

EFFECTO DE DIFERENTES FERTILIZANTES COMERCIALES EN EL CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE NITRÓGENO DE DOS ESPECIES DE MICROALGAS

Sanchez Aura¹

Resumen: Las microalgas son organismos considerados como alternativa biotecnológica para la captura de CO₂, producción de alimentos, medicamentos, cosméticos y principalmente en la obtención de biocombustibles. Para viabilizar su producción a gran escala se hace necesario establecer condiciones de cultivo favorables, especialmente en lo asociado a requerimientos nutricionales, que permitan una reducción de costos en el cultivo sin disminuir la productividad celular. En la búsqueda de medios alternativos se destaca el uso de fertilizantes comerciales, los cuales son económicos y pueden suplir los requerimientos nutricionales de las microalgas. Por lo anterior, en el presente trabajo se comparó el uso de cuatro fertilizantes comerciales como alternativa al medio Basal Bristol Modificado (BBM), para el cultivo de las cepas *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 y *Scenedesmus obliquus* ATCC 457 a escala laboratorio.

Palabras claves: Microalgas, Fertilizantes comerciales, Nitrógeno, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella sorokiniana*.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos, autótrofos, de menor complejidad estructural y tamaño que las plantas terrestres (Graham & Wilcox, 2000). Al tratarse de un grupo ampliamente diverso: entre 200000 y 800000 especies diferentes (Gagnard et al., 2019), se encuentra también una alta variedad de diferentes metabolitos de interés, así como una gama de compuestos con posible utilidad en la industria dependiendo de la especie (Ishaq et al., 2016). Adicionalmente, estos microorganismos representan una oportunidad para contribuir en la solución de diferentes problemas actuales, como la contaminación por gases de efecto invernadero (especialmente el CO₂), contaminación de aguas, alta demanda de compuestos con utilidad en las diferentes industrias y la producción de combustibles alternativos. Estos organismos presentan la gran ventaja de un ciclo de crecimiento corto en comparación con las plantas terrestres, mayor producción de biomasa, alto índice de recolección y una tasa mayor de fijación de carbono (Shahid et al., 2020).

Con el propósito de obtener un buen crecimiento celular es indispensable el suministro de nutrientes en cantidades

adecuadas. Los medios nutritivos están compuestos básicamente de macronutrientes (nutrimentos esenciales para la formación estructural de las moléculas como nitrógeno, carbono, oxígeno, fósforo, hidrógeno, magnesio, calcio, potasio y azufre), elementos traza (micronutrientes que son adquiridos por las células en cantidades mínimas, necesarios para la activación de algunas enzimas como hierro, manganeso, cobre, cobalto y molibdeno) y vitaminas (biotina, B12 y tiamina), preparados como soluciones patrones o stock y cuyas concentraciones varían principalmente del objetivo de estudio y la especie de microalga (Silva-Benavides, 2016).

Con el propósito de obtener productos de alto valor agregado como lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos que pueden ser utilizados desde el punto de vista de la comercialización, es necesario producir biomasa a gran escala (Liu and Hu, 2013). Este escalamiento a volúmenes mayores, implica una alta demanda de reactivos de óptimo grado analítico y un consumo considerable de hombre-tiempo que conlleva la preparación de los medios nutritivos, los cuales son costosos si se tienen que adquirir en grandes cantidades, lo que eleva los costos de producción de los cultivos de las microalgas (Silva-Benavides, 2016).

La preparación de los medios de cultivo a gran escala representa un 30-40% de los costos de operación, según Jad-Allah and Nabris, (2012), entre 10-30% según Borowitzka, Huisman and Osborn, (1991). Por consiguiente, una alternativa es usar medios de enriquecimiento como los fertilizantes agrícolas; especialmente cuando se trabaja con volúmenes grandes de biomasa en ambientes externos, pues son económicos y contienen incorporados en su preparación macronutrientes, micronutrientes y vitaminas indispensables para el crecimiento de las microalgas (Silva-Benavides, 2016).

Los fertilizantes NPK, son una mezcla compleja diseñados para suministrar tres nutrientes primarios (es decir, N, P y K) adecuados para el crecimiento de la planta. Estudios han demostrado la eficiencia de fertilizantes foliares como medios nutritivos en cultivos microalgales, cuyos resultados, en términos de productividad de la biomasa, son mayores o equivalentes con respecto a los medios nutritivos preparados a partir de

reactivos químicos convencionales como el BG11 y F/2 (Jad-Allah and Nabris, 2012).

Dentro de las posibles alternativas para una mencionada reducción de costo se encuentra el uso de fertilizantes comerciales, los cuales han sido evaluados en estudios previos, con resultados similares e incluso mejores tanto en las tasas de crecimiento, como en la producción de metabolitos de interés al usarse fertilizantes comerciales, arrojando resultados que validaban un costo hasta ocho veces menor al del medio de cultivo comparado (Castro et al., 2013), (Castro et al., 2013; Brito et al., 2006; Piña et al., 2007; Gonzalez-Rodriguez & Maestrini, 1984), Por todo lo anterior, en el presente estudio se propuso evaluar el efecto de diferentes fertilizantes comerciales de bajo costo, en el crecimiento y porcentaje de nitrógeno de dos especies de microalgas *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 y *Scenedesmus obliquus* ATCC 457.

II. METODOLOGÍA

A. Recurso biológico

Las cepas *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 (1230) y *Scenedesmus obliquus* ATCC 11457 (457) fueron importadas de la colección de cultivo de algas de Austin Texas (UTEX) y de la American Type Culture Collection (ATCC) respectivamente y son pertenecientes al cepario del laboratorio de biotecnología del centro de Argos para la innovación (CAPI) ubicado en la universidad EAFIT sede Medellín.

B. Montaje y seguimiento de ensayos

El desarrollo experimental fue llevado a cabo a escala laboratorio, usando Erlenmeyer de 2 L para cada una de las unidades experimentales, con condiciones de fotoperiodo 12:12, burbujeo de aire enriquecido con CO₂, intensidad lumínica de 52 μmol/m²s y temperatura ambiente (25 ± 5 °C).

Las muestras tomadas para cada uno de los ensayos durante su crecimiento fueron medidas por peso seco, usando filtros estériles de éster de celulosa (Advantec MFS, Inc) con un poro de 0,45 μm, diámetro de 47mm y balanzas de humedad Sartorius Mark-3, con el fin de obtener una curva de crecimiento para cada uno de los tratamientos en gramos de biomasa por litro. Se aplicó la ecuación 1 para obtener el resultado final de cada muestra El seguimiento del crecimiento celular de cada una de las cepas se realizó tres veces a la semana durante 14 días. Al finalizar se centrifugo la biomasa para proceder a lavarla con agua destilada y secarla, para ser llevada posteriormente a los análisis de contenido de nitrógeno

$$X \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(Pf - Pi)g}{V(L)}$$

(Ecuación 1)

Pf: Peso del filtro + Biomasa filtrada

Pi= Masa del filtro (g)

V= Volumen del filtrado

El contenido de nitrógeno se evaluó usando el método de Dumas, en el cual por un proceso de combustión se convierte el nitrógeno unido covalentemente a nitrógeno gaseoso (N₂) el cual es posteriormente cuantificado al pasar por una celda de conductividad (Etheridge *et al.*, 1998).

C. Diseño experimental

Para el desarrollo del trabajo se planteó un diseño experimental Factorial 4 x 2 para cada una de las cepas por separado, donde el Factor 1 corresponde a los Fertilizantes comerciales con 4 niveles (cada uno de los fertilizantes) y el Factor 2 el volumen de fertilizante agregado con 2 niveles (A: concentración equiparable con el BBM; B: concentración recomendada por el fabricante). Cada tratamiento conto con 3 réplicas para un total de 24 unidades experimentales por cepa. La nomenclatura del diseño experimental se evidencia en la tabla 1. Es de resaltar que los 4 fertilizantes seleccionados están compuestos en su mayoría por nitrógeno fosforo y potasio, son solubles en agua y no generan cambios en la coloración o presencia de residuos

Tabla 1. Diseño experimental para las cepas 457 y 1230.

Tratamiento	Fertilizante	Volumen por litro de agua (mL)	Nomenclatura del tratamiento
		2	1A
1	Crecilizer	20	1B
		4	2A
2	Florilizer	20	2B
		6	3A
3	Fert-Plant	10	3B
		4	4A
4	Violetas	10	4B

D. Análisis estadístico

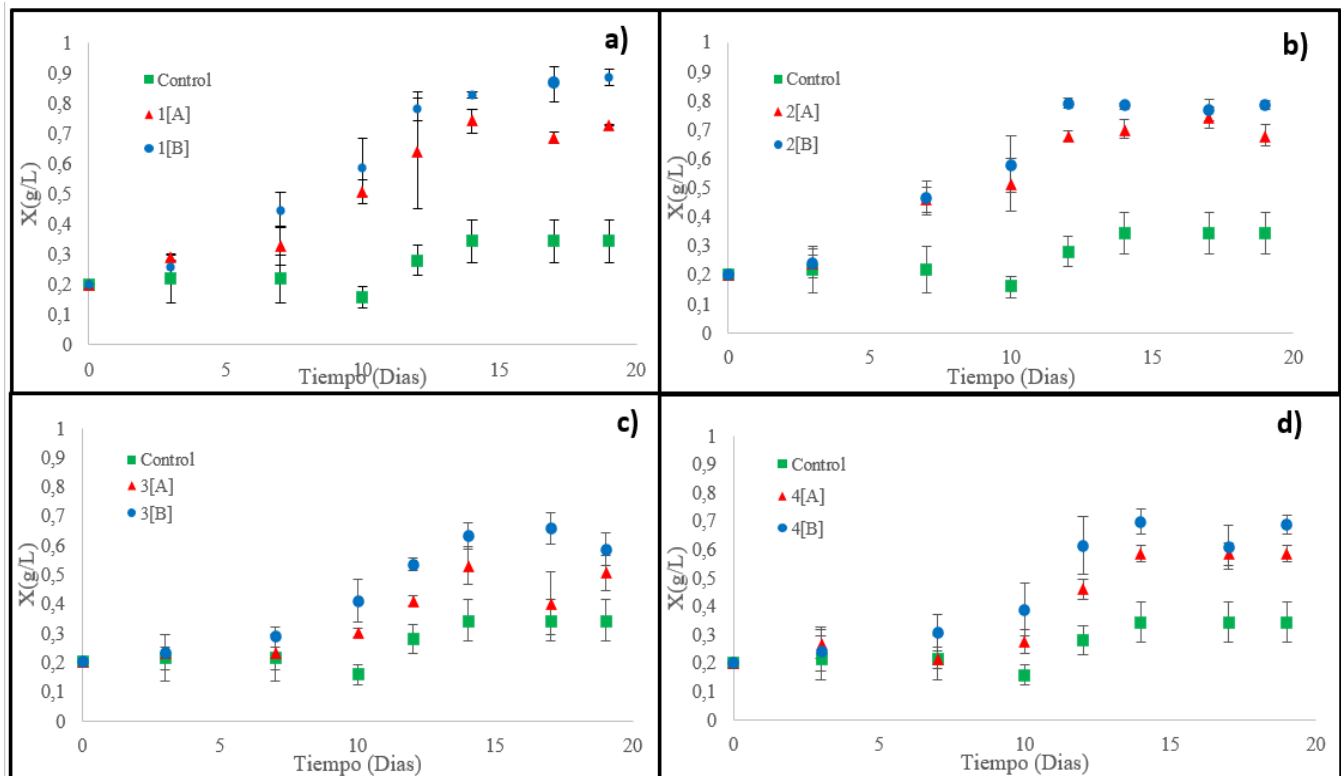
Para establecer el efecto de diferentes fertilizantes comerciales sobre el crecimiento celular, el contenido de nitrógeno en la biomasa final, para las cepas 1230 y 457 se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con el 95 % de confiabilidad. Se comprobaron los

supuestos del ANOVA mediante test cuantitativos de: Shapiro - Wilk, Kolmogorov, Levene y Durbin – Watson. El test de rangos múltiples LSD se empleó para establecer que tratamientos presentaron efecto sobre las variables de respuestas. Las letras iguales, corresponden grupos estadísticamente homogéneos según el test de rangos múltiples LSD, con un nivel de confianza del 95 %. Las barras de error presentadas en las gráficas corresponden al error estadístico entre las réplicas de cada uno de los tratamientos (Miranda et al., 2019). Para el desarrollo del análisis estadístico se utilizó el Software STATGRAPHICS Centurión versión XVI.

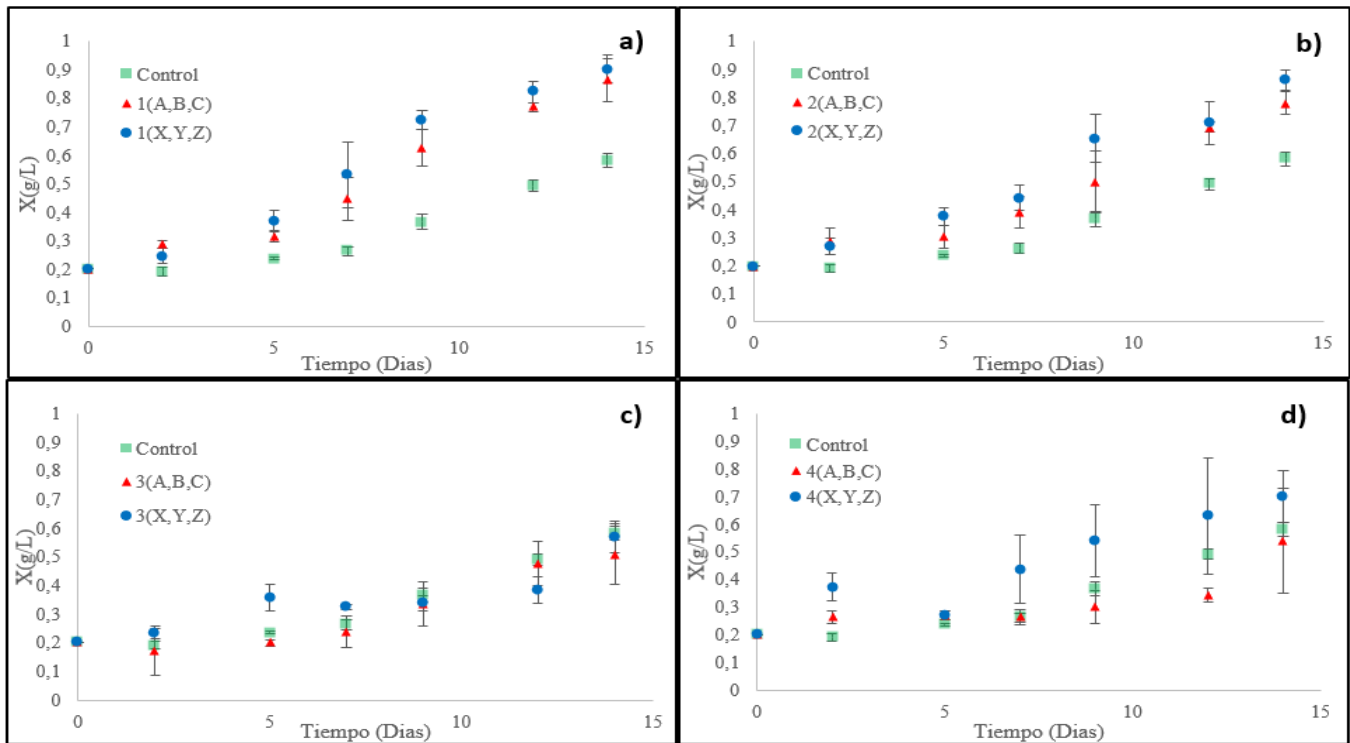
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El crecimiento de las dos cepas en los diferentes tratamientos del diseño de experimentos a escala laboratorio se observan en las gráficas 1_a y 1_b, de la cepa 1230 y 457 respectivamente. Se puede evidenciar que los diferentes fertilizantes empleados pueden ser utilizados como medio de cultivo para el crecimiento celular en

ambas cepas. El patrón de crecimiento de los diferentes tratamientos presenta una fase de adaptación entre los primeros tres días, seguido de una fase exponencial la cual estuvo comprendida entre los días siete y catorce, finalizando con una fase estacionaria. Los tratamientos que presentaron mayor concentración celular de 0,82 y 0,78 g/L fueron el tratamiento 1 y 2 en la concentración B para la cepa 1230 y concentración celular de 0,86 y 0,90 g/L para la cepa 457, correspondiendo estos últimos a el tratamiento 1 en la concentración A y B respectivamente. La mayor concentración celular de los diferentes tratamientos se alcanzó el día 14 de cultivo, con estos valores se realizaron las comparaciones entre tratamientos.



Gráfica 1a: Curvas de crecimiento de la cepa 1230 para cada uno de los tratamientos (a: fertilizante 1; b: Fertilizante 2; c: Fertilizante 3; d: Fertilizante 4).



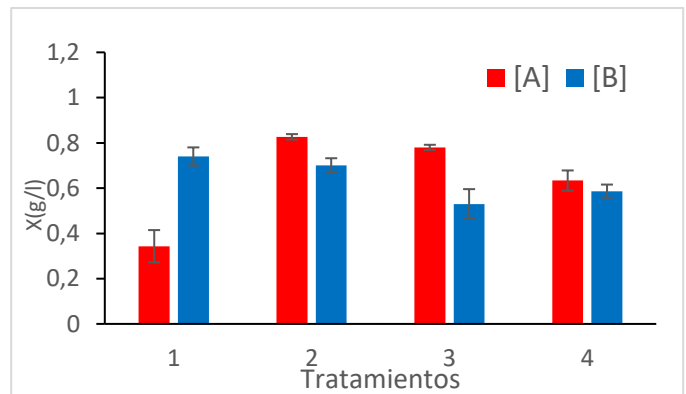
Grafica 1b: Curvas de crecimiento de la cepa 457 para cada uno de los tratamientos (a: fertilizante 1; b: Fertilizante 2; c: Fertilizante 3; d: Fertilizante 4).

A. Resultados para la cepa 1230

En la gráfica 3, se evidencia la concentración celular final para los tratamientos con la cepa 1230. Los resultados del ANOVA arrojaron que existía una diferencia significativa entre cada uno de los fertilizantes ($P < 0,05$) con un nivel de confianza del 95%, pero no existe dicha diferencia entre las dos concentraciones de los fertilizantes.

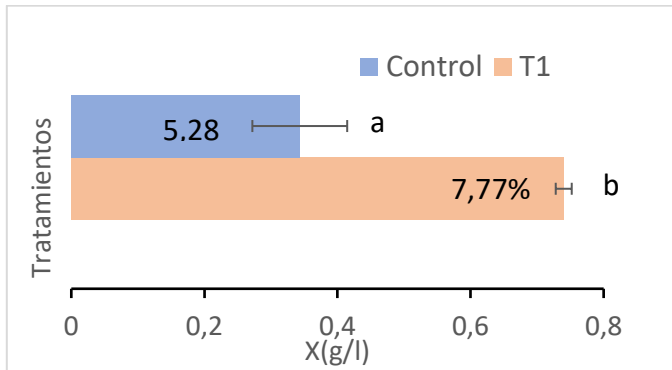
Se obtuvo que el tratamiento 1 (fertilizante Crecilizer) fue el que presentó un efecto positivo en la variable de respuesta concentración celular final, por lo cual este tratamiento fue seleccionado para compararse con los resultados obtenidos con el control (BBM).

Al no presentar diferencias significativas entre el volumen de fertilizante agregado, se seleccionó la concentración A, debido a que esta involucra un menor gasto del producto y por ende un balance de costos favorable



Grafica 2: Concentración celular final para los diferentes tratamientos de la cepa 1230.

La comparación entre el tratamiento 1A con el medio de cultivo Basal Bristol (BBM) al día 14 de cultivo se evidencia en la gráfica 3. Se puede observar que el fertilizante presentó una mayor concentración celular que el obtenido con el control, siendo esta diferencia validada estadísticamente, con un valor $P < 0,05$ y un nivel de confianza del 95%. Estos resultados pueden ser contrastados con los obtenidos por Silva-Benavides, 2016 en donde se vio también un mejor desempeño para el caso del fertilizante en comparación con el medio de cultivo estándar.



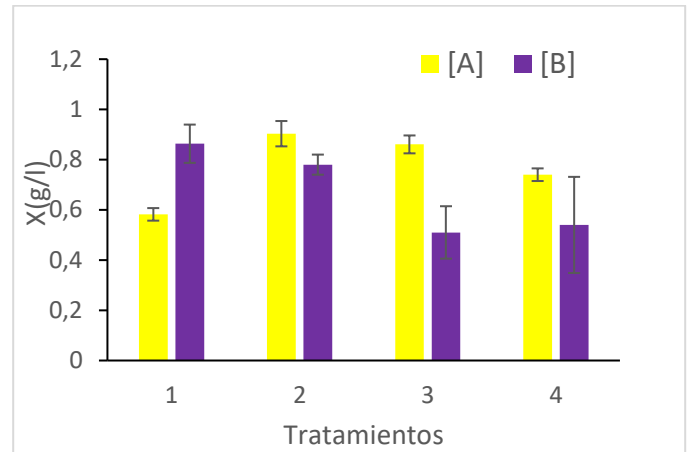
Gráfica 3: Comparación entre el contenido de biomasa final en el tratamiento 1 y el control de la cepa 1230.

B. Resultados para 457

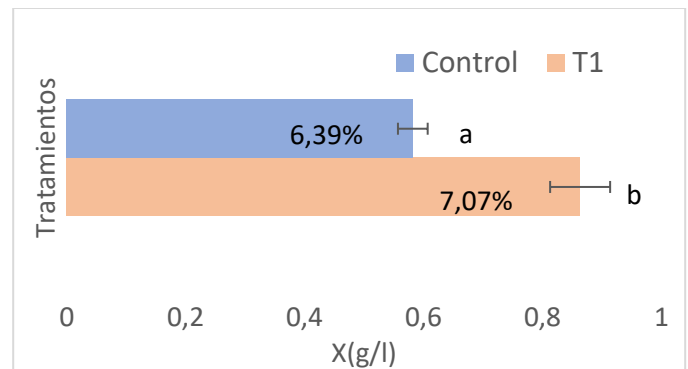
Para la cepa 457 los resultados fueron similares a los obtenidos con 1230 (gráfica 4). Entre cada uno de los tratamientos se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) con un nivel de confianza del 95%, y una mayor concentración celular en el tratamiento 1 (Crecilizer) al día 14 de cultivo, pero no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones evaluadas de los diferentes fertilizantes, por lo que al igual que en el caso anterior, fue seleccionada la concentración que implicase menor cantidad de fertilizante empleado.

En la gráfica 5 se evidencia la comparación entre la concentración celular del día 14 de cultivo para el tratamiento 1A y el control. Estos resultados que a su vez fueron sometidos a análisis estadísticos de los cuales se pudo comprobar que dicha diferencia es significativa ($p < 0,05$ y un nivel de confianza del 95%).

En esta gráfica se pudo observar una mayor cantidad de biomasa, que a su vez podría ser equiparable con el contenido proteico obtenido de esta cepa bajo el tratamiento con fertilizante, esto debido a que ambos valores (proteína-nitrógeno) se encuentran ampliamente ligados, y para el caso de los tratamientos con fertilizante el contenido de nitrógeno para ambas cepas fue mayor



Gráfica 4: Concentración celular final para los diferentes tratamientos de la cepa 457.



Gráfica 5: Comparación entre el contenido de biomasa final en el tratamiento 1 y el control de la cepa 457.

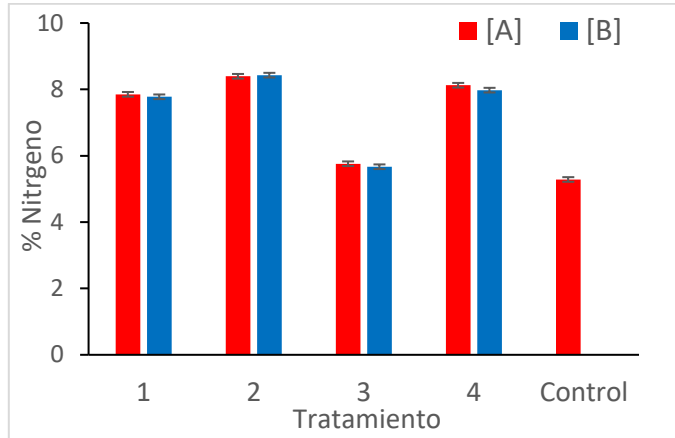
De estas graficas es posible evidenciar que los requerimientos nutricionales de la cepa fueron completamente suplidos por los fertilizantes comerciales, basados en este caso, en los contenidos de nitrógeno y tasas de crecimiento evidenciados por ambas cepas que permiten descartar en este caso algún efecto nocivo o alguna clase de bloqueo en el desarrollo de las cepas por parte de los fertilizantes comerciales.

C. Porcentaje de nitrógeno

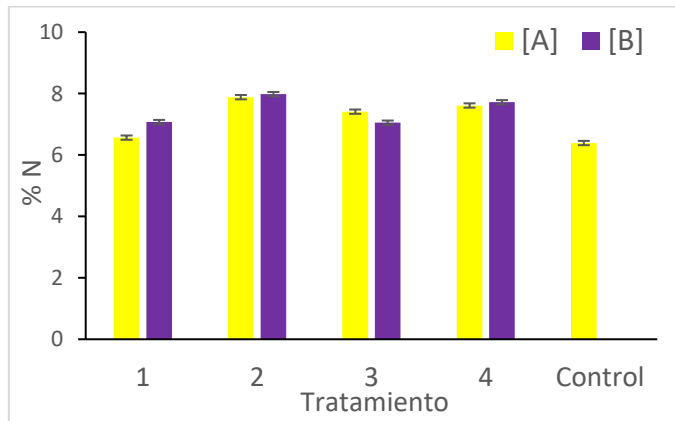
Las cuantificaciones de nitrógeno en la biomasa final se observan en la gráfica 6 y 7. Estos resultados sugieren que las microalgas emplean nitrógeno aportado por los fertilizantes en la síntesis de proteínas y otras biomoléculas. (Peccia et al., 2013)

Los resultados en cuanto al porcentaje de nitrógeno en la biomasa final son similares con los obtenidos en el control de las cepas 1230 y 457. Por lo que se puede evaluar la posibilidad de utilizar esta biomasa, como materia prima para la producción de biocrudo con bajo contenido de nitrógeno. El bajo porcentaje de este heteroátomo en la

biomasa final disminuiría los problemas operativos, la formación de gomas o sedimentos en los combustibles, aumentaría el poder calorífico y la calidad del combustible obtenidos por técnicas como licuefacción hidrotérmica. (Huang et al., 2018) (Obeid et al., 2019), (Tang et al., 2020).



Grafica 6: Comparación en los valores de nitrógeno para los tratamientos y el control.



Grafica 7: comparación en los valores de nitrógeno para los tratamientos y el control.

D. Micrografías de 457 y 1230

Sumado al efecto de cada uno de los fertilizantes empleados en el contenido de biomasa y porcentaje de nitrógeno, se monitoreo tambien los posibles efectos que pudieran tener estos en la morfología de cada una de las cepas, con lo cual se pudo verificar que ninguno de los fertilizantes empleados genero un cambio evidente en cuanto a apariencia de la microalga, color o morfología, las imágenes 1 y 2 a continuación presentan un antes y un despues del desarrollo experimental.

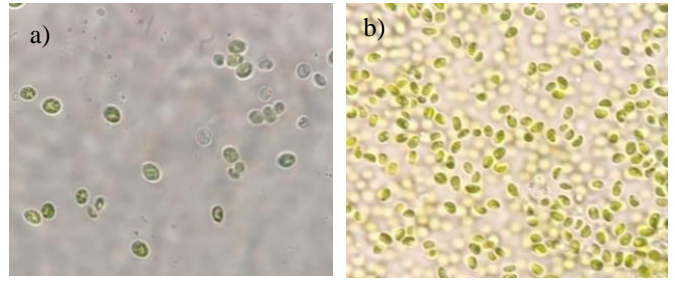


Imagen 1: Micrografías de la cepa 1230 a) Dia 1 de cultivo y b) Dia 14 de cultivo.

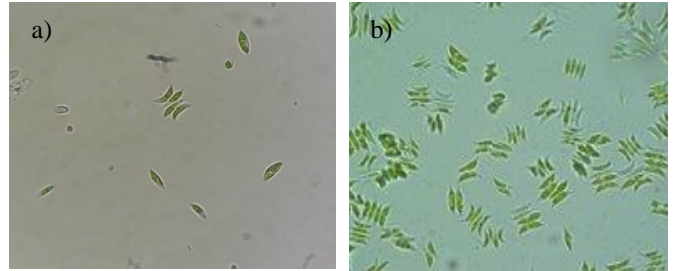


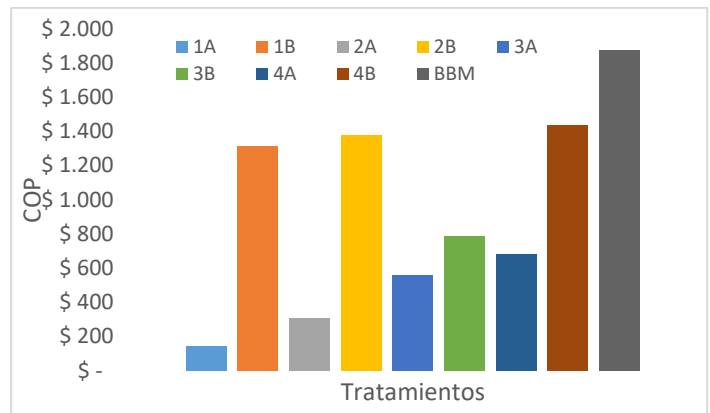
Imagen 2: Micrografías de la cepa 457 a) Dia 1 de cultivo y b) Dia 14 de cultivo.

E. Comparación de costos de los diferentes medios

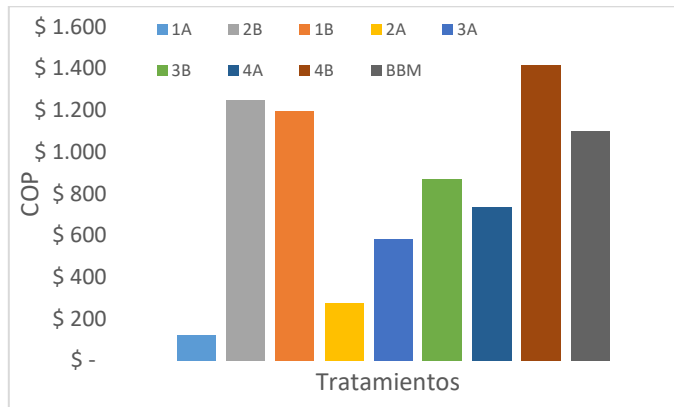
En la gráfica 8 se presenta el costo por g de biomasa de cada tratamiento. Donde se evidencia que el tratamiento 1A (Fertilizante Creclizer con 2 mL/L de agua) el cual arrojó mayor concentración celular final para el día 14, mostró los menores costos de producción para ambas cepas comparados con el control.

Por lo anterior, se recomienda el tratamiento 1ªA, cuyo costo de producción de biomasa por Kg es menor respecto al valor del Kg de biomasa del medio BBM.

Adicionalmente, es posible sugerir que el uso de fertilizantes agrícolas reduce el costo de producción del medio de cultivo hasta en un 92%, sin alterar el crecimiento celular de las cepas.



Grafica 8: Costo por g de biomasa de los diferentes tratamientos con la cepa 1230.



Grafica 8: Costo por g de biomasa de los diferentes tratamientos con la cepa 457.

A partir del análisis de costo y el crecimiento celular se puede afirmar que los fertilizantes pueden ser utilizados para el crecimiento celular de las cepas 457 y 1230 a escalas laboratorio, por lo que se puede proponer evaluar el escalado a Fotobiorreactor.

IV. CONCLUSION

La concentración celular obtenida para el caso de los fertilizantes es en todos los tratamientos equiparable con el medio de cultivo BBM y para el caso del tratamiento uno, se pudo evidenciar un contenido de biomasa incluso mayor, por lo que es posible concluir que, en cuanto a tasas de crecimiento, los fertilizantes podrían ser una opción viable, que deberá ser evaluada posteriormente a mayor escala para corroborar en ese caso su adecuado desempeño.

Las biomásas obtenidas de los diferentes tratamientos con fertilizantes, presentaron resultados del porcentaje de nitrógeno similares a los obtenidos en ensayos con el medio BBM, por lo que se propone la biomasa de las cepas 457 y 1230 cultivadas en fertilizantes como materia prima para la producción de biocrudos con bajo contenido de nitrógeno.

El cultivo de ambas cepas de microalgas usando fertilizantes comerciales parece ser efectivo, no solo para mantener las tasas de crecimiento obtenidas con un medio de cultivo tradicional sino también superándolas como fue el caso del fertilizante Crezilizer ya mencionado, todo esto sumado a la reducción de costos del 92% en comparación con el BBM.

V. REFERENCIAS

- Brito, D., Milani, N., Pereira, G., Gonzales, M., & Morán, R. (2006). Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska. *Ciencia*, 14(4), 397–410.
- Castro, A., Colivet, J., Gómez, E., Mora, R., & Brito, D. (2013). Cinética de crecimiento de un cultivo mixto de las microalgas *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Interciencia*, 38(8), 604–608.
- Etheridge, R. D., Pesti, G. M., & Foster, E. H. (1998). A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology*, 73(1–2), 21–28. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00136-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00136-9)
- Gaignard, C., Laroche, C., Pierre, G., Dubessay, P., Delattre, C., Gardarin, C., Gourvil, P., Probert, I., Dubuffet, A., & Michaud, P. (2019). Screening of marine microalgae: Investigation of new exopolysaccharide producers. *Algal Research*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101711>
- Gonzalez-Rodriguez, E., & Maestrini, S. Y. (1984). The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. *Aquaculture*, 36(3), 245–256. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90240-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90240-0)
- Graham, L. E., & Wilcox, L. W. (2000). *Algae* (T. Ryu, L. Tarabojkia, & K. Dellas (eds.)).
- Huang, Z., Wufuer, A., Wang, Y., & Dai, L. (2018). Hydrothermal liquefaction of pretreated low-lipid microalgae for the production of bio-oil with low heteroatom content. *Process Biochemistry*, 69(October 2017), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.018>
- Ishaq, A. G., Matias-Peralta, H. M., & Basri, H. (2016). Bioactive Compounds from Green Microalga *Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 39(1), 1–16.
- Miranda, A. M., Ossa, E. A., Vargas, G. J., & Sáez, A. A. (2019). Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. *Información Tecnológica*, 30(1), 23–32. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000100023>
- Obeid, F., Chu Van, T., Brown, R., & Rainey, T. (2019). Nitrogen and sulphur in algal biocrude: A review of the HTL process, upgrading, engine performance and emissions. *Energy Conversion and*

- Management*, 181(December 2018), 105–119.
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.11.054>
- Peccia, J., Haznedaroglu, B., Gutierrez, J., & Zimmerman, J. B. (2013). Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 31(3), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.010>
- Piña, P., Medina, A., Nieves, M., Leal, S., López, J. A., & Guerrero, M. A. (2007). Cultivo De Cuatro Especies De Microalgas Con Diferentes Fertilizantes Utilizados En Acuicultura. *Rev. Invest. Mar*, 28(3), 225–236.
<http://www.cim.uh.cu/rim/pdf/2007/3/2007-225.pdf>
- Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Nawaz, M. Z., Nawaz, S., Asraful Alam, M., & Mehmood, M. A. (2020). Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Science of the Total Environment*, 704. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>
- Silva-Benavides, A. M. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Tang, X., Zhang, C., & Yang, X. (2020). Optimizing process of hydrothermal liquefaction of microalgae via flash heating and isolating aqueous extract from bio-crude. *Journal of Cleaner Production*, 258, 120660. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120660>
- Jad-Allah, K. and Nabris, E. (2012) ‘Development of Cheap and Simple Culture Medium for the Microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on Agricultural Grade Fertilizers Available in the Local Market of Gaza Strip (Palestine)’, *Journal of Al Azhar University-Gaza (Natural Sciences)*, 14, pp. 61–76. Available at: http://www.alazhar.edu.ps/journal123/natural_Sciences.asp?typeno=1.
- Liu, J. and Hu, Q. (2013) ‘*Chlorella*: Industrial Production of Cell Mass and Chemicals’, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, pp. 329–338. doi: 10.1002/9781118567166.ch16.
- Borowitzka, M. A., Huisman, J. M. and Osborn, A. (1991) ‘Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type’, *Journal of Applied Phycology*. Kluwer Academic Publishers, 3(4), pp. 295–304. doi: 10.1007/BF02392882.