

# Estrategia de cultivo mixotrófica para la maximización de la formación de biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana* a escala de laboratorio

Gabriela Sarria Salazar<sup>a</sup>, William S. Arias Vélez<sup>b</sup>, Erika Yuliana Ortiz Montoya<sup>c</sup>, Nelson Hernando Caicedo Ortega<sup>d</sup>

<sup>a,b</sup> Estudiante de ingeniería bioquímica. Departamento de ingeniería bioquímica. Facultad de ingeniería. Universidad Icesi. Cali, Valle del Cauca, Colombia.

<sup>c</sup> PhD en ingeniería química. Departamento de ingeniería bioquímica. Facultad de ingeniería. Universidad Icesi. Cali, Valle del Cauca, Colombia.

<sup>d</sup> PhD en ingeniería. Departamento de ingeniería bioquímica. Facultad de ingeniería. Universidad Icesi. Cali, Valle del Cauca, Colombia.

INFORMACIÓN ARTÍCULO	RESUMEN
<p><b>Palabras clave:</b> Mixotrofia Digestato <i>Chlorella</i> sp. Biomasa</p>	<p>El digestato que surge como subproducto de la digestión anaerobia de residuos porcícolas contiene una elevada proporción de nitrógeno en forma de amonio y macroelementos como fósforo y potasio, ejerciendo así, presión sobre el entorno mediante la contaminación del aire por la volatilización del amoníaco y la eutrofización de los suelos. Con el fin de solucionar esta problemática, se aprovechó el aporte de nutrientes de este efluente como suplemento en el cultivo de microalgas. Para lograr esto, se formuló como objetivo de investigación, maximizar la formación de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Chlorella sorokiniana</i> en un cultivo mixotrófico a escala de laboratorio, empleando como suplemento nutricional digestato. De este modo, para cumplir con el planteamiento propuesto, se desarrollaron cultivos de las cepas ya mencionadas para evaluar la incidencia de la concentración de digestato, empleando tres diluciones de trabajo (1:4, 1:2 y 3:4). Además, se evaluó la cinética de crecimiento de la cepa <i>C. sorokiniana</i> al utilizar dos fuentes de carbono orgánica para su cultivo (glucosa y acetato de sodio). Los resultados obtenidos, demuestran que ambas cepas se adaptan mejor a condiciones de cultivo con el digestato en una dilución 3:4. Sin embargo, <i>C. vulgaris</i> provee mejores resultados con una formación de biomasa de 22.79 mg. De igual forma, empleando glucosa como fuente de carbono orgánica se logra mayor formación de biomasa que al emplear acetato de sodio, 18.82 mg. En conclusión, el digestato es un potencial suplemento de nutrientes para maximizar la formación de biomasa en cultivos de microalgas, como <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Chlorella sorokiniana</i>.</p>

## 1. Introducción

En los últimos años, las microalgas han sido estudiadas por su diversa composición bioquímica, la cual incluye proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y pigmentos. Los componentes de estas han sido aprovechados a nivel biotecnológico, en la obtención de productos con alto valor en el mercado, tales como biodiesel, aditivos alimenticios, suplemento animal, cosméticos, antioxidantes, nutracéuticos, entre otros [1,26]. Las microalgas son un grupo de microorganismos eucariotas unicelulares, con capacidades fotosintéticas similares a las plantas, siendo el género *Chlorella* sp. el más destacado, debido a su versatilidad metabólica (mixotrofia, autotrofia y heterotrofia) y alta tasa de reproducción [2].

Con relación a lo anterior, se han desarrollado diferentes métodos de cultivo en aras de aprovechar su potencial biotecnológico. Sin embargo, los cultivos mixotróficos son los de mayor destaque y potencial [3]. Específicamente, se han observado ventajas asociadas a su desarrollo, al compararse con otras estrategias (autotrofia y heterotrofia), tales como: la presencia de mejores tasas de formación de biomasa que resultan en mejor rendimiento de producción, la presencia de extensas fases exponenciales de crecimiento, prevención a daños foto-oxidativos a causa de las altas acumulaciones de gases de cultivo y fotoinhibición reducida a causa de la asimilación de la fuente energética [4]. Estos se establecen bajo una formulación basada en una fuente de carbono orgánica, una fuente de carbono inorgánica y la presencia de luz (como fuente de energía), lo que implica que las estrategias autotrófica y heterotrófica se desarrollan en el mismo momento y en función de la maquinaria microalgal, lo cual permite fomentar un método de simbiosis entre las capacidades fotosintéticas (conversión de la energía lumínica

en energía química mediante la captación de luz) y el metabolismo oxidativo de las fuentes de carbono [3 - 5].

Aunado a lo anterior, el digestato, un subproducto de la digestión anaerobia de residuos porcícolas se ha impulsado como fuente de nutrientes por el beneficio de su composición y, combinado con la versatilidad nutricional de microorganismos como las microalgas, ha promovido la formación de biomasa [1]. El planteamiento anterior surge debido al uso de dicho efluente como biofertilizante, estrategia comúnmente realizada para el tratamiento de este [6], además de la contaminación del aire por la volatilización del amoníaco y la eutrofización de los suelos, generada por la diversidad de elementos que lo componen [7 - 10].

En consecuencia, con el propósito de brindar soluciones ante la problemática mencionada, la fitorremediación microalgal ha tomado fuerza, debido a que expone una alternativa que emplea digestato como suplemento nutricional, para el cultivo de microalgas. Con ello, se aprovecha de manera sinérgica el potencial asociado a estos microorganismos en la biotransformación de agentes contaminantes, además de la cantidad sustancial de elementos contenidos en este efluente, que pueden emplearse para el crecimiento de estas [6, 9]. De esa manera, se han realizado investigaciones para lograr el uso sostenible de esta alternativa; por ejemplo, Vadiveloo et al., (2019) demostró que las microalgas tienen una alta capacidad de crecimiento en este efluente y, una eficiente tasa de remoción de componentes (aprox. 25 mg/L-día). Adicionalmente, en Arce et al., (2020) se demostró que el digestato es una fuente totalmente aprovechable para el crecimiento de un consorcio de microalgas, especialmente cuando este se encuentra en una dilución 1:2 y se adecua el sistema de cultivo a condiciones mixotróficas.

Con relación a la alternativa mencionada, es vital reconocer que en la teoría actual se evidencia la importancia de ajustar los medios de cultivo a los requerimientos necesarios para las microalgas, incluyendo agua, CO<sub>2</sub>, micronutrientes, fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, en cantidades que no generen algún tipo de inhibición. Pues, si todas o alguna de las condiciones mencionadas son deficientes, se tendrá un crecimiento restringido [7, 12]. Una investigación que soporta lo anterior es la de Gao et al., (2019), donde se demostró la relevancia de la relación inicial de carbono y nitrógeno en la producción de biomasa y se obtuvo que un aumento de 0 hasta 24 en esta relación, favoreció la velocidad de crecimiento de *Chlorella sp.* G9, pero una relación superior a 30 muestra una disminuida velocidad de crecimiento. De lo anterior, suscita que se requiera un especial cuidado en cuanto a la formulación de los medios de cultivo, ya que establecer nutrientes, condiciones y parámetros apropiados favorece que, en función de lo mencionado en párrafos anteriores, se logre el crecimiento de biomasa y rendimiento esperado.

En definitiva, con relación a los planteamientos realizados, el objetivo de este estudio fue maximizar la formación de biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana* en un cultivo mixotrófico a escala de laboratorio, empleando como suplemento nutricional digestato proveniente de la digestión anaerobia de residuos porcícolas.

## 2. Materiales y metodología

### 2.1. Microorganismos y desarrollo de inóculo

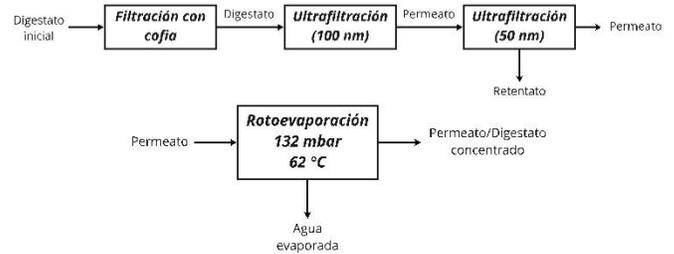
Las microalgas *Chlorella vulgaris* (UTEX 2714) y *Chlorella sorokiniana* (UTEX 1602) empleadas en esta investigación se obtuvieron de la colección de la Universidad de Texas (Austin, Tx). Las cepas se sembraron siguiendo el protocolo de desarrollo de inóculo enunciado en Arce et al., (2020), donde estas se mantuvieron en refrigeración en medio sólido Tris Acetato Fosfato (TAP) modificado. La composición del medio, por litro de preparación es: 2.42 g Tris-base, 25 mL del stock de sales (16 g NH<sub>4</sub>Cl, 4 g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 2 g CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O), 0.375 mL solución stock I (28.8 g por 100 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14.4 g por 100 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 mL de elementos traza (11.167 mg EDTA – Na<sub>2</sub>, 0.035mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.067 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1.188 mg MnCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O, 5.40 mg FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 0.34 mg CuCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O).

Inicialmente, se tomó una alícuota con un asa estéril de la cepa refrigerada a 4 °C y se sembró por agotamiento en medio TAP sólido suplementado con 3 g/L de acetato de sodio y 0.4 g/L de cloruro de amonio. Una vez realizada la siembra, se sellaron las cajas Petri y se expusieron a la luz durante 5 días. Posteriormente, se utilizó la biomasa producida para preparar los inóculos (aproximadamente 200 mg células/L) en un Frasco Schott de 500 mL con 250 mL de medio TAP líquido suplementado con 1.5 g/L de acetato de sodio, 3 g/L de bicarbonato de sodio y 0.84 g/L de cloruro de amonio. Los cultivos se expusieron a un nivel de iluminación 25 ( $\frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2\text{s}}$ ) a una temperatura que oscila entre 25 y 28°C y un pH de 7.5 durante 2.5 días para *C. sorokiniana* y *C. vulgaris*. La aireación se suministró por flujo continuo de aire filtrado (0.22 micras), por medio de una de las entradas de la tapa adaptaba al frasco Schott.

### 2.2. Tratamiento del digestato

Las muestras de digestato empleadas en esta investigación fueron proporcionadas por una granja porcícola ubicada en Guacarí, Valle del Cauca, provenientes de un tratamiento de digestión anaerobia. Estas,

inicialmente se concentraron mediante un proceso de filtración y, posteriormente mediante ultrafiltración, pasando por una membrana de 100 nm y, seguido, por una membrana de 50 nm. Luego, el permeato resultante, se rotoevaporó a una presión absoluta de 132 mbar y una temperatura de 62°C (Fig. 1). Finalmente, se pasaron por un filtro de celulosa de 0,22 micras.



**Fig. 1.** Proceso de ultrafiltración y rotoevaporación de las muestras de digestato.

### 2.3. Caracterización del digestato

Las muestras de digestato pre y post concentración se caracterizaron mediante una metodología realizada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Esta caracterización permitió identificar la concentración (g/L) de carbono y nitrógeno totales presente en las muestras.

El tipo de análisis desarrollado se divide en dos partes: La primera, que corresponde al análisis de carbono orgánico total (COT), elaborado mediante una metodología redox y espectrofotometría en un equipo autoanizador Skalar, y la segunda, que corresponde al análisis de nitrógeno total (N-Total), mediante digestión ácida y espectrofotometría en el mismo equipo mencionado anteriormente.

### 2.4. Cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana*

Las condiciones de cultivo mixotrófico fueron agitación a 180 rpm, pH 7.5 +/-0.5, fotoperíodo de 24:00 horas e intensidad lumínica de 4  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2\text{s}}$ .

Seguidamente, se realizaron cultivos mixotróficos en Erlenmeyers con un volumen de trabajo de 100 mL de medio, con suplementación de una fuente de carbono orgánica e inorgánica, una fuente de nitrógeno y medio TAP modificado como se indica en la tabla 1. Para la cepa *C. sorokiniana* los tratamientos 1, 2 y 3 propuestos, tuvieron digestato en dilución 1:4, 1:2 y 3:4, de forma correspondiente. Por otro lado, para la cepa *C. vulgaris* se montaron dos tratamientos, que corresponden al número 2 y 3, considerando las diluciones ya mencionadas. Las concentraciones planteadas para cada medio se establecieron de acuerdo con el aporte final de carbono y nitrógeno para todos los cultivos, 1.50 g y 0.21 g, respectivamente.

**Tabla 1.**

Composición del medio de cultivo.

	Control	Tratamientos
Fuente orgánica de carbono	Glucosa	Glucosa, digestato
Fuente inorgánica de carbono		Bicarbonato de sodio
Fuente de nitrógeno		Urea
Otros		Medio TAP modificado

A continuación, se muestra el aporte de carbono y nitrógeno por la suplementación (glucosa, bicarbonato y urea) y por el digestato diluido.

**Tabla 2.**

Aporte de carbono y nitrógeno en los medios de cultivo. La suplementación incluye el aporte de carbono ofrecido por el ácido acético glacial y tris base, contenidos en la formulación del medio TAP modificado.

	Suplementación		Digestato	
	CT (g)	NT (g)	CT (g)	NT (g)
Control 1 y 1*	1.50	0.21	0.00	0.00
Tratamiento 1 y 1*	1.484	0.208	0.016	0.002
Tratamiento 2 y 2*	1.467	0.206	0.033	0.004
Tratamiento 3 y 3*	1.451	0.204	0.049	0.006

CT: Carbono total, NT: Nitrógeno total, \*: Réplica.

### 2.5. Cuantificación de biomasa de *Chlorella sp.*

Se tomó un volumen de 4 mL de muestra de cada experimento. De estos, 2 mL fueron llevados a centrifugación a 4000 rpm y 25°C durante 5 minutos con el fin de separar la biomasa del sobrenadante. Posterior al proceso de separación, se leyó absorbancia mediante densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 741 nm [28] utilizando un espectrofotómetro Vernier, donde el sobrenadante, que representa el medio de cultivo, fue utilizado como blanco y los 2 mL restantes del muestreo corresponden a la muestra leída. Finalmente, se determinó la concentración celular (g biomasa/L) mediante la curva de calibración para cada cepa, ecuación (1) para *Chlorella vulgaris* y ecuación (2) para *Chlorella sorokiniana*.

$$\text{Concentración } \left(\frac{g}{L}\right) = 0.8109 * \text{Absorbancia} - 0.0301 \quad (1)$$

$$\text{Concentración } \left(\frac{g}{L}\right) = 0.5085 * \text{Absorbancia} - 0.0327 \quad (2)$$

### 2.6. Evaluación de pH

Las mediciones de pH se realizaron en cada uno de los muestreos establecidos. Para esto, una vez separado el sobrenadante de la biomasa, se empleó un potenciómetro para determinar el pH de cada experimento. Adicionalmente, con el objetivo de mantener el pH en el rango establecido (7.5+/- 0.5) se adicionó ácido o base, según el requerimiento, utilizando ácido acético [1M] e hidróxido de sodio [8M], respectivamente.

### 2.7. Evaluación del consumo de las fuentes de carbono orgánica e inorgánica

En primer lugar, para determinar el consumo de la fuente inorgánica de carbono, en este caso bicarbonato de sodio  $NaHCO_3$ , se usaron cintas colorimétricas (Marca merckoquant). Cada medición consistía en añadir una gota del sobrenadante sobre la cinta y establecer la concentración (g/L) de este en el medio, a partir de la coloración arrojada.

En segundo lugar, para determinar el consumo de una las fuentes orgánicas de carbono empleadas, en este caso glucosa, se realizaron pruebas colorimétricas con reactivo DNS. Para esto, se empleó la metodología descrita por Başkan et al., (2016).

### 2.8. Validación de cultivos mixotróficos empleando digestato diluido

Con la finalidad de ratificar los resultados obtenidos en el numeral 2.4. y de acuerdo con el mayor crecimiento de biomasa logrado en los tratamientos del mismo numeral, se realizaron ocho montajes nuevos

utilizando las cepas *C. vulgaris* y *C. sorokiniana*, y una dilución de digestato 3:4 (Fig. 2). Las condiciones de cultivo ya han sido enunciadas anteriormente.



**Fig. 2.** Cultivos mixotróficos de *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* con digestato en dilución 3:4.

### 2.9. Cultivo mixotrófico de *Chlorella sorokiniana* para la evaluación de diferentes fuentes de carbono

Con el fin de evaluar la influencia de la fuente de carbono orgánica utilizada en la formulación del cultivo, se empleó la cepa *C. sorokiniana* para llevar a cabo ocho montajes con un volumen de medio de 50 mL. En este caso, se empleó glucosa y acetato de sodio, cuya distribución en los controles y tratamientos se indica en la tabla 3. Además, los tratamientos contenían digestato en una dilución 5:8, proporción seleccionada de acuerdo con los resultados anteriores y considerando el volumen disponible del efluente como una limitación en el proceso. Las condiciones de cultivo fueron: agitación a 180 rpm, pH 7.5+/-0.5, fotoperíodo de 24:00 horas e intensidad lumínica de  $4 \frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$ . Finalmente, las concentraciones propuestas para cada medio se establecieron de acuerdo con el aporte final de carbono y nitrógeno para todos los cultivos, 0.45 g y 0.11 g, respectivamente.

**Tabla 3.**

Fuente de carbono orgánica en los controles y tratamientos.

	Glucosa	Acetato de sodio
Control y tratamiento 1	x	
Control y tratamiento 2		x

x: Indica que hace parte de su composición.

A continuación, se muestran los datos correspondientes al aporte de carbono y nitrógeno:

**Tabla 4.**

Aporte de carbono y nitrógeno en los medios de cultivo.

	Suplementación		Digestato	
	CT (g)	NT (g)	CT (g)	NT (g)
Control 1 y 1*	0.450	0.110	0.000	0.000
Tratamiento 1 y 1*	0.431	0.108	0.019	0.002
Control 2 y 2*	0.450	0.110	0.000	0.000
Tratamiento 2 y 2*	0.431	0.108	0.019	0.002

CT: Carbono total, NT: Nitrógeno total, \*: Réplica.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Caracterización del digestato

Las concentraciones de carbono orgánico total y nitrógeno total de las muestras obtenidas en los procedimientos realizados mediante la metodología descrita en el numeral 2.3 se observan en la tabla 5.

**Tabla 5.**

Concentración de carbono y nitrógeno total en las muestras de digestato.

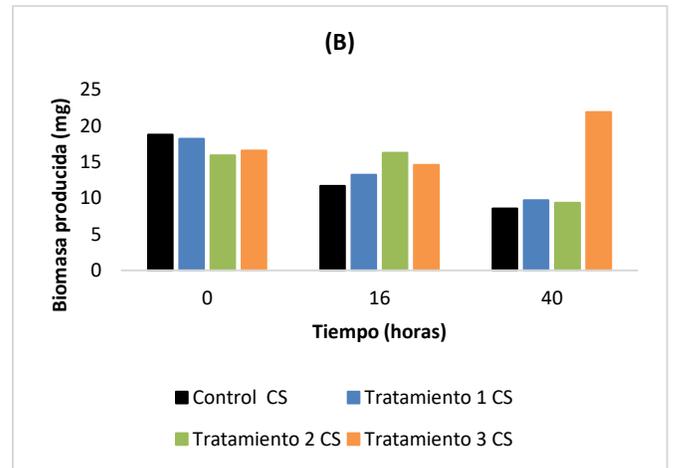
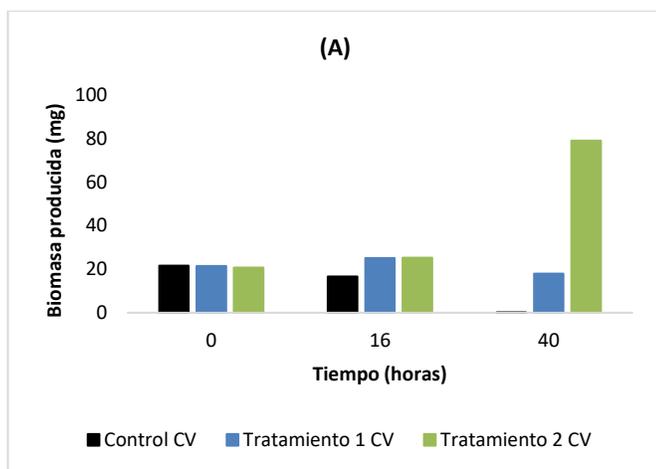
#	Descripción	COT (g/L)	N-Total (g/L)
1	Digestato líquido - retentato	0.778	0.316
2	Digestato líquido - permeato	0.706	0.091

COT: Carbono orgánico total, N-Total: Nitrógeno total.

Diferentes operaciones unitarias como la filtración, la evaporación, la centrifugación, la ultrafiltración y la precipitación son convencionalmente usadas para el pretratamiento de las muestras de digestato con objeto de remover impurezas y demás sólidos suspendidos, que puedan afectar el crecimiento de las microalgas [10, 29]. En Arce et al., (2020), se rotoevaporó este efluente obteniendo resultados en las concentraciones de carbono y nitrógeno total de 1.42 g/L y 0.62 g/L, respectivamente. En comparación con los datos de este estudio, donde se realizó una ultrafiltración previa a la rotoevaporación, se observa que la concentración de carbono y nitrógeno total presentes una vez finalizados ambos procesos son menor (Tabla 5), lo que puede indicar que existe una relación entre la composición y la operación usada, especialmente, cuando la ultrafiltración resulta ventajosa para la separación de partículas disueltas en agua con un tamaño de hasta 2 µm [30]. Con relación a lo anterior, es posible que este último proceso estuviera separando carga orgánica en las dos corrientes de salida (retentato y permeato), disminuyendo así la concentración de carbono y nitrógeno en la corriente de interés. No obstante, a partir de la caracterización realizada, se obtiene una relación C/N de 2.5, permitiendo que el digestato pueda suplementar nutritivamente los cultivos y, así, alcanzar el valor esperado de la relación C/N (4-8) para el crecimiento de las microalgas [14, 15].

#### 3.2. Cultivo mixotrófico de *C. sorokiniana* y *C. vulgaris*

Se realizaron medios de cultivo para evaluar el crecimiento de *C. vulgaris* y *C. sorokiniana*. Estos medios se realizaron con digestato diluido (en relación 1:4, 1:2 y 3:4) y se suplementaron con glucosa, bicarbonato de sodio y urea. Se determinó el crecimiento de biomasa mediante la metodología anteriormente descrita.



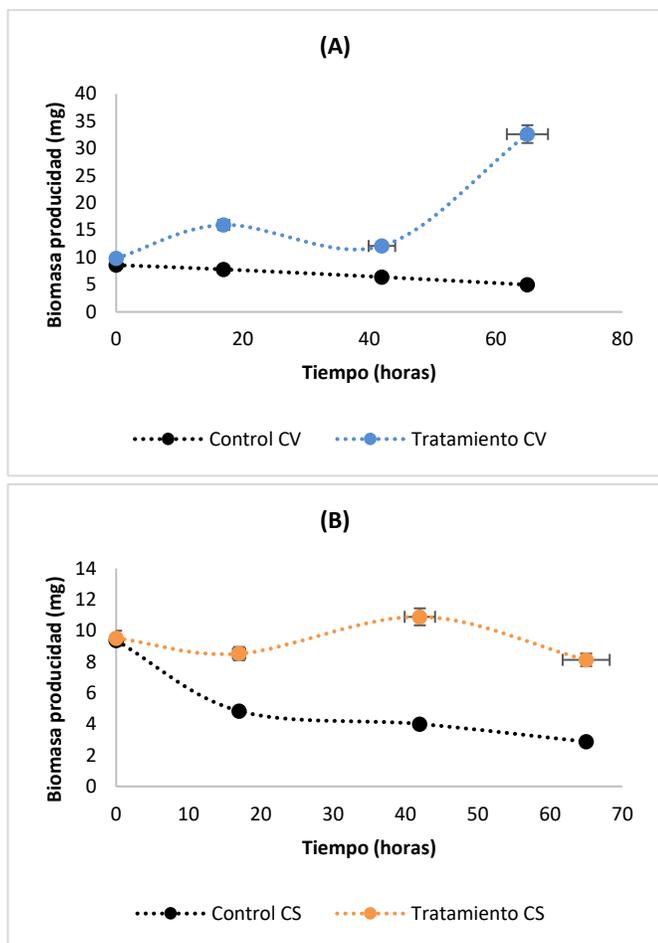
**Fig. 3.** (A) Crecimiento microalgal de *C. vulgaris* en el control junto con los tratamientos 1 y 2. (B) Crecimiento microalgal de *C. sorokiniana* en el control junto con los tratamientos 1, 2 y 3. CV: *C. vulgaris*, CS: *C. sorokiniana*.

El crecimiento de *C. vulgaris* en la fig. 3, permite afirmar que - durante las 40 horas de cultivo- el tratamiento 3 (digestato diluido 3:4) presentó la mayor formación de biomasa, 58.32 miligramos. Además, respecto al crecimiento de *C. sorokiniana* en medios formulados bajo mixotrofia, en la fig. 3. se observa que en las primeras 40 horas de cultivo el crecimiento también fue mayor para el tratamiento 3. Con relación al control, primer y segundo tratamiento, se observó muerte celular temprana. En función de este hecho, se decidió extender el tiempo de cultivo del tercer tratamiento hasta las 136 horas, obteniendo así 30.84 miligramos de biomasa formada.

Estas mayores formaciones de biomasa observadas en los tratamientos menos diluidos podrían explicarse como consecuencia de que la suplementación de los nutrientes por parte del digestato corresponde en términos de concentración a los de la dilución ya establecida [15, 31]. Tanto en Ayre et al., (2017) como en Wang et al., (2016), se ha reportado el crecimiento de *C. vulgaris* en medios donde se ha empleado el digestato sin dilución, con el propósito de aprovechar la composición nutricional de este de forma completa. Esto, encamina que deba seleccionarse un dosaje de digestato apropiado para garantizar una calidad adecuada del suplemento y, así, reducir los efectos de los factores limitantes (concentración de nutrientes, luz, entre otros) sobre el crecimiento. No obstante, debe considerarse que el uso del digestato sin dilución puede incrementar la turbidez del medio y de este modo, restringir el crecimiento celular.

#### 3.3. Validación de cultivos mixotróficos

A raíz de los resultados obtenidos en las corridas previas, se realizó un nuevo diseño experimental, empleando inóculos de *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* en un montaje que contenía tratamientos con digestato en una dilución 3:4. Los resultados obtenidos en esta etapa experimental se muestran a continuación:



**Fig. 4.** (A) Cinética de crecimiento microalgal de *C. vulgaris*. Desviación estándar: 11.39. (B) Cinética de crecimiento microalgal de *C. sorokiniana*. (A y B) Digestato en dilución 3:4. CV: *C. vulgaris*, CS: *C. sorokiniana*.

De la fig. 4. se observa que el tratamiento de *C. vulgaris* presenta crecimiento de biomasa durante el tiempo de cultivo, 22.79 miligramos (Tabla 6). Para el caso de *C. sorokiniana* la formación de biomasa aumenta de la hora 17 a la 42. Sin embargo, una vez finalizadas las 65 horas de cultivo disminuye la biomasa en el medio. Específicamente, para este último caso donde no es posible apreciar el crecimiento de la cepa, pueden considerarse factores como la turbidez en el medio. Adicionalmente, se plantea que después de cierto tiempo, la intensidad lumínica suministrada excede los requerimientos necesarios para el crecimiento microalgal, pues el cambio en la coloración puede asociarse a un proceso de fotoinhibición. Asimismo, es posible afirmar que la cepa *C. sorokiniana* una vez transcurridas más de 40 horas de cultivo pierde afinidad por el digestato, lo que implica que el proceso de adaptabilidad no persiste y, por lo tanto, las células entran en un estado de muerte celular.

De este estudio, es importante resaltar que los controles, que permitían llevar a cabo el monitoreo del crecimiento en los tratamientos a partir del digestato, no pueden considerarse representativos, ya que durante el tiempo de cultivo ambos controles presentan una disminución en la biomasa producida, decrecimiento que es más pronunciado para la cepa *C. sorokiniana*. En una investigación realizada por Li et al. (2014), se afirma que concentraciones de glucosa por encima de 8 g/L no contribuyen al crecimiento de las microalgas, y se propone un rango de trabajo entre 2 y 6 g/L de esta fuente de carbono, incluso los resultados

permiten afirmar que una concentración de 4 g/L de glucosa genera una mayor tasa de crecimiento en condiciones mixotróficas al compararse con un metabolismo heterotrófico. Lo anterior, supone que los controles, que carecen de digestato, hayan proporcionado una intoxicación de las microalgas, restringiendo así su crecimiento.

Por otra parte, debido a que las condiciones de cultivo empleadas para ambos casos son iguales y el factor diferencial en este recae sobre la cepa utilizada en cada planteamiento, se evidencia que existe un mejor proceso de adaptabilidad de la cepa *C. vulgaris* a medios formulados con contenido de digestato en dilución 3:4, lo que permite que haya crecimiento celular durante el tiempo de cultivo.

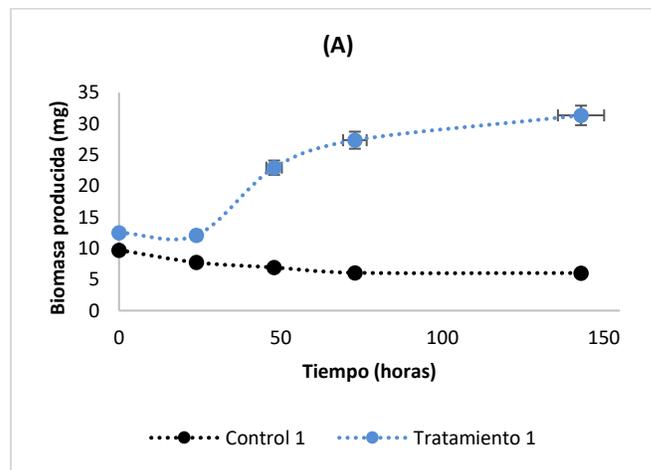
**Tabla 6.**

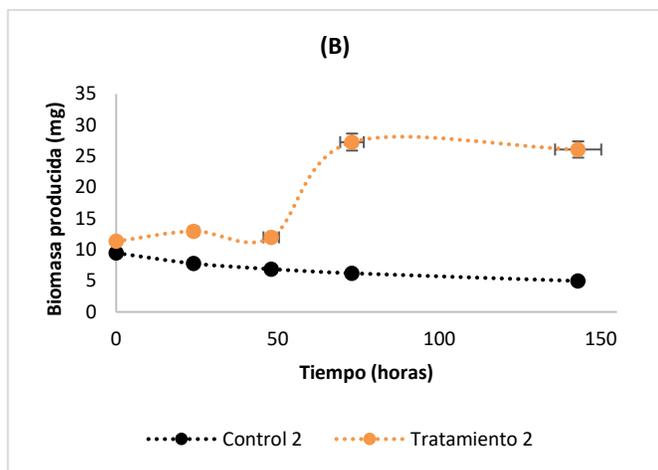
$\Delta$ Biomasa y velocidad de formación durante el tiempo de cultivo.

	Biomasa formada: Mx final-Mx inicial (mg)	Velocidad de formación: dMx/dt (mg/h)
Control CV	0	-
Tratamiento CV	22.79	0.35
Control CS	0	-
Tratamiento CS	0	-

#### 3.4. Cultivo mixotrófico de *Chlorella sorokiniana* para la evaluación de diferentes fuentes de carbono

Se desarrollaron corridas experimentales de la cepa *C. sorokiniana* con el fin de evaluar la influencia de diferentes fuentes de carbono (glucosa y acetato de sodio) sobre su crecimiento. Empleando un volumen de trabajo de 50 mL, con una dilución de digestato 5:8 y un fotoperíodo 24:00. Luego de 143 horas de cultivo los resultados son los siguientes:





**Fig. 5.** (A) Cinética de crecimiento microalgal de *C. sorokiniana* empleando glucosa como fuente de carbono orgánica. (B) Cinética de crecimiento microalgal de *C. sorokiniana* empleando acetato de sodio como fuente de carbono orgánica. (A y B) Digestato en dilución 5:8.

En la fig. 5. se evidencia crecimiento de biomasa para los tratamientos 1 y 2, es decir, tanto el tratamiento con glucosa como con acetato de sodio como fuente de carbono orgánica proveen la suplementación necesaria para el crecimiento microalgal. En los resultados obtenidos para el tratamiento 1, con glucosa, se obtienen 18.82 miligramos de biomasa (Tabla 7), mientras que para el tratamiento 2, con acetato de sodio, se obtienen 14.73 miligramos de biomasa (Tabla 7). Esto indica que la glucosa en compañía del digestato como fuente de carbono orgánica, permite una mejor adaptabilidad de la cepa en el medio, por consiguiente, logra un mayor crecimiento. Una concordancia similar se afirma en estudios previos donde se ha observado que *C. sorokiniana* en cultivos mixotróficos asimila y crece de mejor manera con glucosa sobre acetato de sodio a bajas intensidades lumínicas [18, 25].

Con relación a estas mismas fuentes de carbono orgánicas empleadas en los cultivos, se han reportado valores en la literatura acerca de la formación de biomasa; referente a la glucosa, estudios han obtenido 736 y 762 mg de biomasa de *C. sorokiniana* a partir de una concentración inicial 20 y 10 g/L respectivamente [25]. Por otro lado, al emplear acetato de sodio, se han obtenido entre 400 y 700 mg de biomasa partiendo de 1 g/L como concentración inicial de la fuente de carbono orgánica [34,35]. Es importante hacer la salvedad de que, estas diferencias observadas entre lo reportado en la literatura y los resultados de este estudio radicarían en las diferentes condiciones en las que se desarrollaron todos los cultivos.

**Tabla 7.**

$\Delta$ Biomasa y velocidad de formación durante el tiempo de cultivo.

	Biomasa formada: Mx final-Mx inicial (mg)	Velocidad de formación: dMx/dt (mg/h)
Control 1	0	-
Tratamiento 1	18.82	0.13
Control 2	0	-
Tratamiento 2	14.73	0.10

Adicional a lo anterior, en la fig. 5. para los casos presentados, los controles no evidencian crecimiento de biomasa. Una hipótesis que ha sido estudiada afirma que el digestato sirve de barrera en la formulación de los medios y confiere así mayor estabilidad con referencia a las condiciones, como la luz, por ejemplo, para el crecimiento microalgal. Además, Degrenne et al., (2010) establecen que específicamente el

acetato, en concentraciones por encima de 1 g/L puede inhibir el crecimiento debido a la intoxicación de las microalgas, mientras que en concentraciones más bajas estimula el crecimiento de estas. Estos dos fenómenos en conjunto pueden explicar el comportamiento del tratamiento que contiene acetato de sodio. Por otro lado, un aumento en la concentración de glucosa proporciona un cambio en la coloración del medio de verde a amarillo [20], coloración que puede explicarse con una disminución en la concentración de biomasa en el medio. Este suceso se evidencia de forma visual en los controles propuestos, donde la coloración pasa de verde hasta casi cristalino, lo que indica muerte celular y por consiguiente el cese en la producción de biomasa.

### 3.5. Evaluación de pH

Se separó el medio de la biomasa de cada muestra y se realizó medición de pH empleando el sobrenadante. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8 para los experimentos del numeral 2.8 y en la tabla 9 para los experimentos del numeral 2.9.

**Tabla 8.**

Valor de pH obtenido en cada experimento, numeral 2.8.

Hm	Controles y tratamientos			
	Control CV	Tratamiento CV	Control CS	Tratamiento CS
0	7.37	7.23	7.38	7.26
17	7.43	7.34	7.42	7.30
42	7.57	7.52	7.50	7.47
65	7.45	7.55	7.46	7.21

Hm: Hora de muestreo.

Los valores de pH presentados en la tabla anterior (Tabla 8) muestran la adecuación del cultivo a cambios de pH en el rango establecido, 7.5+/-0.5. Cabe resaltar que inmediatamente después de inocular se realizó una medición con cinta de pH, la cual arrojó resultados indicando que el tratamiento, tanto para *C. vulgaris* como para *C. sorokiniana*, tenían un pH cercano a ocho. Por lo anterior, a estos experimentos específicamente, se les añadieron 200  $\mu$ L de ácido acético glacial permitiendo mejorar los valores hasta alcanzar los presentados en la tabla.

**Tabla 9.**

Valor de pH obtenido en cada experimento, numeral 2.9.

Hm	Controles y tratamientos			
	Control 1	Tratamiento 1	Control 2	Tratamiento 2
0	7.43	7.54	7.38	7.51
24	7.54	7.89	7.56	7.88
48	7.62	8.11	7.60	8.25
72	7.76	7.96	7.66	7.91
144	7.38	7.53	7.62	7.88

Hm: Hora de muestreo.

En la tabla 9 se muestra la variación del pH promedio de los controles y tratamientos durante el tiempo de cultivo. Los registros llevados a cabo con el fin de mantener el pH en el rango estimado son los mismos que se han mencionado con anterioridad.

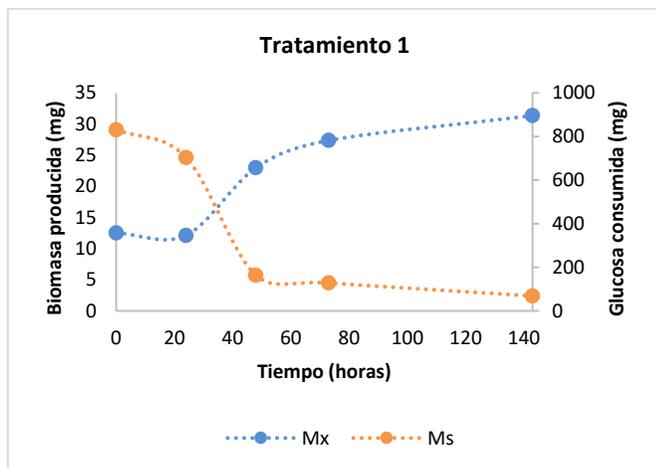
El aumento en el pH observado en el tratamiento 2 (Tabla 9) y el crecimiento de biomasa en el mismo (Fig. 5. B), permite aseverar que este crecimiento se da por el consumo del acetato de sodio y/o bicarbonato de sodio -a pesar de no haberse cuantificado- pues la elevación del pH en el medio puede atribuirse al consumo de estas fuentes de carbono [18,22,23]. De igual forma, se observa un aumento en el pH (Tabla 9) para el tratamiento uno a medida que se consume la glucosa del medio (Fig. 6.), hecho que no concuerda con la variación del pH en el tiempo

cuando hay consumo de glucosa, pues el valor debería reducirse a medida que esto sucede [23]. Sin embargo, el bicarbonato de sodio empleado en el medio como fuente de carbono inorgánica puede representar la explicación a este hallazgo. Este componente se ha propuesto como una fuente alternativa debido a sus ventajas potenciales en menores costos de suministro de carbono, no obstante, su consumo provee alta alcalinidad en los medios debido a la generación de OH<sup>-</sup> [32,33]. Este último planteamiento se presenta como una hipótesis, debido a la falta de datos en la medición de esta fuente de carbono.

### 3.6. Evaluación de la cinética de consumo de las fuentes de carbono

La cinética de consumo a presentar se estima solo en los casos donde se trabaja con glucosa como fuente de carbono orgánica suplementada. Las mediciones fueron realizadas mediante una reacción con DNS, proporcionando los datos de la concentración de azúcares en el tiempo.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la formación de biomasa durante el tiempo de cultivo (Tabla 7) para los últimos experimentos realizados, se seleccionó el tratamiento uno con el fin de presentar la cinética de crecimiento microalgal a partir del consumo de la fuente de carbono orgánica.



**Fig. 6.** Cinética de crecimiento microalgal de *C. sorokiniana* empleando glucosa como fuente de carbono orgánica y digestato diluido en una relación 5:8.

En la fig. 6. se muestra el consumo de la fuente de carbono orgánica empleada para el cultivo de *C. sorokiniana* en el tratamiento uno. La biomasa formada durante el proceso se reporta en la tabla 7. A partir de los resultados de esta etapa experimental, se reporta un consumo de glucosa de 762.67 miligramos durante aproximadamente 144 horas (Tabla 10), donde entre las 24 y 73 horas se consume casi la totalidad de la glucosa del medio, mismos tiempos en los que se observa la fase exponencial. En contraste con lo anterior, no es posible predecir o brindar información acerca del consumo del bicarbonato de sodio y el digestato, pues dentro del proceso se reconocen las limitaciones al intentar obtener estos datos.

**Tabla 10.**

ΔGlucosa y velocidad de consumo durante el tiempo de cultivo.

	Glucosa consumida: Ms final-Ms inicial (mg)	Velocidad de consumo: dMs/dt (mg/h)
Tratamiento 1	762.67	-5.33

Los valores reportados de biomasa y la velocidad de formación de esta (Tabla 7), podrían ser un indicativo de la asimilación que tiene la cepa *Chlorella sorokiniana* hacia las diferentes fuentes de carbono orgánica, pues es el factor diferencial en este último diseño de experimentos. Cabe resaltar que los resultados no son del todo desiguales y que, al no tener claridad sobre el comportamiento del acetato de sodio en la formulación del medio para la formación de biomasa, es imposible establecer una cinética de consumo a partir de esta fuente de carbono.

## 4. Conclusiones

Las cepas *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* demostraron un mejor crecimiento en cultivos mixotróficos donde se emplea digestato como suplemento nutricional, en una dilución 3:4. Sin embargo, *C. vulgaris* brinda evidencia de una mayor formación de biomasa en estos mismos tratamientos, fenómeno que indica una adecuada adaptabilidad por parte de la cepa en la formulación del medio que contiene el efluente líquido. De igual manera, se propone el uso de glucosa como fuente de carbono orgánica en la complementación del cultivo, ya que a partir del estudio realizado es posible afirmar que este compuesto en conjunto con el digestato provee un mayor rendimiento de biomasa en los medios propuestos. Además, se resalta el uso de este subproducto de la digestión anaerobia de residuos porcícolas como componente aprovechable en la preparación de medios de cultivo de metabolismo mixotrófico, permitiendo maximizar la formación de biomasa a escala de laboratorio, debido a su composición, combinada con la versatilidad nutricional de las microalgas, como *Chlorella* sp.

Por otra parte, para futuras investigaciones se recomienda evaluar la incidencia de las condiciones de cultivo empleadas para *C. sorokiniana* utilizando la cepa *C. vulgaris*. De igual forma, se propone realizar el seguimiento del consumo de la fuente de carbono inorgánica seleccionada, para establecer de forma experimental su aporte en la formación de biomasa, ya que en este estudio no fue posible. Finalmente, para las granjas e industrias con actividades porcícolas, se sugiere que esta exploración sobre cultivos de microalgas suplementados con digestato, sea tenida en cuenta como una potencial solución ante la problemática generada por este residuo.

## Referencias

- [1] Levine I. Algae. Seaweed in Health and Disease Prevention. (2016);1-5.
- [2] Liu J, Chen F. Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects. Microalgae Biotechnology. (2014);1-35.
- [3] Pang N, Gu X, Chen S, Kirchoff H, Lei H, Roje S. Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. Renewable and Sustainable Energy Reviews. (2019);112:450-60.
- [4] Patel AK, Choi YY, Sim SJ. Emerging prospects of mixotrophic microalgae: Way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. Bioresource Technology. (2020);300:122741.
- [5] Abalde J, Cid A, Fidalgo P, Herrero C, Torres E. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Universidad de la Coruña. Servicio de Publicaciones; (1995).
- [6] Vadiveloo A, Nwoba EG, Moheimani NR. Viability of combining microalgae and macroalgae cultures for treating anaerobically digested piggyer effluent. Journal of Environmental Sciences. (2019); 82:132-44.
- [7] Chuka-ogwude D, Ogbonna J, Moheimani NR. A review on microalgal culture to treat anaerobic digestate food waste effluent. Algal Research. (2020);47:101841.

- [8] Godos I, Vargas VA, Blanco S, González MCG, Soto R, García-Encina PA, et al. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology*. (2010);101(14):5150–8.
- [9] Makdi M, Tomcsik A, Orosz V. Digestate: A New Nutrient Source - Review. *Biogas*. (2012)
- [10] Nwoba EG, Moheimani NR, Ubi BE, Ogbonna JC, Vadiveloo A, Pluske JR, et al. Macroalgae culture to treat anaerobic digestion piggery effluent (ADPE). *Bioresource Technology*. (2017);227:15–23.
- [11] Arce I, Caicedo N, Gómez D, Ortiz E. Estudio del efecto del uso de digestato anaerobio de porcínaza sobre el cultivo mixotrófico de *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris*. Proyecto de grado, Universidad Icesi. (2020).
- [12] Fazal T, Mushtaq A, Rehman F, Ullah Khan A, Rashid N, Farooq W, Rehman M S U, Xu J. Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3107–3126. (2018).
- [13] Gao F, Yang H-L, Li C, Peng Y-Y, Lu M-M, Jin W-H, et al. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella sp*. *Bioresource Technology*. (2019);282:118–24.
- [14] Ward AJ, Lewis DM, Green FB. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*. (2014);5:204–14.
- [15] Chong CC, Cheng YW, Ishak S, Lam MK, Lim JW, Tan IS, et al. Anaerobic digestate as a low-cost nutrient source for sustainable microalgae cultivation: A way forward through waste valorization approach. *Science of The Total Environment*. (2022);803:150070.
- [16] Ayre JM, Moheimani NR, Borowitzka MA. Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. *Algal Research*. (2017); 24:218–26.
- [17] Wang M, Yang Y, Chen Z, Chen Y, Wen Y, Chen B. Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae. *Bioresource Technology*. (2016); 222:130–8.
- [18] Huang A, Sun L, Wu S, Liu C, Zhao P, Xie X, et al. Utilization of glucose and acetate by *Chlorella* and the effect of multiple factors on cell composition. *Journal of Applied Phycology*. (2016);29(1):23–33.
- [19] Degrenne B, Pruvost J, Christophe G, Cornet J F, Cogne G, Legrand J. Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 19741-10749. (2010).
- [20] Qiao H, Wang G. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. (2009);27(4):762–8.
- [21] Gao P, Guo L, Gao M, Zhao Y, Jin C, She Z. Regulation of carbon source metabolism in mixotrophic microalgae cultivation in response to light intensity variation. *Journal of Environmental Management*. (2022); 302:114095.
- [22] Beltrán-Rocha JC, Guajardo-Barbosa C, Barceló-Quintal ID, López-Chuken UJ. Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de biología marina y oceanografía*. (2017);52(3):417–27.
- [23] Xie Z, Lin W, Liu J, Luo J. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for biomass production by using pH-stat culture medium: Glucose-Acetate-Phosphorus (GAP). *Bioresource Technology*. (2020);313:123506.
- [24] Li T, Zheng Y, Yu L, Chen S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*. (2014); 66:204–13.
- [25] Li Y-R, Tsai W-T, Hsu Y-C, Xie M-Z, Chen J-J. Comparison of Autotrophic and Mixotrophic Cultivation of Green Microalgal for Biodiesel Production. *Energy Procedia*. (2014); 52:371–6.
- [26] Wei N, Quarterman J, Jin Y-S. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*. (2013);31(2):70–7.
- [27] Başkan K S, Tütem E, Akyüz E, Özen S, Apak, R. Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. *Talanta*, 147, 162-168. (2016).
- [28] De Oliveira G A, Teixeira V M, Da Cunha J N, Rangel M, Dos Santos V M P, Rezende, M J C, D'Elia E. Biomass of Microalgae *Chlorella sorokiniana* as Green Corrosion Inhibitor for Mild Steel in HCl Solution. *International journal of electrochemical science*. (2021).
- [29] Nwoba EG, Ayre JM, Moheimani NR, Ubi BE, Ogbonna JC. Growth comparison of microalgae in tubular photobioreactor and open pond for treating anaerobic digestion piggery effluent. *Algal Research*. (2016);17:268–76.
- [30] Leos J Z, Zydney A L. *Microfiltration and ultrafiltration: principles and applications*. Routledge. (2017).
- [31] Wang L, Li Y, Chen P, Min M, Chen Y, Zhu J, et al. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp*. *Bioresource Technology*. (2010);101(8):2623–8.
- [32] Zhu C, Chen S, Ji Y, Schwaneberg U, Chi Z. Progress toward a bicarbonate-based microalgae production system. *Trends in Biotechnology*. (2021).
- [33] Gao P, Guo L, Zhao Y, Jin C, She Z, Gao M. Enhancing microalgae growth and product accumulation with carbon source regulation: New perspective for the coordination between photosynthesis and aerobic respiration. *Chemosphere*. (2021) ;278:130435.
- [34] Xie Y, Li J, Ma R, Ho S-H, Shi X, Liu L, Chen J. Bioprocess operation strategies with mixotrophy/photoinduction to enhance lutein production of microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60. *Bioresource Technology*. (2019). 121798.
- [35] Chen C-Y, Ho S-H, Liu C-C, Chang J-S. Enhancing lutein production with *Chlorella sorokiniana* Mb-1 by optimizing acetate and nitrate concentrations under mixotrophic growth. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. (2017);79:88–96.