

Uso de residuos agroindustriales en la formulación de medios de cultivo de *Arthrospira platensis* y *Chlorella sorokiniana* a escala de laboratorio

Juan Diego Tombe-Lagos ^a, Cindy Tatiana Delgado-Montoya ^a, Claudia Sichel ^a, Erika Yuliana Ortiz-Montoya ^a

^aDepartamento de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ingeniería, Universidad Icesi, Calle 18 No. 122–135, Cali 760031, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

Cianobacteria

Microalga

Residuo Agroindustrial

Cultivo

Producción Biomasa

Biorrefinería

ABSTRACT

Múltiples estudios han dado a conocer las bondades de las cianobacterias y microalgas en diversos ámbitos, ya sea en la industria alimenticia o en biotecnología. En este sentido la producción de biomasa de estos microorganismos se ha convertido en una necesidad, y de este modo, se vuelve indispensable el planteamiento de nuevas estrategias de cultivo. Para ello, se emplearon las fracciones líquidas de digestato y vinazas provenientes de la agroindustria colombiana en la formulación de medios de cultivo para la cianobacteria *Arthrospira platensis* y la microalga *Chlorella sorokiniana*, en la Universidad ICESI. Estas, se cultivaron con agitación a 120 y 90 rpm respectivamente, con foto iluminación constante entre 10-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ durante 4 días. Con lo anterior, los medios más promisorios en la generación de biomasa para *A. Platensis* corresponden al digestato DR1 en la dilución 1/6 (0,86 g/L de aporte de carbono orgánico), y los tratamientos del stock de vinaza 1/30 en las diluciones 1/3 (1,76 g/L de aporte de carbono orgánico) y 1/6 (0,88 g/L de aporte de carbono orgánico), presentando una productividad de 0,229 g/L·día, 0,191 g/L·día y 0,177 g/L·día, respectivamente. Así mismo, sobresalió el tratamiento de vinaza en una dilución de 1/30 1/3 (1,77 g/L de aporte de carbono orgánico) en el crecimiento *C. sorokiniana* con una productividad de 0,126 g/L·día. Por otra parte, se demostró que ambos microorganismos pueden hacer uso de la vinaza en un aporte de 6 g/L como única fuente de carbono orgánico en el medio para crecer.

1. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias y microalgas son grupos de microorganismos fotosintéticos reconocidos por su alta capacidad adaptativa, cuyas características morfológicas y fisiológicas les permiten sobrevivir en condiciones extremas o adversas tales como altas temperaturas, radiación solar o en presencia de contaminantes como metales pesados o hidrocarburos. Tanto las cianobacterias como las microalgas tienen una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas de gran relevancia en diferentes sectores industriales, como es el caso de *Arthrospira platensis*, declarada por las Naciones Unidas y la FDA como una de las mejores fuentes de proteína, así como el mejor alimento para el futuro, debido a que contiene antioxidantes, fitonutrientes, probióticos y nutraceuticos [1]. Por otro lado, *Chlorella sorokiniana* ha sido ampliamente investigada por sus aplicaciones biotecnológicas como fuente de energía química, para la producción de biodiésel o biohidrógeno, y también es conocida por su capacidad de producir pigmentos como luteína, β -caroteno y astaxantina, conocidas por sus propiedades antioxidantes y farmacéuticas. Sumado a esto, este microorganismo es fuente rica en proteína, carbohidratos, ácidos grasos esenciales, fibras dietarias y minerales [2].

De manera que, se han desarrollados medios de cultivos con el fin de suplir las necesidades metabólicas de estos microorganismos, por lo que, contienen la presencia de carbono inorgánico, carbonatos o hidrocbonatos, además de fuentes de nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, sodio, calcio, magnesio y oligoelementos como hierro, manganeso, cobalto, cobre, molibdeno, zinc y níquel, que son necesarios para altas velocidades de crecimiento [3]. Algunos de los medios más empleados para el cultivo de cianobacterias son el BG-11, Zarrouk, Z8, Cyanophycean, Schlösser y Gromov no. 6. Y en el caso de las microalgas encontramos el medio Tris Acetato Fosfato (TAP), Bold, Walne y Guillard's F/2.

No obstante, estos se consideran medios definidos debido a los diversos componentes de su formulación, haciéndolos inviables económicamente para cultivos a escalas mayores que las de laboratorio. De este modo, se abre un tema de investigación en la formulación de medios más simples, en cuanto a la cantidad de componentes, como una alternativa que cumpla con todos los requerimientos metabólicos.

Por tal motivo, en la búsqueda de medios de cultivo que contengan nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), diversos países han investigado el potencial del uso de residuos. En el cultivo de *Arthrospira platensis* encontramos el uso de aguas residuales municipales en China como medio de cultivo [4] o la suplementación de este a partir de desechos de papaya en Bangladesh [5]. Del mismo modo, estudios para el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana*, en los que implementan los materiales orgánicos y nutrientes en el medio de cultivo, presentes en las aguas residuales de productos lácteos en Irán [6] o en el digestato de granjas porcícolas en Italia [7]. De manera similar se emplea la vinaza resultante de la destilación de bioetanol, estudiada en el enriquecimiento de medios en Brasil [8]. Todos estos estudios convergen en que el uso de residuos presenta una

alternativa de bajo costo, con el potencial de convertirse en medios adecuados para el crecimiento de estos microorganismos, además de ser una opción ventajosa para la valorización y reducción de su impacto ambiental.

En Colombia, encontramos investigaciones en el crecimiento de microorganismos fotosintéticos como el caso de *Desmodesmus subspicatus* en la Universidad Nacional, en el cual se promueve el crecimiento de la microalga en un medio suplementado con vinaza de caña de azúcar [9] o en el estudio en la Universidad Icesi, en el que se evalúa el potencial del digestato en la suplementación de medio de cultivo para la microalga *Chlorella sorokiniana* [10]. En estos estudios se confirma que el nitrógeno y el hierro en el digestato pueden complementar los cultivos heterótrofos. A pesar de esto, los registros de investigación local en estrategias de cultivo de cianobacterias y microalgas son escasos, dejando un vacío importante teniendo en cuenta las bondades de estos microorganismos, y el uso de residuos como una alternativa potencial de medio de cultivo con la característica de ser industrializables en comparación a los medios tradicionales.

De este modo, con el propósito de implementar una estrategia de cultivo a escala de laboratorio que genere un antecedente y proporcione datos del uso de vinaza y digestato en la formulación de medios, y con el fin de proponer un medio de cultivo alternativo a los tradicionales, se llevaron a cabo una serie de fermentaciones mixotróficas haciendo uso de fracciones volumétricas de estos residuos con foto-iluminación durante 4 días. En donde se medirá la concentración celular (mg /mL), la productividad (g /L·día) y de esta forma evaluar el crecimiento de los microorganismos *Arthrospira platensis* y *Chlorella sorokiniana*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de cepas

La cianobacteria *Arthrospira platensis* (UTEX LB 1928) y la microalga *Chlorella sorokiniana* (UTEX 1602) empleadas en este estudio fueron obtenidas de la colección de la Universidad de Texas (Austin, TX, USA).

2.2 Desarrollo del inóculo

En el desarrollo de los inóculos se realizó un crecimiento autotrófico con iluminación constante entre 10-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y temperatura ambiente. Empleando el medio definido Schlösser a pH 9[11] para *Arthrospira platensis*, siendo su composición (por Litro de agua destilada): 13,61 g NaHCO_3 , 4,03 g Na_2CO_3 , 0,50 g K_2HPO_4 ,

2,50 g NaNO₃, 1,00 g K₂SO₄, 1,00 g NaCl, 0,20 g MgSO₄·7 H₂O, 0,04 g CaCl₂·2 H₂O, 6 mL por litro de PIV solución de metales (750 mg EDTA-Na₂, 97 mg FeCl₃·6H₂O, 41 mg MnCl₂·4H₂O, 5 mg ZnCl₂, 2 mg CoCl₂·6H₂O, 4 mg Na₂MoO₄·2 H₂O), 1 mL por litro de solución de micronutrientes Chu (50 mg EDTA-Na₂, 618 mg H₃BO₃, 19,6 mg CuSO₄·5 H₂O, 44 mg ZnSO₄·7 H₂O, 20 mg CoCl₂·6H₂O) y 1 mL vitamina B12 (15 µg/ 100 mL H₂O).

En el caso de *Chlorella sorokiniana* se utilizó el medio Tris Acetato Fosfato (TAP) modificado a pH 7,5, siendo su composición (por Litro de agua destilada): 15 g Glucosa, 8,4 g NaHCO₃, 2,42 g Tris-base, 25 mL del stock de sales (16 g NH₄Cl, 4 g MgSO₄·7 H₂O, 2 g CaCl₂·2 H₂O), 0,375 mL solución stock I (28,8 g por 100 mL K₂HPO₄, 14,4 g por 100 mL KH₂PO₄), 1 mL por litro elementos traza (11,167 mg EDTA-Na₂, 0,035mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0,067 mg Na₂SeO₃, 1,188 mg MnCl₂·4H₂O, 5,40 mg FeCl₃·6H₂O, 0,34 mg CuCl₂·2 H₂O).

2.3 Cultivo de *Arthrospira platensis* y *Chlorella sorokiniana* en medio simple¹

Para la formulación del medio de cultivo simple se usó como base el estudio previo llevado a cabo por K. Baunillo [11], su composición fue (por litro de agua destilada): 16 g NaHCO₃, 2 g KNO₃, 1 g sal de marca comercial “Sal marina grano fino, marca Refisal”, 0,1 g (NH₄)₃PO₄, 1 mL de solución de té verde la cual se preparó sumergiendo una bolsa de té “Té verde natural, marca Viella” en 25 mL de agua destilada, 0,01 g FeSO₄·7H₂O, 0,1 g MgSO₄·7H₂O y 0,02 g de fertilizante de uso comercial “UNO (N6-P4-<K7), marca Forza”.

El cultivo se llevó a cabo por 7 días, empleando 150 mL del medio de cultivo simple en fotorreactores con aireación y suministro de luz constante en un rango de 10-15 µmol·m²·s⁻¹. Los experimentos se realizaron por triplicado y se operaron por lotes. El pH se ajustó a 9 para la cianobacteria y a 7,5 para la microalga, empleando soluciones de HCl (8 M) y NaOH (8 M). Con la finalidad de tener un experimento control manteniendo las mismas condiciones de cultivo, se emplearon los medios del desarrollo del inóculo para cada microorganismo.

Los fotorreactores se construyeron a partir de recipientes de vidrio de la marca Hatsú de 400 mL. A estos se les insertó una pipeta pasteur de vidrio unida a un filtro de 0,45 µm, este se conectó mediante un plexitrón a una bomba de aire para acuarios. Para evitar la entrada de aire por fuera del filtro, se adecuó alrededor de la pipeta un tapón hecho con algodón hidrofóbico y gasas estériles. Por otra parte, se añadió iluminación constante de 10-15 µmol·m²·s⁻¹ mediante focos led, favoreciendo el metabolismo autótrofo en los microorganismos. En la **figura 1** se puede observar mejor la configuración.

¹ En este trabajo se le denominara medio simple, al ser un medio indefinido al emplear fertilizante en su formulación



Figura 1. Montaje completo de las fermentaciones con los fotorreactores.

2.4 Residuos

2.4.1 Obtención de residuos

Los residuos provienen de empresas agroindustriales de la región del Valle del Cauca. En el caso de la vinaza, se obtuvo del ingenio Providencia con una carga de sólidos solubles de 26°Brix. Por otra parte, el digestato se obtuvo de una granja porcícola aledaña a la ciudad de Palmira. Estos residuos se caracterizaron en los laboratorios del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), con el fin de conocer el carbono orgánico y el nitrógeno totales. En la **tabla 1** se muestran los resultados de la caracterización.

Tabla 1. Caracterización residuos agroindustriales

Descripción	Carbono Orgánico Total (g/L)	Nitrógeno Total (g/L)
Vinaza centrifugada	159	5,34
DR1 ^a	5,21	1,1
DR2 ^b	8,06	1,56

^a Digestato filtrado previamente con un lecho de zeolita y posteriormente centrifugado.

^b Digestato centrifugado

2.4.2 Pretratamiento de los residuos

2.4.2.1. Vinaza

El pretratamiento consistió en la separación de los sólidos insolubles de la vinaza suministrada, mediante un proceso de centrifugación en 3 repeticiones a 4000 rpm por 15 minutos. Al finalizar, se recuperó el sobrenadante, se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 90 minutos y se almaceno a una temperatura de 2-5 °C.

2.4.2.2. Digestato

Se suministraron 2 tipos de digestato, el DR1 tuvo un pretratamiento previo en donde se filtró a través de un lecho de zeolita para disminuir la carga de sólidos insolubles. Luego, al igual que el DR2, fueron centrifugados durante 30 minutos a 4500 rpm. Ambos se esterizaron en autoclave a 120 °C durante 90 minutos y se almacenaron a una temperatura de 2-5 °C.

2.5 Tolerancia a los residuos.

Partiendo de las diluciones propuestas, que corresponden a 20%, 50% y 100% (v/v) de los residuos respecto al medio de cultivo. Las diluciones se plantearon con el fin de evaluar si era posible el crecimiento de *A. platensis*, el cual presento una adaptabilidad al medio simple en un periodo de tiempo más corto, solo empleando los residuos o para conocer el rango en el que se encuentran las diluciones más aptas para los microorganismos. De esta forma, se realizaron las siguientes pruebas de tolerancia.

2.5.1 Medio sólido

Se realizaron pruebas en cajas Petri con las diluciones de los residuos agroindustriales para comprobar si había crecimiento de la cianobacteria durante una semana. No obstante, no se observó ningún crecimiento tanto para la vinaza como para el digestato como se muestra en la **figura 2**.

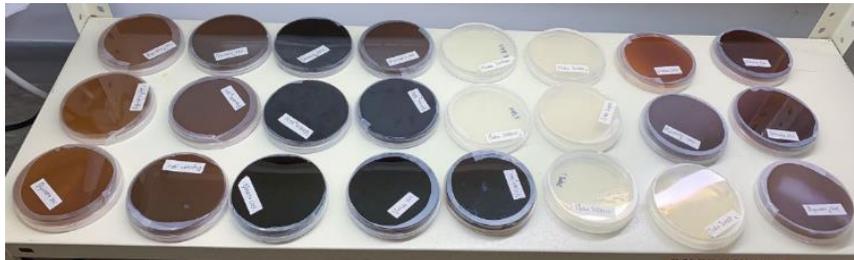


Figura 2. Prueba de tolerancia de residuos en medio sólido. De izquierda a derecha encontramos digestato al 20%, digestato al 50%, vinaza al 50%, medio Schlösser, medio simple, vinaza y digestato al 20%.

2.5.2 Medio líquido

Seguidamente, se probó la tolerancia en cultivos líquidos en Erlenmeyer de 25 mL, con agitación de 90 rpm y foto iluminación constante $10-15 \text{ umol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, esperando medir el crecimiento de la biomasa desde que se inocula y luego de 7 días de fermentación, obteniendo resultados negativos para la mayoría de los tratamientos, salvo los de digestato al 20%. Posteriormente, como se observa en la **figura 3**, se realizó tinción de gram y mediante microscopía se observó una muestra del cultivo. Como se mencionaba anteriormente, es notorio la disminución de la longitud de los filamentos de la cianobacteria, signo de estrés celular.



Figura 3. Microscopía de la prueba de tolerancia de residuos en medio líquido

Los resultados muestran estrés por parte de la cianobacteria, es evidente en el cambio de su morfología. Lo anterior se debió a un efecto de fotoinhibición producto de una concentración baja de inóculo ($0,078 \text{ g/L}$) y así mismo por la alta carga de sólidos insolubles presentes en ambos residuos, tal como lo demuestra Jiménez Tafur [18], donde se recomienda diluir y bajar la carga de sólidos de la vinaza con varios pretratamientos de centrifugación y adición de floculante debido al estrés que plantea la carga orgánica sobre los microorganismos. Esto demostró que no es oportuno el cultivo de estos microorganismos únicamente en residuos, o una concentración alta de ellos, especialmente en el caso de la vinaza. Otro factor influyente, sería la opacidad del medio, ya que, entre más opaca, menos intensidad de luz, que es necesaria para el crecimiento de estos microorganismos fotosintéticos.

2.6 Cultivo mixotrófico empleando medios formulados con vinaza y digestato.

Para analizar el comportamiento de la biomasa usando los residuos agroindustriales se planteó un diseño de medios, en el cual se buscó aportar 7,2 g/L de carbono total en una relación de carbono orgánico e inorgánico de 5 y una relación C: N de 10, siendo estos parámetros estándar para el cultivo mixotrófico de microorganismos fotosintéticos. En el caso de la vinaza, se plantearon diluciones 1/20 y 1/30, con el fin de que el aporte de carbono orgánico fuera similar al del DR2 y DR1 respectivamente. De este modo, se tomaron diluciones correspondientes a 1/3 y 1/6 para los stocks de digestato DR1, DR2 y los stocks diluidos de la vinaza. Además, se planteó un tratamiento a una dilución de 1/26,5 que aportó el total del carbono orgánico del medio, el cual equivale al 4 % v/v de stock de vinaza. Dicho de otra manera, se realizaron aportes desde el 15% hasta el 100% del carbono orgánico en los diferentes tratamientos y en caso de ser requerido, se suplementó el restante con glucosa. Para la fuente de carbono inorgánica y el aporte de nitrógeno se suplementó con bicarbonato de sodio y cloruro de amonio respectivamente.

2.7 Métodos analíticos

Se procedió a realizar la curva de calibración de concentración de biomasa en función de la absorbancia para ambos microorganismos, pues se espera mayor precisión en la toma de datos de los experimentos.

2.7.1 Concentración celular

Inicialmente realizó un barrido en espectrofotómetro (BioSpectrometer basic, Eppendorf®, Hamburgo, Alemania) a fin de determinar la longitud de onda máxima para ambos microorganismos. El barrido se tomó por triplicado para mayor precisión. Para la construcción de la curva de calibración, se tomaron 6 puntos de referencia, por lo que se realizaron diluciones seriadas desde 1/6 hasta 6/6 (cultivo madre) usando agua destilada. Asimismo, se midió la absorbancia de cada dilución a la longitud de onda correspondiente al pico más alto en la gráfica arrojada por el espectrofotómetro, empleando como blanco agua destilada.

Con el fin de conocer la densidad celular inicial, se procedió a tomar 6 muestras de 10 mL de cultivo madre, las cuales se filtraron en un filtro de polisulfona al vacío empleado filtros de 0,45 μm previamente pesados. Posteriormente fueron llevados al horno (Vacuum Ovens OV-12, Jeio Tech®, Seúl, Corea del sur) a una temperatura de 90°C durante 3 horas. Por último, se registró el peso correspondiente de cada muestra en intervalos de una hora hasta llegar a peso constante. Con los datos obtenidos se calculó la densidad celular del cultivo madre. Finalmente, se emplearon para realizar una gráfica de densidad celular en función de la absorbancia. El muestreo

para el seguimiento por espectrofotometría se realizó tomando 1 mL de muestra de cada biorreactor cada día, la biomasa de los microorganismos se midió como la densidad óptica a 690 nm (OD_{680}) y se convirtió a peso seco (DW) usando una correlación de regresión lineal.

Del procedimiento descrito se obtuvieron las **ecuaciones 1 y 2** para la medición de la concentración celular para *Arthrospira* y *Chlorella*, donde Y está en mg /mL y X es la absorbancia a 690 nm.

Ecuación para *Arthrospira platensis*:

$$y = 0,3202 x + 0,0152 \quad (1)$$

Ecuación para *Chlorella sorokiniana*:

$$y = 0,115x - 0,0049 \quad (2)$$

2.8 Registro del crecimiento de biomasa.

Se evaluó el crecimiento de todos los tratamientos, en donde se registraron los cambios en la concentración de biomasa al inicio y final luego de 4 días de fermentación. Con estos datos se realizaron los cálculos de Δ biomasa y productividad. También se observó mediante microscopía la morfología de ambos microorganismos en los tratamientos para identificar fenómenos de estrés debido a la presencia de residuos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Cultivo en medio simple.

Se evaluó el crecimiento y la producción de biomasa en el medio simple propuesto. En la figura 4 y 6 se muestra el crecimiento registrado, con ajuste de pH diario, foto iluminación y aireación constante.

En la figura 2, se muestran los datos registrados de crecimiento en el medio simple para la cianobacteria *Arthrospira platensis*. El cultivo se hizo por triplicado y como control se empleó el medio Schlösser.

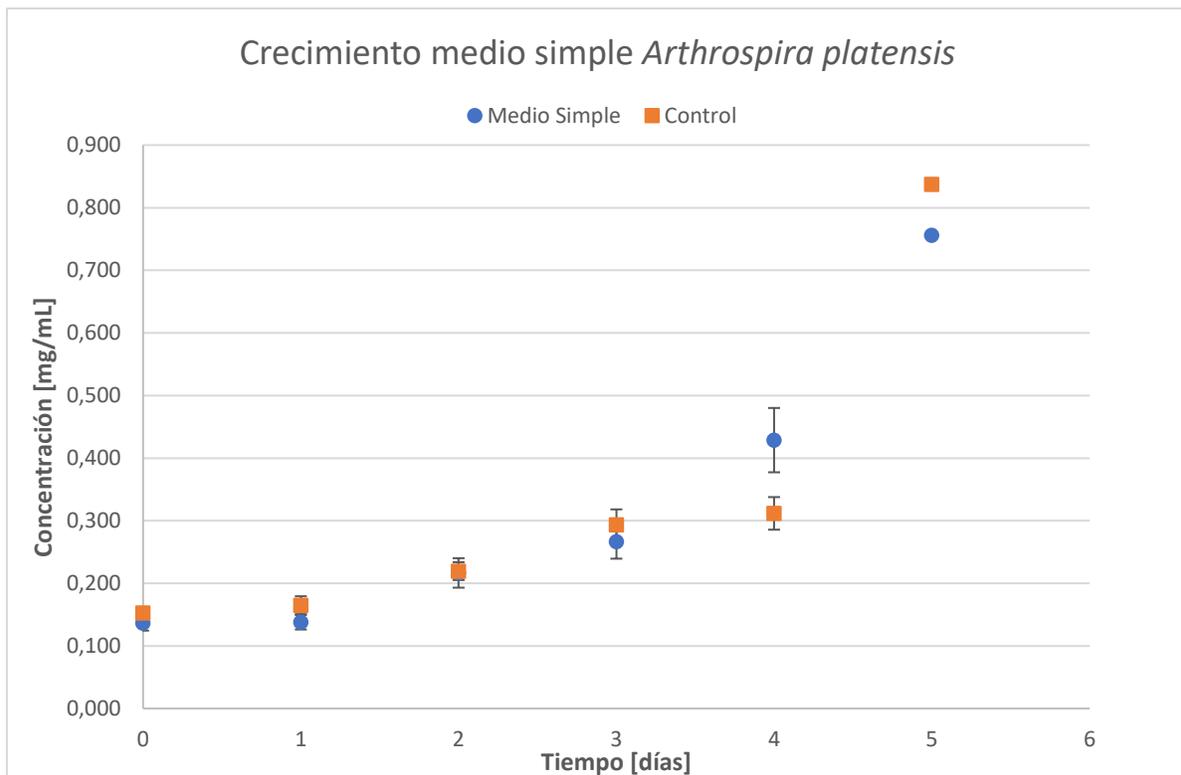


Figura 4. Resultados crecimiento de *A. platensis* en medio simple mg /mL.

De la **figura 4**, se puede observar el crecimiento de la cianobacteria en el medio Schlösser como control y el medio simple propuesto. Se muestra que la cianobacteria tuvo una adaptación rápida en el medio, esto se puede evidenciar mejor debido a la similitud con el crecimiento en el medio control, además, teniendo un comportamiento de crecimiento exponencial a partir del día 2, y presentando valores de concentraciones finales casi a la par del medio control. Obteniendo que, la cianobacteria *A. platensis*, en el medio simple tuvo una concentración celular final de 0,659 mg/mL, la cual al compararla con la del control que corresponde a 0,677 mg/mL presenta una diferencia mínima de 0,018 mg/mL. Por otra parte, una de las consideraciones al emplear el medio simple con iluminación y aireación constante, es que estimula el crecimiento autótrofo del microorganismo, este presenta una ventaja importante en cuanto a la fijación de CO₂. Asimismo, la capacidad de fijación de CO₂ se refleja en la productividad de la biomasa, además de que este no solo se fija, también se transfiere a productos de alto valor que contienen carbono, como carbohidratos, lípidos y proteínas [13].

Sumado a esto, se observó mediante microscopía una muestra del cultivo en medio simple, como se puede observar en la **figura 5**. En esta no se observaron signos de estrés en la morfología del microorganismo. Esto, se infiere del hecho de que los filamentos de la cianobacteria se conservan largos con una hélice definida. Parámetros que según Zapata [14], pueden representar la tasa de crecimiento de la biomasa, en el cual la disminución de la longitud de los filamentos de espirulina se ha asociado al estrés del microorganismo.

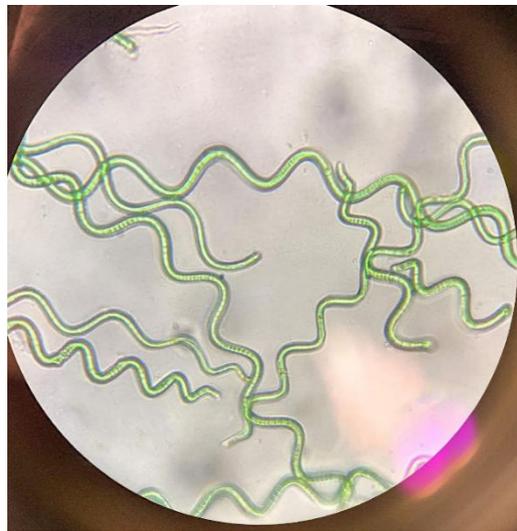


Figura 5. Microscopía cultivo *A. platensis* en medio simple

En la **figura 5**, se muestran los datos registrados para *Chlorella sorokiniana*. El cultivo en medio simple se hizo por triplicado y como control se empleó el medio TAP modificado, este medio usualmente se suplementa con glucosa como fuente orgánica. Por tal motivo para que ambos medios fueran comparables, se suplementó el medio simple de la misma forma para que ambos aportaran un carbono total de 7,2 g/L. Obteniendo los siguientes resultados de concentración celular.

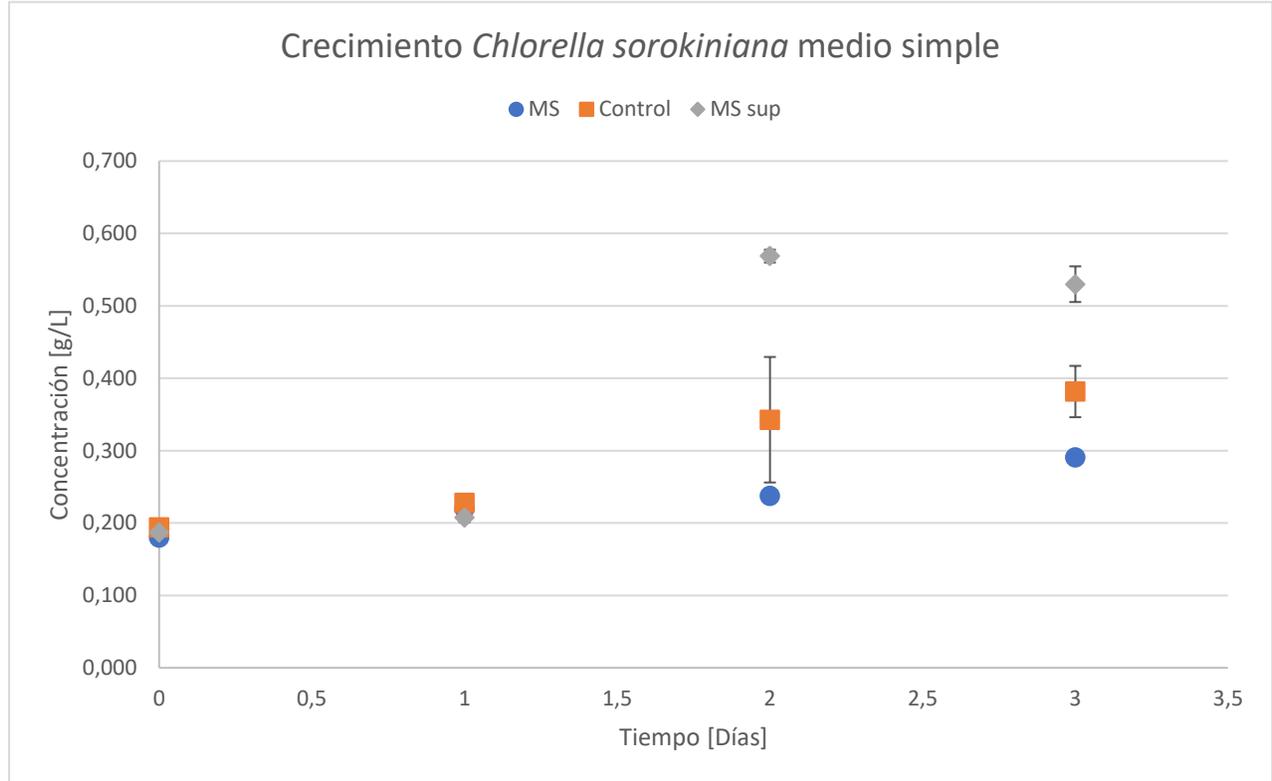


Figura 6. Resultados crecimiento de *C. sorokiniana* en medio simple g/L. Ms haciendo referencia al medio simple y MS sup al medio simple suplementado.

Se puede apreciar que, a lo largo de los 3 días de cultivo, el medio simple sin suplementar se mantuvo en una etapa de fase lag, mostrando que hubo un periodo de adaptación de la microalga al medio. No obstante, en el medio control se registró una curva de crecimiento que, posteriormente equipararía el medio simple suplementado con glucosa. Presentando una mayor concentración final de biomasa el medio simple suplementado (0,532 g/L) seguido del medio TAP (0,402 g/L), siendo ultimo el medio simple (0,291 g/L). Como se mencionaba anteriormente, la microalga *C. sorokiniana* presenta las mismas capacidades de crecimiento que la cianobacteria *A. platensis* al ser estos microorganismos fotosintéticos, sin embargo, dado que el medio TAP modificado promueve el crecimiento mixotrófico, pues hay consumo tanto por autotrofia como de compuestos orgánicos [15], se planteó el medio simple suplementado para ser comparable. Además, a pesar de los beneficios del crecimiento autótrofo, este presenta una desventaja en cuanto al alcance de una alta densidad de biomasa ya que la penetración de la luz es inversamente proporcional a la concentración celular [16].

En adición, se observó mediante microscopía una muestra del cultivo en medio simple, como se puede observar en la **figura 7**, y no se observaron signos de estrés en la morfología del microorganismo. Esto con base a la

morfología de la microalga, la cual según Safi [17], presenta una forma esférica y un tamaño de 2-10 μm sin aglomeración celular.

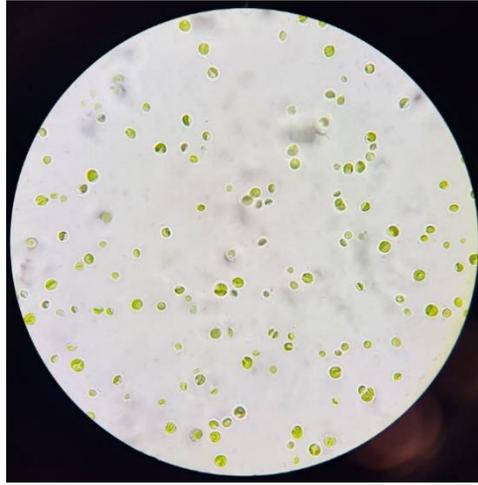


Figura 7. Microscopía cultivo *C. sorokiniana* en medio simple

3.2 Crecimiento de *Arthrospira platensis* en medios con vinaza y digestato.

Se evaluó el crecimiento y la producción de biomasa en medios de cultivo conformados por diluciones de vinaza, Digestato DR1 y DR2 y teniendo como control el medio Simple suplementado. Las diluciones correspondientes fueron para DR1 Y DR2 de 1/3 y 1/6, mientras que el stock de vinaza se diluyó respectivamente en 1/30 y 1/20, y de cada dilución se cultivó en la proporción 1/3 y 1/6. Por otra parte, se realizó una dilución de vinaza de 1/26,5 para un aporte completo del carbono orgánico fijado, tal como se mencionó en el diseño de medios. Estos cultivos se hicieron por duplicado en Erlenmeyer de 50 mL con un volumen de trabajo de 25 mL, como se muestra en la **figura 8**. Así mismo, se agitó a 120 rpm a 28°C con 10-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ de iluminación.



Figura 8. Montaje de cultivo con residuos de *A. platensis* al quinto día.

Se midió el crecimiento de la biomasa al cabo del quinto día de fermentación. Los resultados de crecimiento se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Resultados crecimiento de *A. platensis* en medios con residuos.

Tratamiento	Biomasa		Productividad (g/L · día)
	Final producida (mg)	C. final biomasa (mg/mL)	
Control	20,7	0,828	0,139
DR1 1/3	8,77	0,351	0,053
DR1 1/6	30,86	1,235	0,229
DR2 1/3 ^a	-	-	-
DR2 1/6	16,40	0,656	0,117
V1/30 1/3	26,45	1,058	0,191
V1/30 1/6	25,22	1,009	0,177
V1/20 1/3	17,02	0,681	0,113
V1/20 1/6	23,04	0,921	0,164
V 1/26,5	11,84	0,474	0,059

^a El medio de digestato DR2 1/3 mostró absorbancias que superaban los 0,335 mg/mL, no obstante, al momento de hacer las diluciones el valor no era reconocido por el espectrofotómetro utilizado.

De la **tabla 2**, se muestra que la cianobacteria logró ajustarse y crecer hasta concentraciones superiores a 1 g/L en ambos residuos, pese a que no tuvieron un periodo de adaptación previo que ayudara a generar la maquinaria enzimática necesaria para aprovechar los compuestos de los residuos, por lo que, en residuos con alta carga orgánica como el digestato DR1 se vio la tendencia que tienen en inhibir el crecimiento, pues los tratamientos que lo tenían en mayores concentraciones, sobre todo para el no filtrado, resultaron ser los de menor rendimiento en la producción de biomasa. En este sentido, los tratamientos y su aporte de carbono como el digestato DR1 en la dilución 1/6 (0,86 g/L), y los tratamientos del stock de vinaza 1/30 en las diluciones 1/3 (1,76 g/L) y 1/6 (0,88 g/L) mostraron tener el mejor rendimiento en términos de concentración final de biomasa. Asimismo, la mayor productividad se obtuvo en los tratamientos de DR1 con dilución 1/6 (0,229 g/L · día), vinaza 1/30 en las

diluciones 1/3 (0,191 g/L · día) y 1/6 (0,177 g/L · día). Seguidamente encontramos, el stock de vinaza 1/20 en la dilución 1/6 y la del digestato DR2 en 1/6, mostrando la inhibición que suponen los residuos a medida que se aumenta la concentración de estos en el medio.

Es posible que, como se mencionó previamente, dada la naturaleza adaptativa de las cianobacterias, esta haya logrado resistir al estrés de los residuos a través de la formación de biopelículas que se encontraron en todos los tratamientos excepto por los controles, que estaban libres de digestato y vinaza. Esto debido a que estudios prueban que las cianobacterias tienen un mayor potencial para formar una matriz polimérica hidratada denominada sustancias poliméricas extracelulares (EPS) las cuales consisten en polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, que a su vez fomentan la formación de estas biopelículas [19], estas resultan ventajosas al proveer de una matriz que favorece el contacto de las cianobacterias con el medio, desarrollando una alta tolerancia a los compuestos inhibitorios del medio, por otra parte se considera ventajoso al reducir costos en la recolección de la biomasa y da la posibilidad de operar en medios con viscosidades mayores que los tradicionales. [20]

Otra particularidad se mostró en el cambio de coloración de los medios conforme pasaban los días de cultivo, siendo paulatinamente más traslucido (Ver **figura 8**). Por demás, *A. platensis* demostró tolerar el medio de Vinaza en la dilución 1/26,5 (6 g/L), correspondiente a un aporte del 100% del carbono orgánico del medio. Con lo anterior, es factible que, en futuros estudios, en condiciones de aireación y con una fase previa de adaptación, sea posible usar una mayor proporción de la vinaza planteada en este estudio como fuente de carbono en la suplementación de medios.

3.3 Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en medios con vinaza y digestato.

Se realizaron los 10 tratamientos propuestos con su respectiva réplica en Erlenmeyer de 50 mL con 25 mL de volumen de cultivo. Se realizaron las diluciones del digestato DR1, DR2 y la vinaza mencionada previamente, a 90 rpm, 28°C y entre 10-15 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ de iluminación. Los resultados de crecimiento se muestran en la **tabla 3** en términos de miligramos de biomasa, la concentración final alcanzada (mg /mL) y la productividad (g /L·día) de cada tratamiento durante los 4 días de cultivo.

Tabla 3. Resultados crecimiento de *C. sorokiniana* en medios con residuos.

Tratamiento	Biomasa		Productividad (g /L·día)
	Final producida (mg)	C. final biomasa (mg/L)	
Control	6,43	0,459	0,08
DR1 1/3	4,38	0,330	0,055
DR1 1/6	4,07	0,316	0,051
DR2 1/3	2,81	0,238	0,035
DR2 1/6	3,32	0,274	0,042
V1/30 1/3	10,05	0,623	0,126
V1/30 1/6	6,85	0,463	0,086
V1/20 1/3	7,70	0,506	0,096
V1/20 1/6	5,65	0,406	0,071
V 1/26,5	4,25	0,326	0,053

En la **tabla 3**, se puede apreciar que hubo mejores resultados de crecimiento para los tratamientos suplementados con vinaza, destacando el tratamiento con la dilución 1/30 1/3, con una productividad de 0,126 g/L·día de biomasa, correspondiente a un 1,77 g/L de carbono orgánico, aportando aproximadamente el 25% del carbono oxidable del medio. Por parte del digestato, los tratamientos con el DR1 (filtrado con zeolita), mostraron mejores resultados de crecimiento, siendo concordante con una disminución de compuestos que pueden ser un factor de estrés para las microalgas.

Se debe recalcar que, al igual que en el caso anterior, no se realizó un periodo de adaptación de las microalgas a ninguno de los residuos empleados en el medio, por lo que los cultivos deben pasar por una fase de adaptación que evita que el microorganismo tenga un crecimiento de carácter exponencial desde un inicio. Hecha esta salvedad, aunque el digestato se caracteriza por ser una fuente completa de nutrientes y sales, tiene también la presencia de compuestos orgánicos producto de la digestión anaerobia, tales como ácidos volátiles, compuestos amoniacales, entre otros [21], que en una alta proporción pueden inhibir el crecimiento y aumentar el tiempo de adaptación de la microalga.

En el caso de la vinaza, cabe mencionar que el tratamiento que aportó el total de carbono orgánico al medio, correspondiente a 6 g/L, a pesar de que mostró un crecimiento limitado respecto a otros tratamientos, muestra que, con la debida adaptación del microorganismo que logró tolerar esta concentración, es posible aprovechar la

vinaza como fuente de carbono alterna para la suplementación de medios. Además, sumado al pretratamiento que tuvo para disminuir la carga de sólidos disueltos, dado que la vinaza pasó por periodos de tiempo almacenada a temperaturas entre los 2-4°C, estas condiciones permitieron una mayor decantación de lodos, disminuyendo en parte el estrés que suponen estos en el medio. Así mismo, dado que este residuo proviene de los mostos agotados y destilados de la fermentación alcohólica de la industria azucarera, no presenta la cantidad de productos residuales de otras digestiones como en el caso del digestato, por demás, en la caracterización completa de los residuos, se ha reportado que la vinaza tiene una alta concentración de algunos nutrientes esenciales para microalgas, tales como sales de potasio, fósforo, hierro, manganeso, sodio, entre otros, que hacen parte de los sólidos solubles e insolubles [18], aunque estos valores dependen de factores como el lugar de origen y la calidad del residuo.

En el marco de lo anterior, también se debe resaltar que los resultados de crecimiento son menores comparado a resultados reportados en otros estudios para microalgas usando tanto vinaza como digestato, en los que se obtienen concentraciones finales superiores a 1 g/L y productividades de entre 0,1-0,7 g/L·día. Esto se debe en parte a que generalmente se emplean fases previas de adaptación desde el cultivo madre y condiciones de aireación que proveen de una mayor homogenización del cultivo, así como una fuente adicional de carbono inorgánico del CO₂ que permiten el crecimiento mixotrófico y a su vez, alcanzando mayores resultados que los expresados en este estudio.

4. Conclusiones

Tanto la vinaza como el digestato provenientes de la agroindustria del Valle del Cauca demostraron ser un subproducto aprovechable con el potencial de servir en la formulación de medios de cultivo para la cepa de la cianobacteria *Arthrospira platensis* y de la microalga *Chlorella sorokiniana*. La concentración fijada de carbono oxidable de 7,2 g/L en una relación de Corgánico: Cinorgánico de 5 y de C: N de 10 mostraron ser acertados para el crecimiento mixotrófico de ambos microorganismos. En este sentido, los medios más promisorios de residuos en proporción con el medio simple modificado para la generación de biomasa fueron, para *A. Platensis* del digestato DR1 en la dilución 1/6 (0,86 g/L de aporte de carbono orgánico), y los tratamientos del stock de vinaza 1/30 en las diluciones 1/3 (1,76 g/L de aporte de carbono orgánico) y 1/6 (0,88 g/L de aporte de carbono orgánico) y para *C. sorokiniana* de vinaza en una dilución de 1/30 1/3 (1,77 g/L de aporte de carbono orgánico). Asimismo, se comprobó el potencial de la vinaza en el aporte total de carbono orgánico para la formulación de medios (6 g/L). De este modo, fue posible obtener una formulación de medio de cultivo más simple, escalable e industrializable aprovechando el digestato de las granjas porcícolas y la vinaza de la caña de azúcar. Se recomienda realizar periodos de adaptación previos para ambos microorganismos con los residuos planteados, extender el tiempo de cultivo y monitorear el consumo de carbono y nitrógeno en los medios, así como montar cultivos en donde se burbujee una mezcla de aire con CO₂ para que ambos microorganismos tengan de forma más activa las rutas metabólicas de autotrofia, así como una mejor homogenización del cultivo.

Bibliografía

- [1] Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina–From growth to nutritional product: A review. *Trends in food science & technology*, 69, 157-171.
- [2] Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D. (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource technology*, 167, 358-366.
- [3] Temraleeva, A. D., Dronova, S. A., Moskalenko, S. V., & Didovich, S. V. (2016). Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria. *Microbiology*, 85(4), 389-399.
- [4] Zhai, J., Li, X., Li, W., Rahaman, M. H., Zhao, Y., Wei, B., & Wei, H. (2017). Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. *Ecological engineering*, 108, 83-92.
- [5] Toyub, M. A., Uddin, M. Z., Miah, M. I., & Habib, M. A. B. (2011). Growth performance and nutritional analysis of *Spirulina platensis* in different concentrations of papaya skin powder media. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 46(3), 333-338.
- [6] Asadi, P., Rad, H. A., & Qaderi, F. (2020). Lipid and biodiesel production by cultivation isolated strain *Chlorella sorokiniana* pa. 91 and *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater treatment plant effluents. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18(2), 573-585.
- [7] Su, M., Dell'Orto, M., Scaglia, B., D'Imporzano, G., Bani, A., & Adani, F. (2022). Growth Performance, Biochemical Composition and Nutrient Recovery Ability of Twelve Microalgae Consortia Isolated from Various Local Organic Wastes Grown on Nano-Filtered Pig Slurry. *Molecules*, 27(2), 422.
- [8] Ansilago, M., Ramos, M. M., Mussury, R. M., & de Carvalho, E. M. (2021). Enhancing secondary metabolite production by *Chlorella sorokiniana* using an alternative medium with vinasse. *Research, Society and Development*, 10(5).
- [9] Montaña Saavedra, M. D., Paschino Bissoto, F., Souza, R. A. D., Cárdenas Concha, V. O., & Gaspar Bastos, R. (2019). Growth of *Desmodesmus subspicatus* green microalgae and nutrient removal from sugarcane vinasse clarified by electrocoagulation using aluminum or iron electrodes. *Dyna*, 86(211), 225-232.
- [10] Charria-Girón, E., Amazo, V., De Angulo, D., Hidalgo, E., Villegas-Torres, M. F., Baganz, F., & Ortega, C. (2021). Strategy for Managing Industrial Anaerobic Sludge through the Heterotrophic Cultivation of *Chlorella sorokiniana*: Effect of Iron Addition on Biomass and Lipid Production. *Bioengineering*, 8(6), 82.
- [11] Schlösser, U. G. (1982). Sammlung von algenkulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 95(1), 181-276.

- [12] Baunillo, K. E., Tan, R. S., Barros, H. R., & Luque, R. (2012). Investigations on microalgal oil production from *Arthrospira platensis*: towards more sustainable biodiesel production. *RSC advances*, 2(30), 11267-11272.
- [13] Zeng, X., Danquah, M. K., Zhang, S., Zhang, X., Wu, M., Chen, X. D., ... & Lu, Y. (2012). Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. *Chemical Engineering Journal*, 183, 192-197.
- [14] Zapata, D., Arroyave, C., Cardona, L., Aristizábal, A., Poschenrieder, C., & Llugany, M. (2021). Phytohormone production and morphology of *Spirulina platensis* grown in dairy wastewaters. *Algal Research*, 59, 102469.
- [15] Wang, J., Yang, H., & Wang, F. (2014). Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(7), 3307-3329.
- [16] Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*, 31(7), 1043-1049.
- [17] Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- [18] Jiménez Tafur, J. D. (2017). Estudio de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* crecida heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar.
- [19] Sauer K, Rickard AH, Davies DG (2007) Biofilms and Biocomplexity. *Microbe* 2: 347–353.
- [20] Ng, F. L., Phang, S. M., Periasamy, V., Yunus, K., & Fisher, A. C. (2014). Evaluation of algal biofilms on indium tin oxide (ITO) for use in biophotovoltaic platforms based on photosynthetic performance. *PloS one*, 9(5), e97643.
- [21] Ibarra-Camacho, R., León-Duharte, L., & Osoria-Leyva, A. (2019). Caracterización fisicoquímica de vinazas de destilerías. *Revista Cubana de Química*, 31(2), 246-25