

Concentración celular y biomasa seca en tres especies de microalgas marinas: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*

Cellular concentration and dry biomass in three species of marine microalgae: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis striata*

Sheda Méndez Ancca ^{1,*}, Yesica Alvarez ¹, Luis E. Sosa ¹ & Yhordan. G. Vizcarra ²

¹ Universidad Nacional de Moquegua, Filial Ilo Ciudad Jardín Ilo Moquegua - Perú.

² Instituto del Mar del Perú – Laboratorio Costero de Ilo Jr. Mirave 101, Región Moquegua – Perú

* Autor para correspondencia: shedamendez@gmail.com

Sheda Méndez Ancca  <https://orcid.org/0000-0002-3797-1316>

ARTÍCULO BREVE

INFORMACIÓN DE ARTÍCULO

Artículo recibido: 30/06/2019
Artículo aceptado: 12/03/2020
En línea: 30/05/2020

PALABRAS CLAVE:

Crecimiento,
cultivo,
microalgas,
rendimiento.

BRIEF ARTICLE

ARTICLE INFORMATION

Article received: 30/06/2019
Article accepted: 12/03/2020
On line: 30/05/2020

KEYWORDS:

Growth,
cultivation,
microalgae,
yield.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la concentración celular y la biomasa seca en tres especies de microalgas marinas: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*. Las cepas se suministraron por el Laboratorio Costero de Ilo perteneciente al Instituto del Mar del Perú (IMARPE) y luego, se acondicionaron las microalgas para ser cultivadas en medio semicontrolado. Las fases del cultivo de microalgas consistieron en el cepario, inicial, intermedia y masiva. El orden de máxima concentración celular (cel/mL) para las microalgas fue: *Nannochloropsis oculata* > *Chlorella vulgaris* > *Tetraselmis striata* donde *N. oculata* representó 7,63 veces superior a *T. striata*. En el caso de la biomasa, el orden correspondió a: *C. vulgaris* > *T. striata* > *N. oculata* existiendo 1,32 g de diferencia. Se concluyó que, la especie de microalga *Chlorella vulgaris* indicó la mayor ventaja para usarse en la acuicultura comparativamente con las otras dos especies.

ABSTRACT

The aim of study was to determine cell concentration and dry biomass in three species of marine microalgae: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis striata*. The strains were supplied by the Ilo Coastal Laboratory belonging to the Peruvian Institute of the Sea (IMARPE) and then, the microalgae were conditioned to be cultivated in a semi-controlled medium. The phases of the microalgae culture consisted of the cepario, initial, intermediate and massive. The order of maximum cellular concentration (cel/mL) for the microalgae was *Nannochloropsis oculata* > *Chlorella vulgaris* > *Tetraselmis striata* where *N. oculata* represented 7.63 times higher than *T. striata*. In the case of biomass, the order corresponded to: *C. vulgaris* > *T. striata* > *N. oculata*, with a 1.32 g difference. It was concluded that the microalgae species *Chlorella vulgaris* indicated the greatest advantage to be used in aquaculture compared to the other two species.

INTRODUCCIÓN

La biomasa de las microalgas puede ser transformadas a biocombustible mediante procesos bioquímicos o termoquímica (Kumar *et al.*, 2018) siendo este último más rápido y por lo general, se utiliza para mejorar la propia biomasa (Gollakotaa *et al.*, 2018).

La tercera generación de biocombustibles proviene de microalgas (Wahidin *et al.*, 2018) donde la búsqueda de biomasa como fuente de energía constituye una alternativa tecnológica como alimento (Escrivani *et al.*, 2018), en la reducción del CO₂ (Velázquez *et al.*, 2018), mejora de la calidad del aire (Chisti, 2007), eliminación de nutrientes en efluentes (Emparan *et al.*, 2019), como producto nutricional y cosmético para la salud humana (Wang *et al.*, 2013; Kent *et al.*, 2015; Anthony *et al.*, 2018).

En el mismo sentido, los productos farmacéuticos (Priyadarshani & Rath, 2012; Saravana *et al.*, 2018), biofertilizantes (Saadaoui *et al.*, 2018), antimicrobianos agentes (Kasanah *et al.*, 2018; Ying *et al.*, 2018) son agentes antivirales y anticancerígenos (de Vera *et al.*, 2018; Pinheiro *et al.*, 2018; Usoltseva *et al.*, 2018).

Dado la capacidad de las microalgas de acumular gran cantidad de lípidos, proteínas y carbohidratos (Aratboni *et al.*, 2019) de la misma manera es utilizada como alimentación animal en la acuicultura (Gong *et al.*, 2018; Rizwan *et al.*, 2018).

El objetivo del estudio fue determinar la concentración celular y la biomasa seca en tres especies de microalgas marinas: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de las microalgas *C. vulgaris* y *T. striata* *N. oculata* fueron suministradas por el Laboratorio Costero de Ilo perteneciente al Instituto del Mar del Perú (IMARPE). En el Laboratorio de Microalgas

de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera perteneciente a la Universidad Nacional de Moquegua (UNAM), las microalgas se acondicionaron durante cinco días con temperatura de refrigeración (4°C) durante el día y en la noche, se iluminó con tubos fluorescentes de 36 Watts, manteniéndose a 19±1°C.

El cultivo de las microalgas marinas fue en medio semicontrolado por la inoculación a una concentración de 1 ml de inóculo por cada litro de cultivo depositadas en matraces (250 ml, 500 ml, 1000 ml), botellas de cristal oscuro (7 L y 20 L) y fotobiorreactores (verticales cerrados de 160 L de capacidad, en condiciones promedio de cultivo: pH (9,22 ± 0,53), oxígeno (8,65±0,53), salinidad (33±0,15 ppm) temperatura (19±1 °C), conductividad (50,65±50,66 mS/cm), e intensidad luminosa de (3750±5250 lux) utilizando agua de mar estéril (usando un sistema de bomba de vacío con filtros de nitrocelulosa de 1 µm, 0,20 µm, y 0,45 µm y posteriormente sometida en autoclave marca: BOECO Germany, a 120 °C durante 30 minutos) que fue enriquecida con el medio F/2 modificado Guillard (1975) (Tabla 1). Se suministró aire (impulsado por 06 blower marca RESUM, Modelo ACO – 003, con una potencia de 35 Watts).

La temperatura se mantuvo a 19±0.50 °C, pH (8.30±1) y luz artificial constante en la fase inicial e intermedia (3000 lux), fase masiva (3500 ± 500 lux) siendo medida mediante el luxómetro modelo 3251, serie 170020752.

Tabla 1.
Preparación del medio F/2 Guillard modificado para microalgas marinas.

Reactivos químicos		g/L
Macronutrientes	KNO ₃	75,00
	NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	5,65
	EDTA Na ₂	4,360
	FeCl ₃ , 6H ₂ O	3,150
Micronutrientes	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,010
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,022
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,010
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,180
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,006
		Cyanocobalamina
Vitaminas	Tiamina HCl	0,100
	Biotina	0,001

Las fases del cultivo de microalgas consistieron en: cepario, inicial, intermedia y masiva. Cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial se extrajeron alícuotas de 1 mL de cada tubo de ensayo donde se adicionó 1 gota de lugol para fijar la muestra que fueron observadas en un microscopio compuesto: marca MICROS AUSTRIA con objetivo 10x para su cuantificación y determinación de la concentración celular (crecimiento). La densidad celular fue determinada por el conteo de microalgas utilizando una cámara de Neubauer (Marca, HBG/SUPERIOR) en el microscopio compuesto mediante seis réplicas de 1 mL. La metodología se desarrolló siguiendo los protocolos de IMARPE (2008) y Liza (2015).

Se utilizó el programa estadístico profesional Statgraphics Centurion 18 para el análisis de los datos. La normalidad se realizó mediante la prueba K-S. Para la comparación de la media sobre la concentración celular y la biomasa se aplicó el análisis de varianza considerándose la prueba de Tukey HSD en la homogeneidad entre los grupos. Los resultados fueron significativos cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

La tabla 2 muestra el día y el máximo de concentración celular que se alcanzó por las microalgas donde hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas: $F = 568033,00$; $P = 0,000$.

Tabla 2.
Día y máxima concentración celular (cel/mL) / microalgas.

Días	<i>Nannochloropsis oculata</i> (a)	<i>Chlorella vulgaris</i> (b)	<i>Tetraselmis striata</i> (c)
3	-	$1,78 \times 10^6$	-
4	$9,22 \times 10^7$	-	$1,59 \times 10^6$

Letras: significan homogeneidad de grupos, prueba Tukey HSD.

La tabla 3 muestra el promedio de biomasa seca por las microalgas donde hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas: $F = 880576,00$; $P = 0,000$.

Tabla 3.
Biomasa seca / microalgas (g).

Microalga	Biomasa seca
<i>Chlorella vulgaris</i> (a)	$48,75 \pm 0,16$
<i>Tetraselmis striata</i> (b)	$44,11 \pm 0,53$
<i>Nannochloropsis oculata</i> (c)	$37,95 \pm 0,32$

Letras: significan homogeneidad de grupos, prueba Tukey HSD.

DISCUSIÓN

El orden de máxima concentración celular (cel/mL) para las microalgas fue el siguiente: *Nannochloropsis oculata* > *Chlorella vulgaris* > *Tetraselmis striata* donde *N. oculata* representó 7,63 veces superior a *T. striata*. En el caso de la biomasa, el orden correspondió a *C. vulgaris* > *T. striata* > *N. oculata* existiendo 1,32 g de diferencia.

Según los resultados, la especie de microalga *Chlorella vulgaris* indica la mayor ventaja para usarse en la acuicultura comparativamente con las otras dos especies. Shafiei *et al.*, (2020) señalaron en su estudio sobre molienda combinada de cuentas e hidrólisis enzimática para el fraccionamiento eficiente de lípidos, proteínas y carbohidratos de las microalgas *Chlorella vulgaris* que se obtiene un mejor rendimiento donde el producto finalizado es rico en fosfolípidos siendo un potencial como alimento. Esta información se indicó, igualmente por 't Lam *et al.*, (2018) para la *Chlorella vulgaris* como producto rico en proteínas y lípidos.

Sin embargo, se refiere que las microalgas a pesar de ser una prometedora base biológica como materia prima su producción a escala de industria se encuentre muy distante, pues se requiere mejorarse la viabilidad económica de los procesos involucrados en los productos que se contienen. Es decir, debe lograrse que exista una perfección en aquellos procesos y/o métodos involucrados sobre cómo atravesar la barrera de la pared celular y la membrana celular (Safi *et al.*, 2015; Günerken *et al.*, 2015).

Postma *et al.*, (2017) en este trabajo titulado desintegración leve de la *Chlorella Vulgaris* de microalgas verdes usando molienda de granos

se liberó, productos intracelulares con éxito a diferentes concentraciones de biomasa: 25-145 g.kg-1 en un rango de velocidades del agitador (6-12 ms-1). En todos los casos, se logró más del 97% de la desintegración celular, lo que resultó en la liberación de proteínas solubles en agua. Se observó una tasa óptima de desintegración y la liberación de proteínas a una velocidad de agitación de 9-10 m.s-1 independientemente de la concentración de biomasa. Se observó extracción selectiva de proteínas solubles en agua a medida se liberaron las proteínas antes que ocurriera la desintegración celular.

Finalmente, a pesar de estudiarse de manera amplia *C. vulgaris* en agua dulce, aún faltan evaluaciones rigurosas en el agua de mar, pues los estudios en el agua de mar son esenciales para la producción futura a gran escala como biocombustibles (Luangpipat & Chisti, 2017).

La principal limitación del estudio fue, el análisis del valor proteico y su aplicación en modelos biológicos de experimentación como los peces para indicarse la influencia en el crecimiento.

CONCLUSIONES

Aunque transcurrió 24 horas, al cuarto día, la microalga *Nannochloropsis oculata* fue la especie de mayor concentración celular, pero de más baja biomasa comparativamente con las especies *Chlorella vulgaris* y *Tetraselmis striata*.

Según los resultados, la microalga *Chlorella vulgaris* parece indicarse como la especie a considerarse para el suministro alimentario en la acuicultura.

Agradecimiento

Nuestro sincero agradecimiento al Mg. Ygor Sanz Ludeña y Vicente Casteñeda Muñoz del Laboratorio Costero de Ilo del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), al pleno de la Comisión Organizadora, al personal de la Dirección de Gestión de Investigación

de la Universidad Nacional de Moquegua, quienes con su perseverante espíritu de apoyo y paciencia han permitido la concreción del presente manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anthony, J., Sivashankarasubbiah, K.T., Thonthula, S., Rangamaran, V.R., Gopal, G. & Ramalingam, K. (2018). An efficient method for the sequential production of lipid and carotenoids from the *Chlorella* growth Factor-extracted biomass of *Chlorella vulgaris*. *J Appl Phycol*; 30, 2325-2335. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1430-5>
- Aratboni, H.A., Rafiei, N., Garcia, G.R., Alemzadeh, A. & Morones, R.J.R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microb Cell Factories*; 18(1), 178-19. Doi: /10.1186/s12934-019-1228-4
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*; 25(3), 294-306. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- de Vera, C.R., Crespín, G.D., Daranas, A.H., Looga, S.M., Lillsunde, K.E., Tammela, P., Perälä, M., Hongisto, V., Virtanen, J., Rischer, H., Muller, C.D., Norte, M., Fernández, J.J. & Souto, M.L. (2018). Marine microalgae: promising source for new bioactive compounds. *Mar Drugs*; 16, 1-12. Doi: <https://doi.org/10.3390/md16090317>
- Emparan, Q., Harun, R. & Danquah, M.K. (2019). Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: a review. *Appl Ecol Environ Res*; 17, 889-915. Doi: https://doi.org/10.15666/año/1701_889915
- Escrivani, G.R., Luna, A.S. & Rodrigues, T.A. (2018). Operating parameters for bio-oil production in biomass pyrolysis: A Review. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*; 129, 134-149. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2017.11.019>
- Gollakotaa, A.R.K., Kishore, N. & Sai, G. (2018). A review on hydrothermal liquefaction of biomass. *Renew Sustain Energy Rev*; 81, 1378-1392. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.178>

- Gong, Y., Guterres, H.A.D.S., Huntley, M., Sørensen, M. & Kiron, V. (2018). Digestibility of the defatted microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Desmodesmus* sp. When fed to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquac Nutr*; 24, 56-64. Doi: <https://doi.org/10.1111/anu.12533>
- Günerken, E., d'Hondt, E., Eppink, M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K. & Wijffels, R. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol Adv*; 33(2), 243-260. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Instituto del Mar del Perú: IMARPE. (2008). Condicionamiento de reproductores y obtención de semillas de concha de abanico *Argopectenpurpuratus* (Lamarck, 1819), Informe anual. Ilo, Moquegua.
- Kasanah, N., Amelia, W., Mukminin, A. & Triyanto, I.A. (2018). Antibacterial activity of Indonesian red algae *Gracilaria edulis* against bacterial fish pathogens and characterization of active fractions. *Nat Prod Res*; 6419, 1-5. Doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1471079>
- Kent, M., Welladsen, H.M., Mangott, A. & Li, Y. (2015). Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PLoS One*; 10, 1-14. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118985>
- Kumar, P.K., Krishna, S.V., Verma, K., Pooja, K., Bhagawan, D., Srilatha, K. & Himabindu, V. (2018). Bio oil production from microalgae via hydrothermal liquefaction technology under subcritical water conditions. *J. Microbiol. Methods*; 153, 108-117. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.014>
- Luangpipat, T. & Chisti, Y. (2017). Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae—Effects of salinity and other factors. *Journal of Biotechnology*; 257, 47-57. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.029>
- Pinheiro, S., Roberta, L., Gonzaga, N., Neto, R., Farias, A., Luis, A., Holanda, B., Lopes, D., Sousa, M., Guadalupe, P., Alexandra, E. & Holanda, C. Shiniti, (2018). Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützing) P. W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. *Int J Biol Macromol*; 107, 1320-1329. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.116>
- Postma, P., Miron, T., Olivieri, G., Barbosa, M., Wijffels, R. & Eppink, M. (2015). Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresour Technol*; 184, 297-304. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>
- Priyadarshani, I. & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—a review, *J. Algal Biomass Util*; 3, 89-100.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S.A., Lee, K. & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev*; 92, 394-404. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Saadaoui, I., Sedky, R., Rasheed, R., Bounnit, T., Almahmoud, A., Elshekh, A., Dalgamouni, T., Jmal, A.L., Das, K. & P. Al Jabri, H. (2018). Assessment of the algae-based biofertilizer influence on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivation. *J Appl Phycol*; 2, 1-7, Doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1539-6>
- Safi, C., Frances, C., Ursu, A.V., Laroche, C., Pouzet, C., Vaca, G.C. & Pontalier, P.Y. (2015). Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Res*; 8, 61-68. Doi: <https://doi.org/10.1016/2Fj.algal.2015.01.002>
- Sal, L. & Rosa, M.R. (2015). Efecto de dietas con tres microalgas bentónicas en el crecimiento y supervivencia post larval del *Loxechinus albus*, Erizo Verde. Tesis de Diploma. Universidad Nacional de Moquegua., Moquegua, Perú. <http://repositorio.unam.edu.pe/handle/UNAM/39>
- Saravana, M., Mohan, G., Ramakrishnan, T., Mani, V. & Achary, A. (2018). Protective effect of crude sulphated polysaccharide from

- Turbinaria ornata on isoniazid rifampicin induced hepatotoxicity and oxidative stress in the liver, kidney and brain of adult Swiss albino rats. *Indian J Biochem Biophys*; 55, 237–244.
- Shafiei, A.R., Karimi, K., Wijffels, R.H., van den Berg, C. & Eppink, M. (2020). Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource Technology*; 309, 1-34. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123321>
- 't Lam, G., Vermuë, M., Eppink, M., Wijffels, R. & Van Den Berg, C. (2018). Multi-product microalgae biorefineries: from concept towards reality. *Trends Biotechnol*; 36(2), 216-227. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.011>
- Usoltseva, R.V., Anastyuk, S.D., Ishina, I.A., Isakov, V.V., Zvyagintseva, T.N., Duc, P., Zadorozhny, P.A., Dmitrenok, P.S. & Ermakova, S.P. (2018). Structural characteristics and anticancer activity in vitro of fucoidan from brown alga *Padina boryana*. *Carbohydr Polym*; 184, 260-268. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.071>
- Velazquez, L.J., Rodríguez, J.R.M., Colla, L.M., Saenz, G.A., Cervantes, C.E., Aguilar, C.N. & Ruiz, H.A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol Production: a review. *Biofuel Res J*; 17, 780–791. Doi: <https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.1.5>
- Wahidin, S., Idris, A., Yusof, NM, Kamis, NHH & Shaleh, SRM (2018). Optimization of the ionic liquid-microwave assisted one-step biodiesel production process from wet microalgal biomass. *Energy Conversion and Management*; 171, 1397-1404. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.06.083>
- Wang, J., Jin, W., Hou, Y., Niu, X., Zhang, H. & Zhang, Q. (2013). Chemical composition and moisture-absorption/retention ability of polysaccharides extracted from five algae. *Int J Biol Macromol*; 57, 26-29. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.001>
- Ying, S.Y., Jing, Z.W., Hou, H., Wang, Lin, G.G., Xia, S.Z. & Fang, P.Y. (2018). Antialgal compounds with antialgal activity against the common red tide microalgae from a green algae *Ulva pertusa*. *Ecotoxicol Environ Saf*; 157, 61-66. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.051>