

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* EN UN FOTOBIOREACTOR

GROWTH KINETIC OF THE MICROALGAE *Chaetoceros muelleri* IN A PHOTOBIOREACTOR

Nevarez Alvarez Luis Fernando¹, Carrillo Pérez Esther¹, López Elías José Antonio², Vargas López Juan Manuel³ y Noriega Rodríguez Juan Antonio^{1*}

¹ Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n Col. Centro, Hermosillo, Sonora, México C.P. 83000, MÉXICO.

² Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

³ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora.

RESUMEN

Mientras que la creación de una cepa de microalga de calidad puede obtenerse únicamente mediante la manipulación genética de cepas existentes, la optimización de los parámetros de diseño y operación de los procesos industriales puede llevarse a cabo aplicando técnicas adecuadas de ingeniería, como lo es el modelaje matemático. En este trabajo se realizó el estudio de la cinética de crecimiento del cultivo de la microalga *Chaetoceros muelleri* a diferentes concentraciones de CO₂. La velocidad específica de crecimiento, el tiempo de doblado y la producción de biomasa máxima, fueron obtenidos por medio de un ajuste de los datos experimentales a una aproximación de la ecuación logística integrada. Los resultados mostraron que existe una concentración de CO₂ óptima donde se obtuvo la velocidad específica máxima con menor tiempo de doblado. Sin embargo, el rendimiento en la producción celular disminuye al aumentar la concentración de CO₂. Los parámetros cinéticos determinados permiten establecer las bases para el diseño de fotobiorreactores (FBR) y para el escalamiento del proceso a nivel industrial.

Palabras Clave: cinética de crecimiento, microalga, *Chaetoceros muelleri*, fotobiorreactor.

ABSTRACT

While the creation of a high quality microalgae strain can only be obtained by genetic manipulation, the optimization design and operation parameters of the industrial process can be achieved by applying adequate engineering techniques, as the mathematic modelling. In this work, the growth kinetics of the *Chaetoceros muelleri* microalgae culture at different CO₂ concentrations was studied. Specific growth rate, doubling time and maximum growth yield were obtained by adjusting the experimental data to an approximation of the integrated logistic equation. Results show that there is an optimal CO₂ concentration where a maximum specific growth rate was obtained with the minor doubling time. However, cellular yield production decreased when CO₂ concentration was increased. The determined kinetic parameters permit to stablish design basis for photobioreactors (PBR) and scaling to industrial scale processing.

Keywords: growth kinetics, microalgae, *Chaetoceros muelleri*, photobioreactor.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la acuicultura ha requerido producir grandes volúmenes de microalgas para satisfacer las necesidades alimenticias para la producción comercial de larvas de camarón. Sin embargo, la alimentación en los cultivos de camarón, es el costo más elevado llegando a representar hasta dos terceras partes de los costos de producción de las granjas acuícolas (Aznay *et al.*, 2006). La producción de microalgas para la alimentación de las larvas de camarón en los laboratorios comerciales del noroeste de México está basada en un número reducido de especies. Las especies más importantes son las diatomeas céntricas *Chaetoceros spp.*, con una concentración media cercana a 1x10⁶ cel/mL y con una producción de biomasa orgánica altamente variable. Debido al elevado valor nutricional de las diatomeas, estas constituyen un eslabón importante en la alimentación de diferentes organismos marinos, por lo que son utilizadas ampliamente en el desarrollo de cultivos marinos (López-Elías *et al.*, 2004). Las microalgas, incluyendo a *C. muelleri*, han generado un interés global como un recurso sostenible en la producción de alimentos, biocombustibles, compuestos bioactivos y una amplia gama de aplicaciones para el medio ambiente.

El problema de los sistemas de cultivo de fitoplancton se fundamenta en el conocimiento, optimización y automatización para lograr llevarlos a niveles masivos de producción y así obtener altas concentraciones de diatomea disminuyendo el tiempo de cultivo y por lo tanto costo de producción. Los estudios de microalgas se utilizan principalmente debido a que estas se pueden estudiar bajo condiciones definidas y reproducibles (Aznay *et al.*, 2006). Los fotobiorreactores (FBR) cilíndricos han recibido mucha atención ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular, tres veces o más en comparación con los sistemas convencionales. Estos tienen ventajas como la facilidad para cosechar la biomasa, mantenimiento del cultivo sin contaminación, mejor control de las condiciones de cultivo y menor inversión de capital (Contreras, 2003). Además, una práctica tecnológica potencial del cultivo de microalgas es acoplarlo directamente al

*Autor para correspondencia: Juan Antonio Noriega Rodríguez
 Correo electrónico: janoriega@guayacan.uson.mx

secuestro del carbono, que es el proceso de extraer CO₂ de la atmósfera, y/o el consumo de gases de combustión de actividades industriales, como fuente de carbono.

Para la producción industrial se necesita de un FBR altamente calificado, así como los parámetros de diseño y operación adecuados, la elección de la cepa y su medio de cultivo, la cosecha y extracción del componente deseado. Mientras que la creación de una cepa de calidad puede obtenerse mediante la manipulación genética de cepas existentes, la optimización de los parámetros de diseño y operación puede llevarse a cabo aplicando técnicas adecuadas de ingeniería, como lo es el modelaje matemático (Concas *et al.*, 2012). Crecer microalgas en condiciones óptimas de temperatura, intensidad de luz, concentración de nutrientes y niveles de CO₂ aumentará considerablemente el rendimiento, pero la tasa de crecimiento será baja, por lo que los biotecnólogos de microalgas buscan es incrementar la tasa de crecimiento.

Actualmente, la tecnología que se utiliza para la producción de biomasa tiene el inconveniente de que resulta en bajos rendimientos y altos costos de producción (Grobbelaar, 2009). Una prolongada exposición a altas concentraciones de CO₂ puede provocar cambios permanentes en el metabolismo y en la estructura celular de la microalga. Por tal motivo, a fin de tener apropiadamente en cuenta estos cambios en la célula, en el presente trabajo se establecieron los métodos para el seguimiento y análisis de la cinética de crecimiento

para poder ser evaluada a diferentes concentraciones de CO₂ y lograr así el diseño optimizado de los FBR a nivel industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

La cepa de *Chaetoceros muelleri* fue adquirida del laboratorio de microbiología acuícola del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). Las microalgas fueron activadas mediante resiembras sucesivas, escaladas de tubos de 20 mL a matraces Erlenmeyer de 250 mL hasta un litro, en condiciones controladas de laboratorio, en un cultivo estático utilizando agua de mar esterilizada y enriquecida con medio f/2 (Torrentera & Tacon, 1989).

Diseño Experimental

Para el estudio cinético se inoculó ($\approx 200,000$ cel/mL) en un bioreactor cilíndrico de vidrio (Microferm-New Brunswick) conteniendo un volumen de 3 L de medio de cultivo f/2 preparado en agua de mar filtrada (Figura 1). La temperatura de 24°C y agitación de 300 rpm se mantuvieron constantes. La aireación (1.5 L/min) se llevó a cabo de manera continua con adición de una mezcla de aire con distintas proporciones de CO₂ (0, 1, 3, y 5%). La iluminación fue de manera constante proporcionada por 2 luminarias extraplanas LED

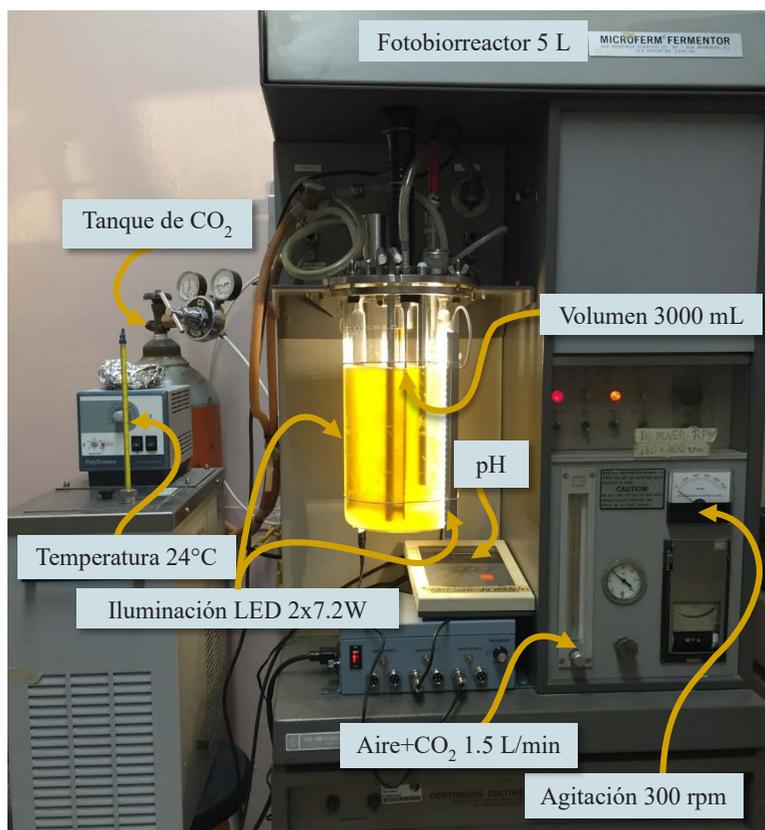


Figura 1. Corrida experimental en el fotobiorreactor instrumentado (Microferm, New Brunswick).

Figure 1. Experimental setup in the instrumented photobioreactor (Microferm, New-Brunswick).

de luz blanca de 7.2W. Se extrajeron muestras de 10 mL durante el transcurso de cada corrida experimental a intervalos de tiempo.

Análisis de Muestras

Para el seguimiento de la cinética de crecimiento, primeramente se estableció una correlación entre la cantidad de células, obtenidas por cuenta directa al microscopio (10X) en un hematocitómetro y la densidad óptica (DO), medida en un espectrofotómetro a 560 nm. Cada muestra fue diluida con agua de mar enriquecida para obtener su absorbancia en un intervalo entre 0.01 y 0.6 unidades de absorbancia a 560 nm.

Además, se determinó la densidad celular del cultivo por medio del análisis de peso seco y se correlacionó con las mediciones de DO. Se realizaron curvas de calibración de la DO vs la densidad celular (cel/mL) y la biomasa celular (mg). La cantidad de biomasa se obtuvo filtrando al vacío la muestra a través de una membrana Millipore de 0.45µm y se secó en una estufa a 100°C para eliminar el agua, por diferencia de peso entre el cultivo húmedo y seco se obtuvo el peso seco de la biomasa. La densidad celular se obtuvo por conteo directo en el microscopio usando un hematocitómetro de 0.1mm de profundidad a 10X.

Análisis de Datos Experimentales

Las ecuaciones logísticas son un conjunto de ecuaciones que caracterizan el cultivo en términos de la capacidad de acarreo el cual es un concepto ecológico que es idéntico al del máximo crecimiento celular que limita el crecimiento (Shuler & Kargi, 2008). La velocidad específica de crecimiento y el crecimiento máximo fueron obtenidos por medio de una aproximación de la ecuación logística integrada (Ecuación 1), la cual resulta de una combinación entre la ecuación de Monod con la ecuación de crecimiento y una ecuación para

el rendimiento de la masa celular basada en el consumo del sustrato.

$$X = \frac{X_0 e^{\mu(t-t_{lag})}}{1 - \frac{X_0}{X_{\infty}} [1 - e^{\mu(t-t_{lag})}]} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde: X es la densidad celular (cel/mL), X_0 es la concentración celular inicial (cel/mL), X_{∞} es la máxima concentración celular (cel/mL), μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), t es el tiempo en horas de cultivo y t_{lag} es el tiempo de retraso (h).

Los parámetros del modelo se determinaron por medio de regresión no lineal (*nlinfit*) en *Matlab v2014*. También se consideró el tiempo de doblado (t_d), que representa el tiempo en que la población se duplica en un orden de magnitud.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la adaptación de las células a las condiciones de operación del fotobiorreactor. El medio de cultivo fue cambiando en su coloración y turbidez en el transcurso del tiempo. La Figura 2 muestra los resultados experimentales del estudio cinético del crecimiento de la microalga *C. muelleri*. Una vez estandarizadas las técnicas analíticas se realizó el seguimiento de un cultivo de la microalga en un fotobiorreactor instrumentado. Se tomaron muestras a diferentes períodos de tiempo y se analizaron con cada una de las técnicas estandarizadas. El conteo celular usando el objetivo 10X fue posible debido al tamaño de las microalgas.

Se encontró una excelente correlación (Figura 3) entre la concentración celular y la densidad óptica ($R^2=0.98$), la relación entre la concentración celular y la DO, está dada por la siguiente ecuación (Ecuación 2):

$$y = 8 \times 10^6 x; \quad R^2 = 0.9822 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

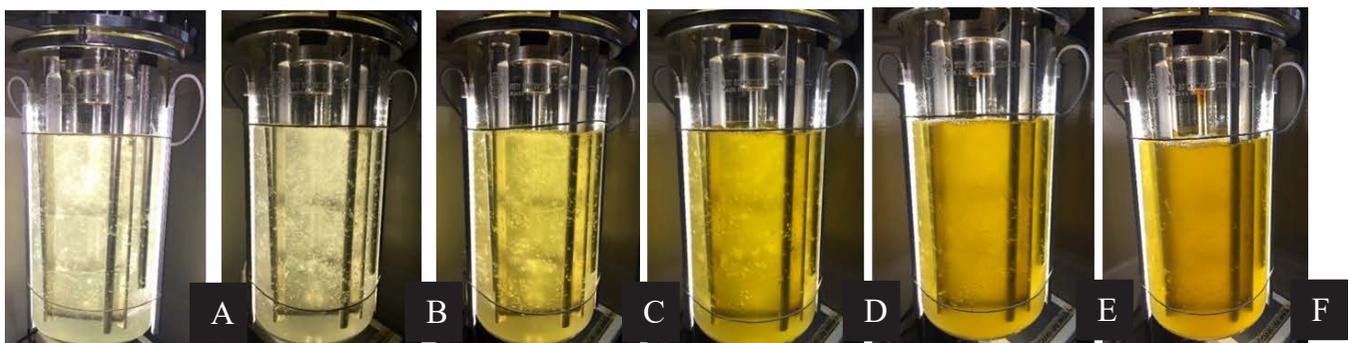


Figura 2. Seguimiento del cultivo de la microalga *Chaetoceros muelleri* en un fotobiorreactor a diferentes tiempos. A, 0; B, 12; C, 24; D, 48; E, 72 y F, 90 h. **Figure 2.** Follow-up of the *Chaetoceros muelleri* microalgae culture in a photobioreactor at different times. A, 0; B, 12; C, 24; D, 48; E, 72 y F, 90 h.

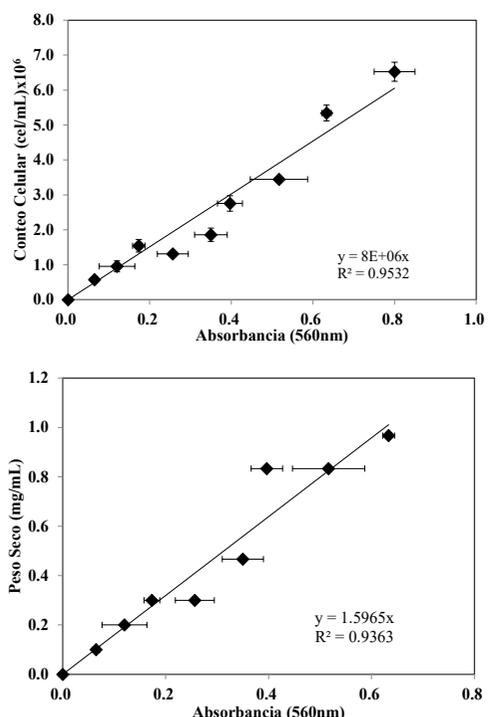


Figura 3. Correlación entre (a) concentración celular y (b) peso seco, con la densidad óptica (560 nm) del cultivo de *C. muelleri*.

Figure 3. Correlation of the cellular concentration (a), and weight (b) with the optical density of the *C. muelleri* culture.

donde y es la concentración celular (cel / mL), y x es la DO (560nm).

Se encontró una correlación lineal para el peso seco contra la DO (560 nm) con una bondad de ajuste lineal aceptable (0.94). Se estima que el peso de las microalgas corresponde a un 2.5×10^{-10} g.

Por lo anterior, es posible determinar la producción de biomasa indirectamente utilizando la lectura de DO a 560 nm en un espectrofotómetro.

La Figura 4 muestra que el cultivo inicia su crecimiento sin mostrar una fase de retraso significativa y que el modelo propuesto presenta un ajuste correcto a los datos experimentales ($R^2 > 0.98$). Con este modelo fue posible determinar con precisión los parámetros de crecimiento para las diferentes concentraciones de CO₂ estudiadas (Tabla 1). En el ensayo experimental se alcanzó la concentración celular máxima de 1.9×10^6 cel/mL, velocidad específica de crecimiento de 0.0216 h^{-1} y tiempo de doblado de 32 h. En la Figura también se observa que el cultivo inicia la fase exponencial después de las primeras 20 horas y la duración de esta fase se prolon-

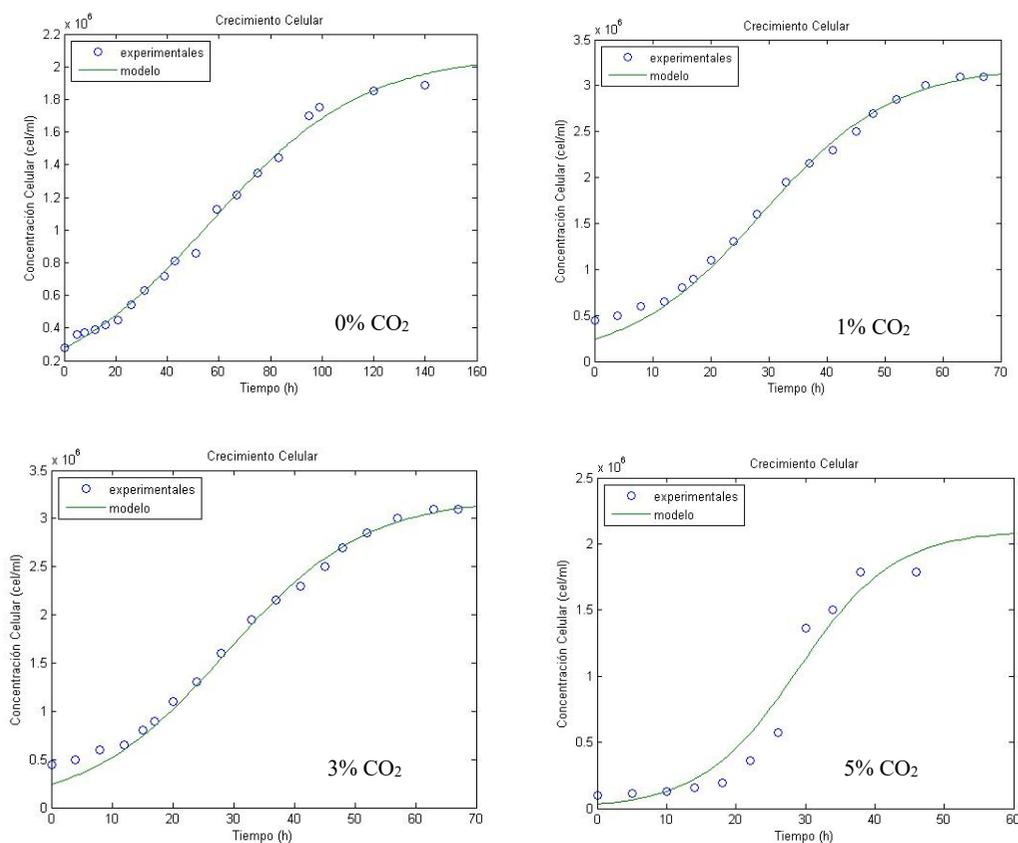


Figura 4. Cinéticas de crecimiento de la microalga *C. muelleri* a diferentes concentraciones de CO₂. (O) datos experimentales; (—) ajuste con modelo matemático.

Figure 4. Growth kinetics of the microalgae *C. muelleri* at different CO₂ concentrations. (O) experimental data; (—) fitting with mathematic model.

Tabla 1. Parámetros cinéticos para el cultivo de microalga *C. muelleri* en fotobiorreactor semiestático.

Table 1. Kinetic parameters for the culture of the *C. muelleri* microalgae in a semibatch photobioreactor

CO ₂ (%)	X _∞ (cel/mL)	t _{lag} (h)	Y g L ⁻¹	μ (h ⁻¹)	t _d (h)	R ²
0	2.18E+06	0	0.53	0.045	15.4	0.97
1	3.02E+06	4.3	0.72	0.073	9.5	0.99
3	2.10E+06	18	0.51	0.095	7.3	0.99
5	1.96E+06	7.5	0.47	0.082	8.4	0.95

X_∞, es la máxima concentración celular (cel mL⁻¹); t_{lag}, es el tiempo de retraso (h); Y, es el rendimiento celular (g L⁻¹); μ, es la velocidad específica de crecimiento (h⁻¹); t_d, es el tiempo de doblado (h) y R² es el coeficiente de determinación para la regresión no lineal.

ga hasta aproximadamente 100 horas para después alcanzar su fase estacionaria.

CONCLUSIONES

La alimentación continua de CO₂ en el cultivo de la microalga *Chaetoceros muelleri* favorece a la rapidez de crecimiento. Sin embargo, a concentraciones superiores al 3% se presenta una inhibición del crecimiento, reflejándose en una disminución de la tasa de crecimiento así como en el bajo valor de rendimiento.

Los modelos matemáticos propuestos permitieron hacer el seguimiento preciso de la cinética de crecimiento y obtener los parámetros confiables. De esta forma los parámetros cinéticos determinados permiten establecer las bases

para el diseño de fotobiorreactores para el escalamiento del proceso a nivel industrial.

REFERENCIAS

- AZNAY, M. G., LOPEZ, T. R. & ALBA, L. V. 2006. Evaluación del crecimiento de *Thalassiosira fluviatilis* frente a diferentes concentraciones de Nutrilake. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 7, 1-6.
- Contreras, C. "Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas". Instituto Tecnológico de Celaya, México. , 2003.
- Concas, A. Pisu, M. Cao, G. "Experimental analysis and novel modeling of semibatch photobioreactors operated with *Chlorella vulgaris* and fed with 100% (v/v) CO₂", *Chem. Eng. J.* 213, 203-213. , 2012.
- Grobbelaar, J. "Factors governing algal growth in photobioreactors: the "open" versus "closed" debate." *J Appl Phycol* 21:489-492, 2009.
- LÓPEZ-ELÍAS, J. A., VOLTOLINA, D., NIEVES-SOTO, M. & FIGUEROA-ORTIZ, L. 2004. Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del noroeste de México. Cruz Suárez, LE, Ricque Marie, D., Nieto López, MG, Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, 16-19.
- Shuler, M. & Kargi, F. "Bioprocess Engineering". Prentice Hall, Inc. 180-181, 2008.
- TORRENTERA, B. L. & TACON, A. G. J. 1989. La Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. In: FAO (ed.) *II. Cultivo de microalgas*. Roma.