperso, compuestos principalmente de polisacáridos que, durante el crecimiento de las células en cultivos estacionarios, son liberados al medio provocando que éste se torne más viscoso. Estos polisacáridos solubles en el medio son fácilmente recuperables, por lo que se han sugerido diferentes aplicaciones en biomedicina y en la industria cosmética y de alimentos, como agentes emulsificantes, estabilizantes o espesantes (De Philippis y Vincenzini, 1998). En particular el polisacárido sulfatado, conocido como Ca-SP, inhibe la replicación del VIH, Herpes *simplex*, citomegalovirus humano, virus de la influenza A, paperas y sarampión (Kozlenko y Henson, 1998; Chamorro et al., 2002). Los exopolisacáridos de esta cianobacteria pueden emplearse como sustitutos del agar-agar (De Philippis y Vincenzini, 1998).

La composición de la microalga es:

Proteínas: 50 a 65 % en peso seco

Lípidos: 5 a 11 % en peso seco

Glúcidos: 8 – 14 % en peso seco

Vitaminas: B1, B2, B12, C, E, biotina, provitamina A

Ácidos nucleicos: 4 % en peso seco

Además posee 18 aminoácidos esenciales, ácidos grasos como el ácido linoléico y el  $\gamma$ -linoléico. También posee galactosil diglicéridos y fosfatidil gliceroles, carotenoides y ficobiliproteínas.

## Metodología

Para la realización de este estudio se utilizó un

tipo de cepa, proveniente del Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias Naturales de la sede Trelew de la Universidad de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB).

La biomasa microalgal se midió por densidad óptica. Se determinó por espectrofotometría la máxima absorbancia de la biomasa de *Spirulina Platensis* en un rango de longitudes de onda comprendido entre 500 y 700 nm. El valor máximo se obtuvo a 680 nm. Se estimó una correlación entre la absorbancia y la densidad óptica para esta longitud de onda.

El método de conservación del alga se realizó por pasaje seriado. Se eligió este método por su sencillez y bajo costo. Se sembraron alcúotas en nuevos medios de cultivo por duplicado. La transferencia seriada se llevó a cabo en un flujo laminar. Se repicaron 10 ml de suspensión de microalga en 40 ml de medio fresco, cada 15 días. Las condiciones de mantenimiento del cepario fueron:

Medio de cultivo: Zarrouk

pH: 8,5

Salinidad: baja

Fotoperíodo: 12 h

Intensidad de luz: 3000 lux

Coloración de luz: tonalidad media

Temperatura: 22 °C

Agitación: no posee.

Se estudió cómo afecta la concentración inicial del inóculo a la velocidad específica de crecimiento del microalga. Además, se estudiaron los efectos que produce la variación del volumen de inóculo inicial sobre la producción de biomasa. Para ello se realizaron ensayos por triplicado tomando como volumen inicial de inóculo 5 ml, 10 ml y 20 ml de cultivo sobre un volumen final de 50 ml, los cuales corresponden a 10% v/v, 20% v/v y 40% v/v, respectivamente. Los ensayos se realizaron en Erlenmeyers de 250 ml que fueron mantenidos en una cámara de cultivo, en las mismas condiciones de mantenimiento de las cepas. Se tomaron muestras diarias durante 49 días a las cuales se les determinó su densidad óptica a 680 nm. Se utilizó la correlación de Biomasa-DO mencionada anteriormente para determinar la biomasa de cada muestra.

Se consideró la ecuación de crecimiento exponencial de biomasa microalgal:

$$\ln X : \ln X_0 + \mu t$$

X: biomasa a tiempo t

X<sub>0</sub>: biomasa inicial

μ: velocidad de crecimiento específico

El tiempo de duplicación es al que corresponde un crecimiento de biomasa igual al doble de la inicial.

Asimismo, se analizó cómo influye el crecimiento de biomasa algal con el método de agitación, que afecta la distribución de los nutrientes y la difusión del dióxido de carbono. En este sentido, una de las experiencias no recibió agitación y la otra se agitó a una velocidad de 100 rpm con un agitador orbital (Cole Palmer). En una tercera experiencia la agitación se llevó a cabo mediante burbujeo con aire utilizando un aireador de pecera, marca Hailea, modelo V-10. En este último sistema se colocó un balón con agua estéril en la línea de aire, previo al ingreso al cultivo, para que el aire entrara húmedo a fin de evitar la evaporación del medio cultivo. Además, se colocó un filtro a la salida de la bomba de aire para retener el material particulado. Los cultivos se mantuvieron en la cámara de cultivo en las siguientes condiciones:

Intensidad lumínica: 1500 lux

Fotoperíodo: 12 h

Temperatura: 26 °C

Medio de cultivo: Zarrouk

Volumen de inóculo: 10 ml (de un cultivo de 15 días)

Volumen final: 100 ml

Recipiente erlenmeyer: 250 ml

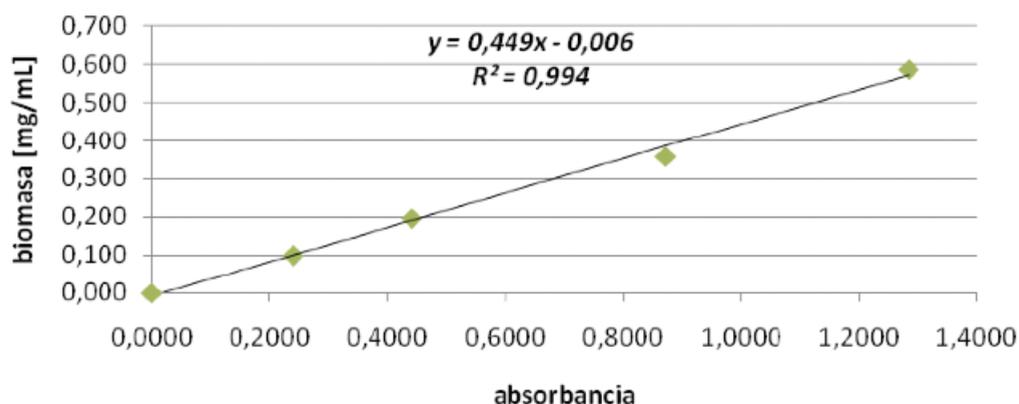
Se analizó también la incidencia de la intensidad de luz sobre el crecimiento de las microalgas. Se irradió con diferente intensidad de luz los cultivos con una fuente de 3000 lux y una de 830 lux, respectivamente.

## Resultados y análisis

La Fig.1. presenta la correlación obtenida entre biomasa y absorbancia, que representa muy satisfactoriamente los datos experimentales.

### Experiencias en la que se modificó la concentración inicial del inóculo y se analizó su influencia sobre el crecimiento de la biomasa algal.

El tiempo de duplicación se incrementó a mayor concentración de inóculo inicial. Sin embargo, en



**Fig. 1. Correlación entre la concentración de biomasa (mg/ml) en función de la absorbancia**

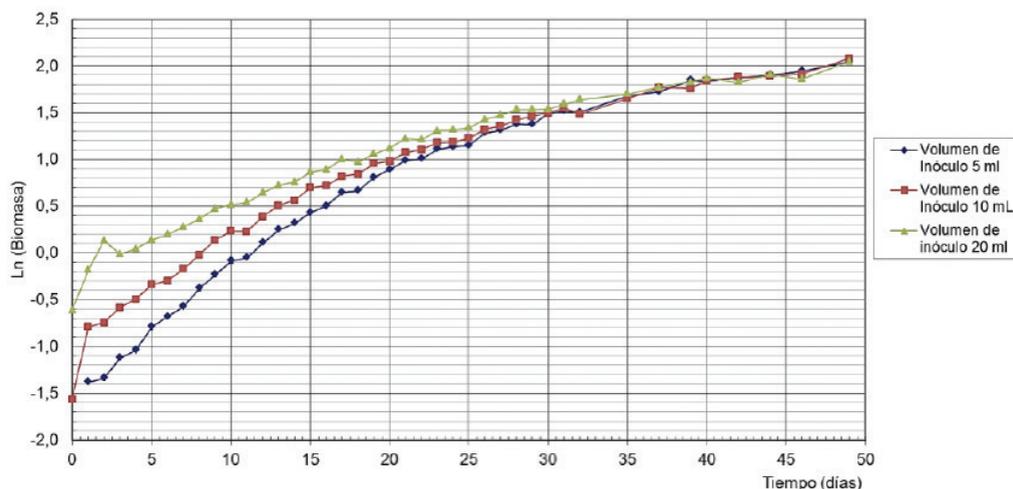
todos los casos, los cultivos alcanzaron una concentración de biomasa de 8 mg/ml al cabo de los 50 días. Por consiguiente, la concentración inicial del inóculo no representa un factor limitante en la producción final de biomasa. Una mayor concentración inicial del inóculo forma agregados que dificultan la medición de la densidad óptica y la absorción de nutrientes y de dióxido de carbono afectando su viabilidad.

En la Tabla 1 se pueden apreciar los valores obtenidos de velocidad específica y tiempo de duplicación para los distintos volúmenes de inóculo inicial.

**Experiencias en la que se modificó el método de agitación y se analizó su influencia sobre el crecimiento de la biomasa algal.**

En la Fig. 2. se representa la curva de crecimiento de biomasa en el tiempo para diferentes volúmenes iniciales de inóculo.

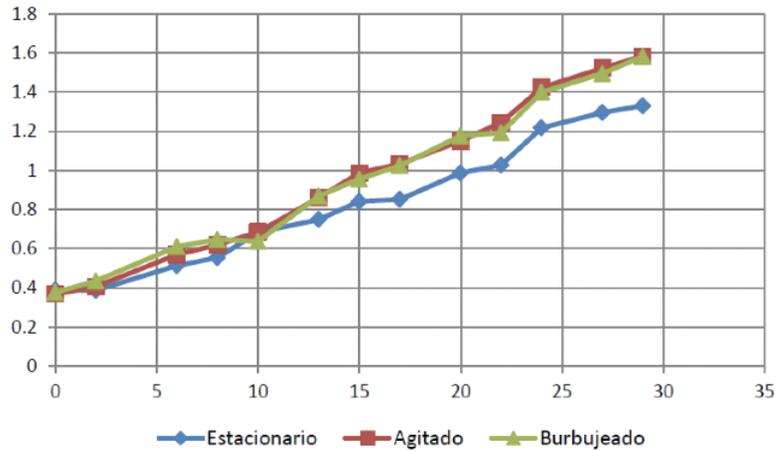
En la Fig. 3. se muestra el crecimiento de biomasa en función del tiempo para diferentes métodos de agitación.



**Fig. 2. Biomasa en función del tiempo para distintas concentraciones de inóculo inicial**

<b>Vol. de Inóculo (mL)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b><math>\mu</math> (días<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,1210</b>	<b>0,1042</b>	<b>0,0723</b>
<b>Td (días)</b>	<b>5,73</b>	<b>6,65</b>	<b>9,59</b>

**Tabla 1. Velocidad específica y tiempo de duplicación para distintos volúmenes iniciales de inóculo**



**Fig. 3. Biomasa en función del tiempo para diferentes métodos de agitación y en estado estacionario (sin agitación)**



**Imagen 1. Izquierda cultivo irradiado con 830 lux y derecha cultivo irradiado con 3000 lux**

Para el tiempo analizado se aprecia que no existen diferencias entre los métodos de agitación por agitador orbital y por burbujeo de aire, si bien se observa una mayor producción de biomasa algal del cultivo en ambos casos cuando se compara con el cultivo sin agitación, estacionario.

**Experiencia en la que se analizó la influencia cualitativa de la intensidad de luz sobre el crecimiento de las microalgas**

En la Imagen 1 se puede apreciar la significativa incidencia de la luz sobre el crecimiento algal para diferente intensidad lumínica de irradiación del cultivo: 3000 lux y 830 lux. Cuando la biomasa algal se irradia con mayor intensidad lumínica se produce un mayor crecimiento que se comprueba con la mayor intensidad de color (verde más intenso) del cultivo.

**Conclusiones**

Para aprovechar la amplia variedad de potenciales productos que se obtienen a partir del cultivo de *Spirulina Platensis*, es muy importante el conocimiento detallado de todos los parámetros (concentración de inóculo inicial, método de agitación, intensidad de la luz, temperatura, pH) que influyen en su crecimiento.

Una menor concentración inicial de inóculo incrementa la velocidad específica de crecimiento de la biomasa microalgal ya que la difusión de nutrientes y de dióxido de carbono resulta mejor al no producirse agregados de inóculo, como ocurre a más altas concentraciones de inóculo. La agitación mejora la producción de biomasa algal porque facilita el acceso de los nutrientes. Finalmente, la intensidad lumínica incide apreciablemente en el crecimiento del cultivo.

## Referencias

BENEMANN, J.R; TILLET, D.M. y WEISSMAN, J. C. (1987), "Microalgae biotechnology". Trends Biotechnology, 5: 47-53.

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; GÓMES DE LIMA-ARAUJO, K.; PEREIRA DOS SANTOS, C.; CEBALLOS, G. y FABILA-CASTILLO, L. (2002), "Actualización en la farmacología de Spirulina (Arthrospira), un alimento no convencional". Arch. Latinoamer. Nutr. 52: 232-240.

DE PHILIPPIS, R. y VINCENZINI, M. (1987), "Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications", FEMS Microbiol. Rev. 22: 151-175.

KOZLENKO, R. y HENSON, R. H. (1998), "Latest Scientific Research on Spirulina: Effects on the AIDS Virus, Cancer and the Immune System". [www.spirulina.com/SPLNews96.html](http://www.spirulina.com/SPLNews96.html).

SKULBERG, O.M. (2000), "Microalgae as a source of bioactive molecules-experience from cyanophyte research". J. Appl Phycol., 12: 341-348.