

## ***Chlorella* sp. inmovilizada con aplicación en el tratamiento, monitoreo de agua y producción de biomasa**

Luz Adriana Vizcaíno-Rodríguez<sup>1</sup>, Nereida Yuriko Aguilar-Corona<sup>1</sup>, Juan Luis Caro-Becerra<sup>1</sup>, Pedro Alonso Mayoral-Ruiz<sup>1</sup> y J. Guadalupe Michel-Parra<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología, Ing. en Biotecnología, Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Limnología, Ciencias de la Naturaleza, Universidad de Guadalajara, Cd. Guzmán, Jalisco, México.

\* Autor de correspondencia: adriana.vizcaino@upzmg.edu.mx; Tel.: 52 3338413120

**Energías Renovables** (Biomasa).

**Resumen:** La aplicación de microalgas en procesos de biorremediación tiene como fin remover componentes tóxicos y excesos de iones que causan eutrofización. Las algas emplean el exceso de nutrientes presentes en el agua, para producir biomasa mediante fotosíntesis. Las microalgas son utilizadas en el monitoreo ambiental, dichos organismos son sensibles ante contaminantes tanto naturales como antropogénicos, los cuales promueven o inhiben el crecimiento celular y poblacional. El presente estudio tuvo como objetivo la determinación de una matriz óptima para la inmovilización de *Chlorella* sp. la cual es una especie nativa de la región. Las matrices ensayadas fueron alginato de calcio al 4 % y alginato-agar 4 %. Para el cultivo se empleó medio Bold's y se realizó una cinética de crecimiento por cada tratamiento en cultivo tipo Bach, durante 21 días de incubación. Las variables de respuesta fueron: la concentración celular máxima, la viabilidad celular y la conservación de las esferas. La concentración celular máxima fue de  $1.07 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> y se alcanzó a los 15 días de cultivo, en esferas de alginato al 4 %. El tiempo de duplicación fue de 0.162 y 0.141 para *Chlorella* sp. retenida en matriz de alginato 4 % y agar-alginato 4 %, respectivamente. Respecto a la calidad de esferas, a los 15 días de cultivo, inició el proceso de desintegración del sistema de inmovilización alginato-agar. Las esferas de alginato permanecieron sin cambios durante los 21 días del experimento. En conclusión, el mejor tratamiento para la inmovilización de *Chlorella* se obtuvo cuando se empleó el alginato al 4 % y se recomienda continuar los estudios para el desarrollo del sistema de biorremediación, producción de biomasa y biosensores. Se establecieron las condiciones de inmovilización para el cultivo de *Chlorella* sp. en matriz de alginato de calcio.

**Palabras clave:** Biorremediación; Biosensores; eutrofización.

## ***Chlorella* sp. immobilized with application in the treatment, monitoring of water and biomass production.**

**Abstract:** The application of microalgae in bioremediation processes is studied to remove toxic components and ions excess that cause eutrophication. Algae use the nutrients excess present in the water to produce biomass through photosynthesis. On the other way, microalgae are used in environmental monitoring, these organisms are sensitive to both natural and anthropogenic pollutants, which promote or inhibit cell and population growth. The present study aimed to determine an optimal matrix for the immobilization of *Chlorella* sp. It is a native species of the region. The matrices tested were 4 % calcium alginate and 4 % alginate-agar. For the culture, Bold's medium was used, and growth kinetics were carried out for each treatment in Bach-type culture, during 21 days of incubation. The response variables were maximum cell concentration, cell viability and conservation of the spheres. The maximum cell concentration was  $1.07 \times 10^6$  cells.mL and it was reached after 15 days of culture, in 4 % alginate spheres. The doubling time was 0.162 and 0.141 for *Chlorella* sp. Retained in 4 % alginate matrix and 4 % alginate agar, respectively. Regarding the quality of the spheres, after 15 days of culture, the disintegration process of the Alginate-Agar immobilization system began. The alginate spheres remained unchanged for the 21 days of the experiment. In conclusion, the best treatment for the immobilization of *Chlorella* sp was obtained when 4 % alginate was used, and it is recommended to continue the studies for the development of the bioremediation system, biomass production and biosensors.

**Keywords:** Bioremediation; Biosensors; eutrophication.

### **Introducción**

El diseño de plantas de tratamiento de agua que sea eficiente es un proceso complejo, ya que los diferentes tratamientos a utilizar dependerán del tipo de suministro hídrico, el cual puede ser: agua subterránea, lagos, embalses, ríos, agua de mar y cuerpos hídricos con aguas residuales los cuales contienen diferentes niveles de contaminantes tanto naturales como antropogénicos (Howe J et al., 2017).

Los ríos y arroyos en México constituyen una red hidrográfica de 633 mil kilómetros. En los cauces de los ríos principales, fluye el 87 % del escurrimiento superficial del país y sus cuencas cubren el 65 % del área continental. De acuerdo con lo reportado por CONAGUA en 2006, el 26 % de los ríos, lagos y embalses eran de buena calidad y el 74 % tenía problemas de contaminación (Ibarrarán, 2017).

La principal ventaja de utilizar especies nativas es recomendable debido a que se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas de la región y han demostrado la capacidad de crecer a diferencia de los cultivos comerciales que requieren un proceso de adaptación celular.

Por otro lado, las actividades humanas ocasionan desequilibrio en los cuerpos de agua debido a la descarga de altas cantidades de nutrientes como nitratos y fosfatos, que pueden llegar a ocasionar problemas de eutrofización, desbalance de pH entre otros. Una alternativa para su tratamiento es el uso de microalgas debido a su metabolismo fotosintético y capacidad de captura de CO<sub>2</sub> los cuales emplean para la generación de biomasa y combustibles. Las microalgas pueden crecer en sistemas cerrados y abiertos, por lo cual pueden operar en estanques poco profundos o biorreactores (Ardila-Álvarez y col., 2016).

Las microalgas son un grupo diverso de organismos unicelulares, habitan ambientes acuáticos y su elevada relación superficie-volumen les permite absorber una gran cantidad de CO<sub>2</sub> y nutrientes para producir biomasa mediante fotosíntesis (Jiménez y Castillo, 2021).

De acuerdo con la literatura, el porcentaje de remoción de nitratos y fosfatos por microalgas (cultivos mixtos, *Scenedesmus obliquus*, cultivos mixtos de cianobacterias) en aguas residuales va desde el 41 hasta el 88 % (Luque, 2020).

El desarrollo de biosensores es una de las estrategias implementadas recientemente con aplicación en salud, alimentos y medio ambiente. El desarrollo de estas tecnologías es impulsado por las posibilidades de comercialización y patente a su vez tienen el potencial de reducir tiempos de análisis, monitoreo en tiempo real, precio accesible, entre otros (Barceló & Hansen, 2009).

Las microalgas son organismos sensibles, con aplicación potencial en bioensayos de toxicidad al igual que los microorganismos acuáticos (ecotoxicología). Los xenobióticos afectan el crecimiento poblacional, inhiben el crecimiento, la densidad algal, el contenido de clorofila y otros pigmentos. *Chlorella vulgaris* es un alga verde unicelular, utilizada como bioindicador por su alta sensibilidad a sustancias tóxicas. (Calderón-Delgado et al., 2019).

*Chlorella* se emplea en la industria alimentaria, biorremediación y producción de biocombustibles, estudios realizados por Rodríguez-Castillo y colaboradores (2016), demostraron que la producción de biomasa a partir de *Chlorella protothecoides* es optimizado por la incorporación de CO<sub>2</sub> hasta en un 30 % al igual que la bioacumulación de lípidos durante la fase estacionaria de crecimiento, cuando el cultivo se encuentra bajo condiciones de estrés fisiológico (limitado por la disponibilidad de nitrógeno) y es posible alcanzar hasta 70 % de peso seco.

El empleo de microalgas inmovilizadas para el tratamiento de aguas residuales y monitoreo del estado trófico fue reportado en 1998 por Twist et.al. Los biosensores incluyen una interfaz biológica y un traductor de señal. Para el caso particular de los sensores a base de cultivos de algas inmovilizadas, el cultivo celular inmovilizado en presencia de muestras de aguas eutrofizadas incrementa su población lo cual se traduce en el incremento de clorofilas con interacción espectrofotométrica.

La incorporación de un proceso alterno de tratamiento para la remoción de nitratos, fosfatos, amonio etc., en los sistemas de tratamiento de agua convencionales, que a la vez este tenga una aplicación como biosensor de toxicidad, pueda ser biodegradable y con aplicación para la producción de biocombustibles justifica el desarrollo de esta investigación (Comunicación personal).

La realización de este trabajo tiene por objetivo determinar las condiciones óptimas para inmovilizar microalgas nativas de *Chlorella sp* en esferas de alginato de calcio, se busca que la célula inmovilizada sea sensible a la presencia de iones como sulfatos, nitratos, fosfatos, pesticidas o agroquímicos presentes en la muestra de agua con la finalidad de determinar su aplicación práctica en el desarrollo de un biosensor, biorremediación de agua o producción de

biomasa. En este documento, se describen las cinéticas de crecimiento, la viabilidad celular, la concentración de las microalgas en la esfera, así como la estabilidad de estas de los estudios realizados.

## Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de microbiología de la Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara localizada en Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México, 20°28'9''N 104°33'23''W.

### *Cinética de crecimiento.*

Para la producción de biomasa se estableció un cultivo *in vitro* de *Chlorella sp.*, a partir de especies nativas del lago de Cajititlán Jalisco, México. La muestra fue previamente aislada por personal del Laboratorio de Microbiología de la Universidad y posteriormente proporcionada para realizar la investigación. El cultivo celular se transfirió a 500 mL de medio de cultivo Bold's (cultivo Bach). Se conservó a 25 °C de temperatura, con fotoperiodo 16:8 de luz: oscuridad y bombeo de aire atmosférico (Condiciones establecidas con base en experimentos previos).

### *Diseño experimental e inmovilización celular.*

Se establecieron dos cinéticas de crecimiento con diferente matriz. En el *tratamiento A*. Se emplearon 9.8 g de alginato de sodio y 20 mL de agua destilada, se calentó hasta disolución y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar y en área estéril se adicionó 1 mL de inóculo que contenía  $3.20 \times 10^4$  células. mL<sup>-1</sup>. La mezcla se homogeneizó y con ayuda de una jeringa estéril se transfirió gota a gota en una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M; se dejó en reposo por 12 horas a 4 °C. Las esferas formadas permanecieron en reposo durante 12 h. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se distribuyeron en seis matraces los cuales contenían esferas y 150 mL de medio de cultivo Bold, cada uno. *Tratamiento B*. Se realizó el mismo procedimiento, la variable aleatoria fue el agente de inmovilización: mezcla de agar-alginato 1:1. Las cinéticas de crecimiento se monitorearon con frecuencia de tres días durante 21 días. Fue un diseño completamente al azar. Como control se emplearon esferas de alginato sin inóculo y cultivo de algas sin retención física. Se utilizó como medio de cultivo Bold de acuerdo con Ardila-Álvarez et al. (2017).

### *Determinación del número de células y viabilidad celular.*

Solución de homogeneización: se preparó una solución al 4 % P: V de bicarbonato de sodio. El análisis se realizó por triplicado. Las esferas se disolvieron con la solución y ayuda del Vortex, de acuerdo con el método descrito por Yabulnr et al., (2007). Para el conteo de células se empleó 0.1 mL de la disolución, azul de tripán, cámara de Neubauer y el microscopio triocular modelo BA310 marca Motic con cámara digital Moticom.

### *Cálculos:*

#### Análisis Estadístico

Los cálculos se realizaron con el software: Table Curve 2D (v5.01) y se ajustó la curva a la ecuación más apropiada.

Para determinar la velocidad específica de crecimiento se utilizó la ecuación 1:

$$\mu = \frac{\ln Nt_1 - \ln Nt_2}{\Delta T} \quad (1)$$

Donde:

$Nt_1$  : Es la población máxima al día 15 en la matriz de alginato y al día 18 en la matriz de alginato-agar.

$Nt_2$  : corresponde a la densidad inicial del cultivo en cada matriz.

el tiempo de duplicación  $T_d$  (días) se calculó de acuerdo con la ecuación 2:

$$t = \ln 2 \times \mu. \quad (2)$$

## Resultados y Discusión

Respecto al rendimiento de biomasa, los mejores resultados se obtuvieron en la matriz de alginato 4 % a los 15 días de cultivo: se recuperaron  $1.07 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup>. La velocidad específica de crecimiento estimada fue 0.234 para la matriz de alginato 4 % y 0.204 para la matriz alginato-agar 4 %. El tiempo de duplicación fue de 0.162 y 0.141 para *Chlorella sp.* retenida en matriz de alginato 4 % y agar-alginato 4 %, respectivamente. Con densidad celular inicial de  $3.2 \times 10^4$  células por mL y  $4 \times 10^4$  células por mL, respectivamente (Datos no mostrados).

De acuerdo con lo reportado por Forero-Cujiño (2016), para cultivos de *Chlorella vulgaris*, inmovilizada en alginato, los tiempos de duplicación celular son más altas cuando la densidad celular inicial es mayor y obtuvo valores de 0.33394, 0.2747 y 0.1575 para densidad inicial de 13619, 5896 y 35641 células / esfera, los resultados difieren a los obtenidos en nuestro experimento, debido a las diferencias en la biomasa inicial, la cepa empleada, el medio de cultivo y las condiciones de ensayo.

En ambos tratamientos la fase de adaptación celular (lag) transcurrió durante los primeros 3 días de cultivo. La fase exponencial de crecimiento en la matriz de alginato permaneció hasta el día 12 de incubación. La fase de desaceleración transcurrió del día 12 al 15. La fase estacionaria se extendió hasta el día 21 de cultivo, cuando se detectó viabilidad de 84 y 82 % para las células inmovilizadas en matriz de alginato 4 % y alginato-agar 4 %, respectivamente. (Figuras 1, 2 y 3).

Estos resultados difieren a los reportados para el cultivo de *Chlorella sp.* cultivada con un fertilizante comercial con una concentración de 4 mM de nitrógeno con una densidad celular inicial de  $1 \times 10^6$  UFC. Las cuales presentaron una fase lenta de adaptación de 8 días de cultivo, así como una fase de crecimiento que se aleja del modelo exponencial (Infante et al., 2012).

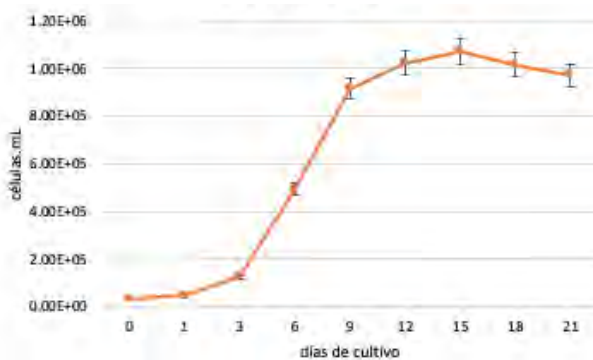


Figura 1. Cinética de crecimiento, de *Chlorella sp.* inmovilizada en matriz de alginato al 4 % e incubada en medio de cultivo Bold durante 21 días.

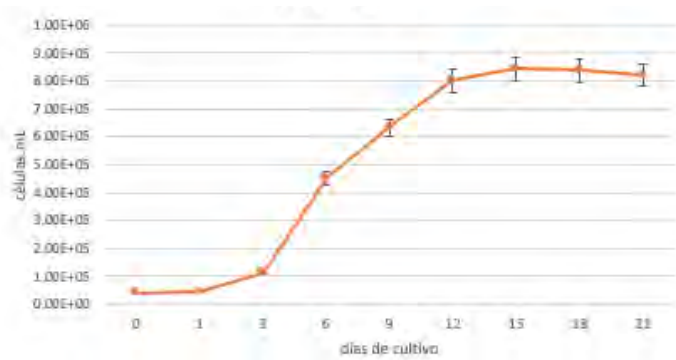


Figura 2. Cinética de crecimiento *Chlorella sp.* inmovilizada en matriz de alginato-agar al 4%, con medio de cultivo Bold y conservada para el estudio durante 21 días de incubación.

Respecto a la viabilidad celular determinada con azul de tripán, durante todas las fases de cultivo se alcanzaron mayores valores cuando se empleó la matriz de alginato 4 % (Figura 3).

La Figura 4, muestra un cultivo de *Chlorella sp.* retenida en matriz de alginato 4 %. Las perlas permanecieron sin alteraciones durante los 21 días de cultivo, mientras que la matriz alginato-agar inició la desintegración a partir del día 15 de cultivo.

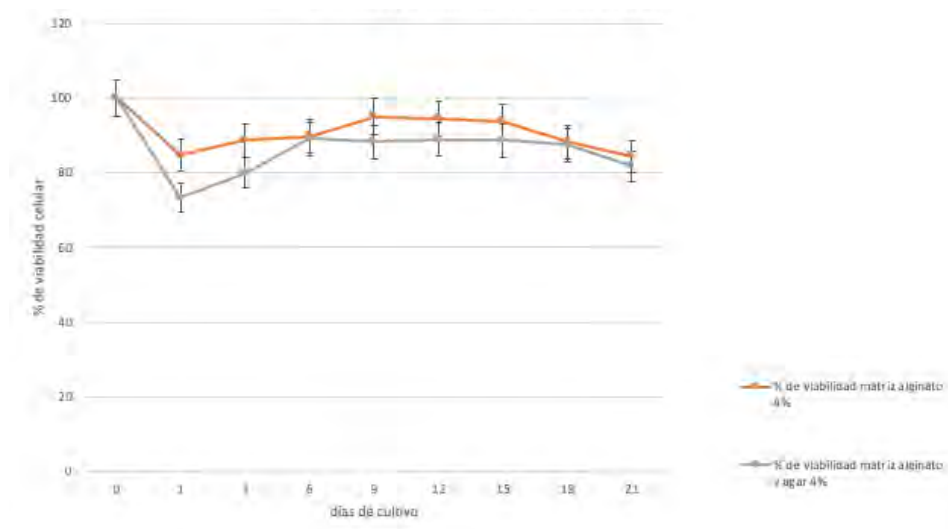


Figura 3. Cinética de viabilidad celular de *Chlorella sp.* retenida en matriz de alginato al 4% y alginato-agar 4%.



Figura 4. Cultivo *in vitro* de *Chlorella sp.* en matriz de alginato a los 21 días de cultivo.

Existe un gran potencial para el uso de *Chlorella sp.* inmovilizada, en el desarrollo de sistemas de tratamiento de agua para la remoción de nitratos, sulfatos, fosfatos ya que esta microalga inmovilizada, pueden emplearse en reactores de flujo continuo. En las plantas de tratamiento convencionales, es factible su empleo posterior al tratamiento de clarificación, previo a la adición de cloro y empleo de luz ultravioleta como desinfectante.

De acuerdo con Forero- Cujíño, et al (2016), el tamaño de las esferas es un factor importante que podría limitar el crecimiento poblacional de las algas, se estima que altas concentraciones celulares podrían acelerar la desintegración de las esferas.

La ventaja de utilizar un biorreactor con un cultivo de alga *Chlorella* inmovilizada para remover iones en sistemas de tratamiento de aguas es, que una vez que hay completado su tiempo de uso; pueden ser empleados como biocombustibles, ya que la biomasa acumulada contiene aceite con alto valor energético. La producción de biocombustibles a partir de microalgas, requiere evaluar diversos factores, la caracterización de la cepa, conocer su mecanismo metabólico, el diseño y modo de operación de un biorreactor (modo continuo), la velocidad de crecimiento y producción de biomasa, el tratamiento de la biomasa obtenida. Cabe mencionar, que el proceso posee un balance energético muy positivo, no contamina el suelo ni afluentes de agua; al contrario, si se localiza de forma adecuada puede ayudar a remover nitratos, sulfatos o fosfatos en aguas pretratadas. Por lo cual las microalgas son una gran promesa de suministro energético. Sin embargo, su cultivo enfrenta desafíos como el rendimiento alcanzado, los altos volúmenes de agua necesarios para su cultivo entre otros para ser económicamente viables, y se busca como alternativa la extracción de bioproductos de alto valor agregado a partir de la biomasa (Jiménez y Castillo, 2021).

Sin embargo, las tecnologías para producción de biocombustibles de tercera generación (a base de microalgas) todavía están en fase de desarrollo, limitado por las barreras técnico-económicas y sus altos costos. Por lo cual el éxito de la industria de biocombustibles y bioenergía depende de la calidad y cantidad de biomasa, así como de la capacidad rentable del proceso.

Es relevante implementar nuevas tecnologías para el tratamiento de agua residual, ya que esta representa un riesgo para la salud humana y el bienestar de los ecosistemas, de acuerdo con lo reportado por Luque, 2020, quien demostró que un consorcio de algas compuesto por *Scenedesmus sp.*, *Lyngbya sp* y *Microcystis sp*, remueven desde un 75.84 % de nitratos hasta un 93.75 % de fosfatos en aguas residuales.

Los resultados obtenidos permiten recomendar el desarrollo de un sistema de producción de biomasa en un biorreactor de flujo continuo, con el empleo de agua pretratada como fuente de fosfatos, sulfatos y nitratos. Adaptado a una fuente de alimentación de CO<sub>2</sub> proveniente de la industria, como fuente de Carbono, y representa probablemente una alternativa para reducir los niveles de contaminación de agua-aire y a su vez la producción de biocombustibles, sin embargo, es todavía un gran desafío y tal vez su capacidad de remoción de contaminantes, permita justificar los costos de inversión requeridos.

## Conclusiones

*Chlorella sp* presentó una alta tasa de crecimiento retenida en la matriz de alginato al 4 %, se continuarán estudios, en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas para la biorremediación, obtención de metabolitos secundarios (producción de ácidos grasos con aplicación industrial), diseño de un biosensor y/o producción de biocombustibles a partir de la biomasa acumulada

## Bibliografía

- Ardila-Álvarez, A. M. López-Matos, Y., & Vásquez-Cáceres, M. E., González-Delgado, Á. D., & Barajas-Solano, A. F. (2017). Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos. *Tecnológicas*, 20(38),85-96. ISSN: 0123-7799.
- Barceló H., Hansen P.-D. (2009). Biosensor for Environmental Monitoring of Aquatic Systems. Springer.
- Calderón-Delgado I.C., Mora-Solarte D.A.,Velasco-Santamaría Y. M. (2020). Respuestas fisiológicas y capacidad antioxidante de *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) expuesta a fenantreno. *Acta biol. Colomb.* 25(2):225-234.
- Escobedo, J.M. & Calderón, C. A. (2021). Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 265-282.
- Forero-Cujiño, M. A., Montengro, R. L.C., Pinilla-Agudelo, G.A. & Melgarejo-Muñoz, L. M. (2016). Inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) y *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) en esferas de alginato de calcio. *Acta Biológica Colombiana*, 21(2), 437-442.
- Ibarrarán M.E., Mendoza A., Pastrana C., Manzanilla E.J. (2017). Determinantes socioeconómicos de la calidad del agua superficial en México. *Fundación Dialnet* 29 (69) 89-125. ISSN 0188-7408, ISSN-e 2448-4849.
- Howe K.J., Hand D.W., Crittenden J.C., Trussell R. R. Tchobanoglous G.2017. Principios de Tratamiento de agua. CENGAGE Learning.
- Jimenez E. M. Castillo C.A. (2021). Microalgal biomass with high potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria*. 12(2)265-282.
- Infante C., Angulo, E., Zárate A., Flores J. Z., Barrios F., Zapata C. (2012) Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética de crecimiento celular. *Avances de Ciencias e Ingenierías* 3(2) 159-164 ISSN: 0718-8706.
- Luque T., Janeth F. (2020). Remoción de nitratos y fosfatos de agua residual mediante el uso de microalgas altiplánicas a nivel experimental. *Acta Nova*, 9(4), 543-552.
- Rodríguez- Castillo, G., Amarelo-Santos, C., Guerrero-Barrantes, M., Delgado dos R.A. Estudio de las características morfológicas y fisiológicas de *Chlorella protothecoides* orientado hacia la producción de lípidos para biocombustible. *Tecnología en Marcha*. 29 (Estudiantes 3) 3-11.
- Twist H, Edwards A, Codd G. (1998). A novel in-situ biomonitor using alginate immobilised algae (*Scenedesmus subspicatus*) for the assessment of eutrophication in flowing surface waters. *Water Resour.* 31(8): 2066-2072.
- Yabur R., Y. Bashan, and G. Hernández-Carmona (2007) "Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion," *J. Appl. Phycol.*, vol. 19, no. 1, pp. 43–53.