

Efecto del pH sobre el crecimiento y viabilidad celular de una cepa local de *Chlorella vulgaris* Beijerinck

Effect of pH over growth and cellular viability of *Chlorella vulgaris* Beijerinck local strain

Liliana Gómez-Luna¹ <https://orcid.org/0000-0002-1282-3392>

Yadenis Ortega-Díaz¹ <https://orcid.org/0000-0001-9674-9785>

Lilisbeth Tormos-Cedeño² <https://orcid.org/0000-0002-4969-159X>

¹Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Universidad de Oriente. Laboratorio de Ecotoxicología y Servicios Ambientales, Santiago de Cuba, Cuba

²Carrera de Biología. Departamento de Biología y Geografía. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

* Autor para la correspondencia. Correo electrónico: lilianag@uo.edu.cu

RESUMEN

Entre las microalgas de mayor importancia por su valor económico y nutricional, tanto para animales como humanos se encuentra *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con múltiples aplicaciones por su calidad proteica y las propiedades de sus metabolitos. A pesar de ello existen limitantes en su producción a gran escala, y vacíos en cuanto a la estandarización de cultivos, en especial para cepas locales utilizadas con fines biotecnológicos. En este trabajo se evaluó el efecto del pH en el rango de 5 a 8, sobre el crecimiento y viabilidad de una cepa local de *C. vulgaris* aislada de un embalse del oriente de Cuba, estableciendo cultivos aireados y sin aireación a diferentes volúmenes, en condiciones controladas (temperatura: $22 \pm 2,3$ °C, régimen de luz continua Daylight

TL-D 36W/ 54-765 a una densidad de flujo fotónico (DFF) de 3 000 lux ($58,59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). El pH 7 resultó óptimo para el crecimiento y viabilidad de las células, favoreciendo la formación de autósporas. Se obtuvieron valores máximos de concentración celular de $640,5 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$ in minicultivos no aireados. Se desarrollaron posteriormente cultivos aireados a mayor volumen a 7 y 7,5, corroborándose los mejores resultados en cuanto al crecimiento a pH 7 ($6\ 066 \pm 141 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$), valores 1,2 veces mayor que los obtenidos a 7,5 ($4\ 122 \pm 112 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$) ($p \leq 0,05$) que es el pH recomendado al cultivar *C. vulgaris* en medio Bristol.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*; pH; viabilidad celular; crecimiento.

ABSTRACT

Among the most important microalgae because of their economic and nutritional value, both for animals and humans, we can mention *Chlorella vulgaris* Beijerinck, with multiple applications due to its protein quality and its metabolites properties. Despite this, there are limitations in the large-scale cultures, and gaps in relation with standardization of culture parameters, especially in local strains with biotechnological interest. This work it was evaluated the effect of pH into the range of 5 to 8, over the growth and cellular viability of *C. vulgaris* strain isolated from a water pond of the eastern of Cuba, stablishing aerated and non-aerated cultures at different scales in controlled conditions (temperature: $22 \pm 2,3 \text{ }^\circ\text{C}$, continuous light Daylight TL-D 36W/ 54-765 with a photon flux density (PFD) of 3 000 lux ($58,59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). The optimum pH value for the growth and viability of *C. vulgaris* was pH 7, favoring the autospores formation. The maximum values of cell concentration around $640.5 \times 10^4 \text{ celmL}^{-1}$ were obtained in non-aeriated mini-cultures. Aerated cultures were developed in 1L of volume, at pH 7 and 7,5 documenting the better results in growth values, being $6066 \pm 141 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$ at pH 7; 1,2 times higher than those obtained with pH 7,5 ($4122 \pm 112 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$) ($p \leq 0,05$), which is the recommended pH when Bristol media is used to *C. vulgaris* culture.

Keywords: *Chlorella vulgaris*; pH; growth; cellular viability.

Recibido: 18/09/2020

Aceptado: 10/01/2021

Introducción

El uso convencional, así como el fomento de nuevas aplicaciones le confieren gran importancia al cultivo de microalgas, el que comenzó en la década de 1960 en Japón, con el desarrollo del cultivo de *Chlorella*.^(1, 2) Ya en 1890 el microbiólogo holandés Beijerinck obtuvo por primera vez cultivos puros de la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris*, y a partir de entonces se trabajó en la obtención de cultivos con alta densidad celular, lo que fue logrado por Otto Warburg en 1919⁽³⁾, quien introdujo la idea de utilizar suspensiones densas de microalgas como instrumento en las investigaciones sobre fotosíntesis.^(4,5,6,7)

Chlorella vulgaris ha sido la especie de microalga más estudiada.⁽⁸⁾ Su cultivo presenta múltiples ventajas debido a su alta velocidad de crecimiento y la habilidad de adaptarse a diferentes ambientes,⁽⁹⁾ lo que facilita su desarrollo en áreas pequeñas y en regiones sustentables para el desarrollo de cultivos agrícolas.

A partir de su biomasa pueden obtenerse disímiles productos: suplementos nutricionales,⁽¹⁰⁾ lípidos,⁽¹¹⁾ enzimas,⁽¹²⁾ proteínas,⁽¹³⁾ almidón,⁽¹⁴⁾ polímeros,⁽¹⁵⁾ pigmentos, vitaminas^(2,16,17,18,19), antioxidantes⁽¹³⁾, isótopos bioquímicos estables, estimuladores del crecimiento⁽²⁾ y biocombustibles,^(20,21,22,23,24) destacando además entre sus usos convencionales la producción de biofertilizantes, y la alimentación animal;^(25,26,27) además de la obtención de productos de interés químico-farmacéutico⁽²⁾ como el omega 3,^(28,29,30,31) hidrolizados proteicos⁽¹⁰⁾, y en general, suplementos nutricionales para humanos,^(32,33,34,35) así como importantes servicios ambientales en el tratamiento de aguas residuales^(15, 36,37,38,39,40); siendo la producción de biocombustibles uno de sus usos relevantes.^(41,42,43,44)

Muchos esfuerzos se dedican hoy a abaratar y mejorar la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*, desde el establecimiento de inóculos hasta la obtención del producto final. Entre estas investigaciones destaca el manejo de diferentes parámetros de cultivo

(2, 45, 46), hasta la aplicación de tecnologías alternativas como el uso del campo magnético. (47,48,49) Otra tendencia ha sido el aislamiento de especies locales en función de lograr su fácil adaptación a las condiciones de cultivo y valorizar especies autóctonas. En el cultivo masivo, el rendimiento alcanzado depende tanto de la concentración celular como del grado en que las células desarrollan su potencial de crecimiento. Por tanto, para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo son necesarios: un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y micronutrientes, así como adecuadas condiciones físico-químicas (temperatura, pH) y energía. (2, 50, 51)

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del pH en el rango de 5 a 8 sobre el crecimiento y viabilidad de células en cultivo de una especie local de *C. vulgaris*.

Fundamentación teórica

La variación de las condiciones de cultivo y de factores clave como el pH, intensidad luminosa, concentración de nutrientes, temperatura, fotoperíodo, régimen de cosecha, entre otros, ha contribuido al manejo de sistemas de cultivo para la obtención de biomasa microalgal para diferentes propósitos, siendo el pH, la presión de O₂ y CO₂, algunos de los parámetros críticos a la hora de diseñar fotobiorreactores. (52)

La respuesta de las microalgas al pH varía ampliamente, debido a que este factor determina la solubilidad del dióxido de carbono y de los minerales en los cultivos e influye directa o indirectamente en el metabolismo. Al igual que la temperatura no solo afecta las reacciones celulares, sino también los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, así como la solubilidad de los gases en el agua. (50, 53)

La selección del valor de pH es importante en el cultivo de las microalgas ya que un valor poco favorable podría afectar la eficiencia en la absorción de nutrientes y la producción de metabolitos, lo que muestra una clara dependencia de las células en cultivo al pH del medio de cultivo, siendo importante considerar que cada microalga presenta un rango de pH óptimo para su cultivo. (53)

El pH se ve afectado por la capacidad tampón y composición del medio de cultivo, cantidad de dióxido de carbono disuelto, temperatura, que a su vez controla la

solubilidad de CO₂ y actividad metabólica de las células microalgales.^(54, 55) El pH de un cultivo varía con el desarrollo de este, aun en el caso de aquellos cultivos fuertemente tamponados; siendo los valores de pH óptimo descritos para *Chlorella vulgaris* el rango comprendido entre pH 7,5 y 8,28.^(56, 57)

Si bien el efecto del pH sobre especies de *Chlorella* ha sido explicado por varios autores,^(53, 57, 58) en muchas ocasiones este factor no es bien manejado tanto en los cultivos a escala de laboratorio como a gran escala, o bien se asume un rango o se considera un mismo valor de pH óptimo para varias especies del género, y para especies aisladas en diferentes regiones.

Métodos utilizados y condiciones experimentales

Descripción de la especie: *Chlorella Vulgaris* Beijerinck

La cepa utilizada fue aislada del medio local, específicamente en un estanque dedicado al cultivo de ciprínidos en la estación de acuicultura de Maffo, Contramaestre, y mantenida en el cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del CNEA con el código F010102-N, donde se conserva en condiciones adecuadas desde el 2002, tanto en el Banco Maestro como en el Banco de Trabajo, en medio Bristol sólido y líquido (figura 1).

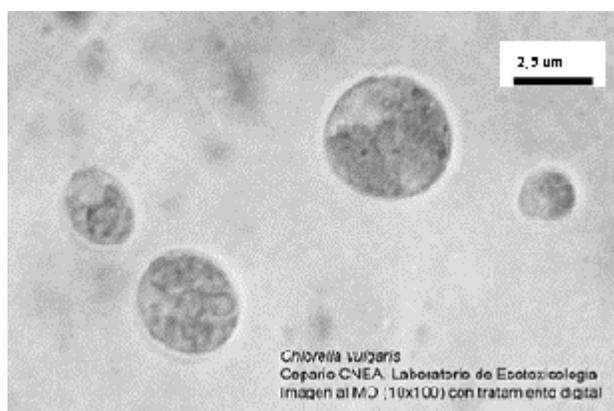


Fig. 1- Células de *Chlorella vulgaris*. Cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Código: F010102-N

Condiciones experimentales

Los cultivos unialgales axénicos de *C. vulgaris* fueron desarrollados en una instalación con un valor de interferencia electromagnética en el rango de 0,03 a 0,23 μT . Para eliminar interferencias electromagnéticas en la instalación experimental, los cultivos fueron ubicados en lugares con exposición menor que 0,25 μT .⁽⁵⁹⁾

La temperatura en la cámara de cultivo se mantuvo alrededor de $22 \pm 2,3$ °C, con una humedad relativa del $62,5 \pm 3,1\%$. Los cultivos se mantienen en régimen de luz continua, con cuatro lámparas fluorescentes Daylight TL-D 36W/ 54-765 Philips, a una densidad de flujo fotónico (DFF) de 3 000 lux ($58,59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la que se ajusta diariamente utilizando una estación meteorológica portátil TP LM 8000 4 en 1, con sensor de luz con

filtro para la corrección del color en el rango de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), fotópico (0-20 000 lx, E: ± 8), instalado permanentemente, con un fotodiodo integrado exclusivo. La DFF se expresa en $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, utilizando el factor de conversión 51,2.⁽⁶⁰⁾

A cada tratamiento se le ajustó el pH dos veces por día. El pH fue medido y ajustado convenientemente con un pH-metro Mettler Toledo SevenGo Duo (Alemania), con un error de 0,1%. Una vez concluido este experimento se selecciona el pH que permite mayores concentraciones celulares y viabilidad, para el desarrollo de cultivos unialgales axénicos aireados a mayor volumen (1L).

Desarrollo de los cultivos experimentales

Preinóculos e inóculos: Se establecen cultivos a partir de un subcultivo matriz monoalgal de *C. vulgaris* obtenido a partir de un cultivo sólido en cuña de agar. Este cultivo matriz se desarrolla de forma asincrónica (discontinuo) en condiciones de fotoautotrofia con aireación, sin suministro extra de CO_2 y con un régimen de luz continua (DFF=19,5 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Los cultivos fueron aclimatados, aumentando progresivamente la intensidad de la luz, en tres cultivos sucesivos hasta que la cepa estuvo completamente adaptada a 75 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A partir de este cultivo matriz de *C. vulgaris* durante su fase exponencial, se desarrollan cultivos sin airear (100 mL) y aireados (1 000 mL) para los diferentes experimentos.

Desarrollo de cultivos no aireados: Los minicultivos no aireados, se prepararon con un volumen de 100 mL a una concentración inicial (C_i) equivalente a 215×10^4 células mL^{-1} , utilizando un rango de pH de 5 a 8 con los siguientes valores: 5, 6, 7 y 8. Los cultivos se desarrollan por triplicado durante 168 h (7 días), agitándolos manualmente dos veces por día, para favorecer su homogenización.

Desarrollo de cultivos aireados: Se establecen cultivos permanentemente aireados de 1L a partir del cultivo matriz en fase exponencial, con una $C_i=215 \times 10^4$ células mL^{-1} . La aireación se logró mediante burbujeo de aire filtrado con pre-filtros de jeringa de microfibra de vidrio MIDISART 2000 de 0,20 μm . El flujo de aireación se mantuvo relativamente constante a 0,47 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Las condiciones establecidas permiten un crecimiento uniforme y aporta a los cultivos una cantidad mínima de CO₂, que les favorece, al actuar como fuente de carbono y colaborar con el tamponamiento de los cultivos.^(2, 50) Se establecen cultivos al valor de pH que mejores resultados permite y a 7,5, que es el que normalmente se recomienda al formular el medio Bristol, que fue el medio utilizado para el desarrollo de estos experimentos.

Medio de cultivo y ajustes del pH: El medio utilizado para el mantenimiento y desarrollo de los cultivos fue el sugerido por Bristol con modificaciones; ⁽²⁾ este se utiliza además para la formulación del medio sólido a partir del que se realizan los subcultivos (tabla 1). Se utiliza el nitrato de sodio (NaNO₃) como principal fuente de nitrógeno.

Tabla 1- Formulación del medio de cultivo Bristol ⁽²⁾ modificado

Macroelementos (gL⁻¹)		Oligoelementos y vitaminas B			
NaNO ₃	1,000	Solución de Algal (8,3 gL ⁻¹) para añadir 3 mL ⁻¹			
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,025	EDTA	9,50 g	CoCl ₂	0,10 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,075	Fe (Citrato)	10,50 g	Cu ₂ SO ₄	0,15 g
K ₂ HPO ₄	0,075	ZnCl ₂	0,63 g	Tiamina	2,10 g
KH ₂ PO ₄	0,175	MnCl ₂	0,85 g	Biotina 2%	1,36 g
NaCl	0,025	Na ₂ Mo ₄	1,16 g	Cianocobalamina1%	1,90 g
				Excipiente Vitamínico	0,35 g
				Complejo B	

El pH fue ajustado a 7,5 en los cultivos controles, ajustándose convenientemente post-inoculación con soluciones esterilizadas de NaOH 1M y HCl 1M en cada ensayo.

Evaluación de la cinética de crecimiento

El crecimiento se midió a través del recuento diario directo de una alícuota con una cámara de recuento hematológico Neubauer mejorada, utilizando un microscopio óptico Motic B Profesional (Alemania), expresándose los resultados de la concentración celular en célmL⁻¹. Se realizaron diluciones con agua destilada siempre que fue necesario, de forma tal que el número de células por campo de recuento en 1 mm² estuviera entre 10 y 100.

Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad se determinó a través de tres parámetros:

- a. Recuento de autósporas viables
- b. tasa de crecimiento máxima
- c. concentración de clorofila *a* al inicio y al final del experimento

Siguiendo el procedimiento antes descrito para el recuento de células, se realizó el recuento diferenciado de las autósporas, para lo que se utilizó tinción con Lugol neutro al 1%. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de autósporas respecto al total de células.

A partir de los valores del recuento celular se calcula la tasa de crecimiento que corresponde al inverso del tiempo de duplicación (t_d), tiempo necesario para que N células se transformen en $2N$ células durante la fase de crecimiento exponencial, y se calcula mediante la expresión:

$$\mu = (\log_2 (N_t) - \log_2 (N_0)) / (t_t - t_0) \quad (1)$$

donde:

N_t y N_0 son las densidades celulares (cél mL^{-1}) a los tiempos t_t y t_0 respectivamente.

Para el cálculo de la tasa de crecimiento media o exponencial (μ_{med}), t_0 y t_t son el primer y el último día de la fase logarítmica, en el orden que se mencionan.⁽²⁾ Es de gran valor la determinación de la tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) que se calcula considerando los valores del crecimiento celular obtenidos cuando el cultivo alcanza la máxima pendiente. El resultado se expresa en divisiones por día (div. día^{-1}).

La concentración de clorofila *a in vivo* se determinó a través de un fluorímetro digital Aquafluor Turner Design ($0\text{-}300 \mu\text{g.L}^{-1}$, $E: \pm 0,30 \mu\text{g.L}^{-1}$) utilizando el factor de corrección $6,9025 \pm 0,0001$.⁽⁶¹⁾ La concentración de clorofila *in vivo* se expresa en ngcél^{-1} .

Análisis estadísticos

Se utilizó el estadígrafo t para comparar muestras dependientes, y seleccionar el valor de pH que permite mejor crecimiento y viabilidad, utilizando un test t simple pareado con

un porcentaje de confiabilidad del 99,95 %, seleccionando los valores de cada serie que corresponden a máximos crecimientos (48 y 72 h).

Este mismo análisis se utilizó para comparar las curvas de crecimiento, teniendo en cuenta para la comparación de las series, las diferentes fases o estadios del cultivo.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, de dos factores con una sola muestra por grupo, para una $p=0.05$ con el objetivo de comparar medias. Se realizaron análisis de correlación (Kendall) para evaluar la relación de la viabilidad con la concentración celular ($p=0,05$).

Resultados y discusión

Variación de parámetros de crecimiento con el pH en *C. Vulgaris*

El estudio taxonómico, fisiológico y ecológico de microalgas aisladas de represas es de sumo interés para determinar su utilización como bioindicadores de calidad de aguas, su potencial nutricional y producción de sustancias de interés biotecnológico a nivel comercial.^(62, 63) El estudio de los valores óptimos de parámetros de cultivo a escala de laboratorio de la cepa de *C. vulgaris* aislada a partir del embalse Chalón, permitirá un mejor manejo de los cultivos de esta con fines biotecnológicos.

Los resultados obtenidos en función de determinar el valor de pH que permite mejor crecimiento y viabilidad en los cultivos de una cepa local de *C. vulgaris*, se presentan en la figura 2.

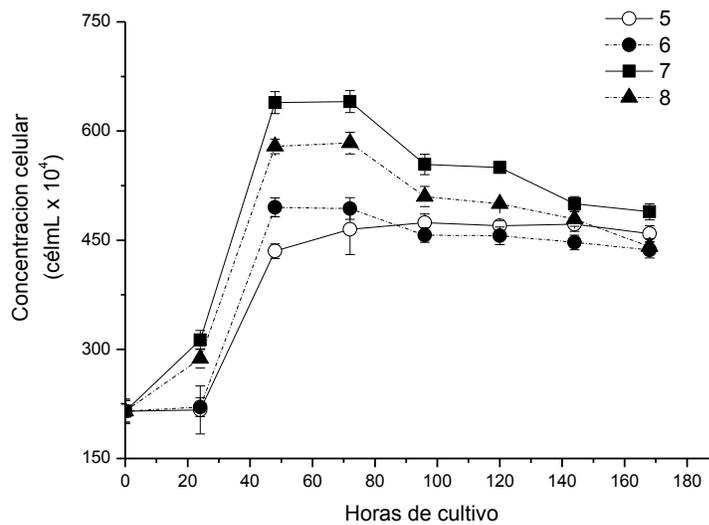


Fig. 2- Variación de la concentración celular con el pH en minicultivos no aireados de *Chlorella vulgaris* establecidos a 3000lx ($58,59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

El crecimiento se constata en todos los cultivos, aparte del valor de pH, lo que indica un amplio rango de tolerancia de la especie; sin embargo, los pH ácidos parecen ralentizar su cinética de crecimiento.

El pH 7 resultó ser la mejor alternativa, ya que permitió una mejor cinética y máximo crecimiento a las 72 h de establecidos los cultivos ($640,5 \pm 1,5 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$), valores diferentes al resto de los cultivos establecidos en el rango de 5 a 8 u de pH ($p=0,05$).

La concentración máxima a pH 5 se obtiene a las 96 h ($474,00 \pm 12 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$), mientras que a pH 6 esta se obtiene a las 72 h con valores similares ($493,50 \pm 15 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$). A pH 8 los valores de crecimiento son mayores que para los valores de pH ácidos, pero significativamente menores que para el pH 7 ($583,5 \pm 11 \times 10^4 \text{ célmL}^{-1}$) (figura 3).

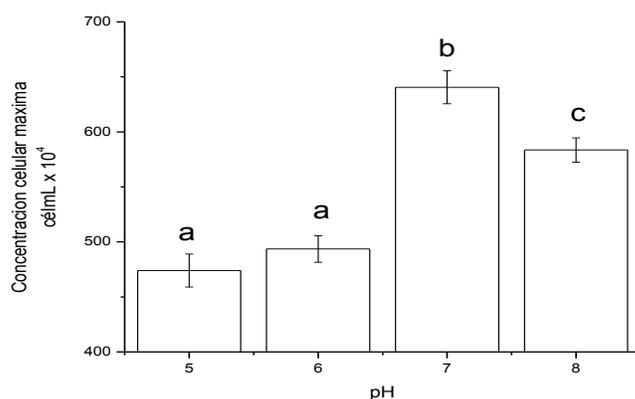


Fig. 3- Variación de la concentración celular máxima con el pH (5 a 8) en minicultivos no aireados de *Chlorella vulgaris* establecidos a 3000lx ($58,59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Letras diferentes corresponden a valores con diferencia estadísticamente significativas ($p=0,05$)

A las 168h, cuando casi todos los cultivos han declinado, aún siguen siendo mayores las concentraciones celulares obtenidas a pH 7 ($p=0,05$).

En cultivos unialgales el pH es un factor de importancia que afecta el crecimiento y la incorporación de amonio del medio, por lo que está estrechamente relacionado con el metabolismo del nitrógeno.⁽²⁾ Algunos autores afirman que cada especie necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo,⁽⁶³⁾ siendo el pH 8 el más indicado para especies dulceacuícolas.⁽⁶⁴⁾ Se ha explicado que por encima o debajo de éste valor, se presenta un descenso en la productividad, que no solo afecta el crecimiento algal, sino también la capacidad de remover el nitrógeno.^(2, 50) Sin embargo, algunos autores explican que, a altas concentraciones de amonio hay descenso del pH y que a valores bajos de este se produce la formación de amonio gaseoso, lo que favorece la existencia de las formas iónicas, que son menos tóxicas para las microalgas.⁽⁶³⁾

Estudios reportados sobre la variación del crecimiento con el pH en el rango de 6 a 9, en una especie de *Chlorella* aislada de una represa en Venezuela, muestra resultados diferentes a los obtenidos en esta investigación. La máxima densidad celular se obtuvo a pH 9 y 8 con valores de concentración de $323,43 \pm 74,18$ y $309,88 \pm 59,79 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$, respectivamente, lo que indica la necesidad de conocer los valores óptimos para cada

especie aislada a partir del medio local, ya que estas se han aclimatado y/o adaptado a condiciones ambientales determinadas y no tienen por qué ser coincidentes los valores óptimos aun siendo la misma especie.

Es importante significar que, el hecho de que esta cepa de *Chlorella* fuese capaz de tolerar condiciones axénicas resulta de interés fisiológico y biotecnológico. En estas condiciones la cepa pudo presentar mecanismos fisiológicos intrínsecos capaces de regular condiciones ambientales, donde su crecimiento se mantuvo en el rango de pH ensayado, lo que indica un nivel de tolerancia importante, a diferencia de otras especies.

Influencia del pH en la viabilidad de *C. vulgaris*

Influencia del pH en la viabilidad de *C. Vulgaris*

Respecto a la viabilidad analizada a través del número de autósporas, obtenidas por recuento diferencial diario, es importante señalar que la reproducción por autósporas es característica de *Chlorella*; esta se realiza cuando las células alcanzan un tamaño máximo, el núcleo se divide en 4 y 8 células pequeñas, idénticas a la célula parental, que son luego liberadas por dehiscencia de la pared de dicha célula.

Los resultados muestran que el pH 7 favorece la formación de autósporas (figura 4). Esta resultó ser máxima a las 24h para los cultivos establecidos a pH 7.

Las concentraciones de clorofila *in vivo* por célula varían en todo el rango ensayado (figura 5). Los valores oscilan entre 0,75 y 1,10 ng de clorofila a por célula, estos tienen una relación directa con el número de células ($r=1$, Kendall, $p=0,05$), siendo mínimos los valores a pH 7, a expensas de un aumento drástico de la concentración celular. A las 168h, los cultivos establecidos a pH 7 presentan la menor concentración de clorofila por célula, lo que pudiera ser indicador de eficiencia fotosintética.

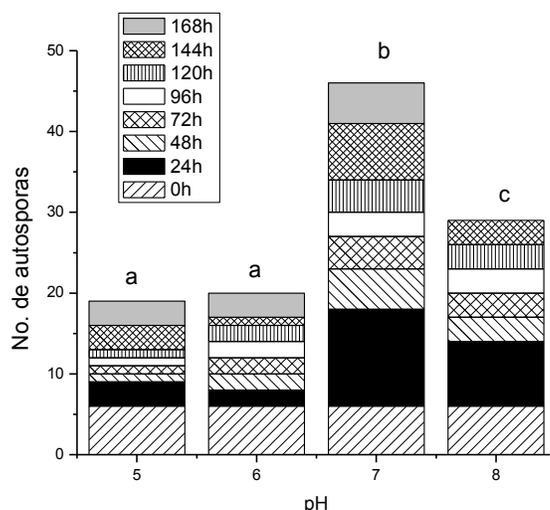


Fig. 4- Variación del número de autósporas con el pH (5 a 8u) durante las 168 h de cultivo (Serie 1: 0h, Serie 2: 24h, Serie 8: 168 h). Letras diferentes corresponden a valores con diferencia estadísticamente significativas ($p=0,05$)

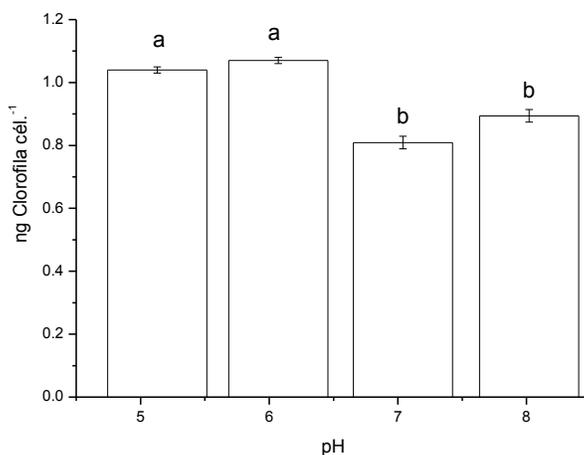


Fig. 5- Variación de la concentración de clorofila *in vivo* por célula a las 168h de cultivo. Letras diferentes corresponden a valores con diferencia estadísticamente significativas ($p=0,05$)

El pH de un cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica, y la eficiencia del sistema de adición de CO_2 .⁽⁶⁶⁾ El pH tiene relación general con la absorción de nutrientes por lo que definir el pH óptimo

de una cepa es relevante para obtener un crecimiento máximo y desarrollar futuras aplicaciones.

El último indicador para el estudio de viabilidad es la tasa de crecimiento máxima, la que se calcula, a partir de la cinética de los cultivos establecidos a diferentes pH (tabla 2).

Los resultados indican que según la comparación de las medias a través del estadígrafo *t* con $p=0,05$, no existen diferencias significativas entre los valores medios obtenidos para la tasa de crecimiento máxima, lo que complementa los resultados obtenidos.

Se puede afirmar que la viabilidad se mantiene en todo el rango ensayado, mostrando la alta tolerancia de la especie al pH (5-8). En el caso de la cepa de *C. vulgaris* estudiada se confirma que el valor que permite mayor crecimiento y viabilidad es el pH 7.

Tabla 2- Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de cultivos expuestos a diferentes valores de pH

pH	$\mu_{\text{máx}}$
5	1,005 \pm 0,002
6	1,107 \pm 0,001
7	1,131 \pm 0,003
8	1,011 \pm 0,004

Validación de los resultados en cultivos de 1L

Los resultados obtenidos fueron validados en cultivos de 1L considerando que el pH del medio de cultivo casi siempre se ajusta a valores de pH 7,5 por lo que se compara la cinética de crecimiento con un cultivo establecido a pH 7, que es el óptimo para la especie según resultados previos (figura 6).

La concentración celular máxima obtenida en los cultivos establecidos a pH 7 fue superior a los cultivos control (5398 \pm 125 $\times 10^4$ célmL⁻¹ vs 4201 \pm 10 $\times 10^4$ célmL⁻¹, confirmándose que es el pH 7 el óptimo para la especie, independientemente del efecto del volumen del cultivo.

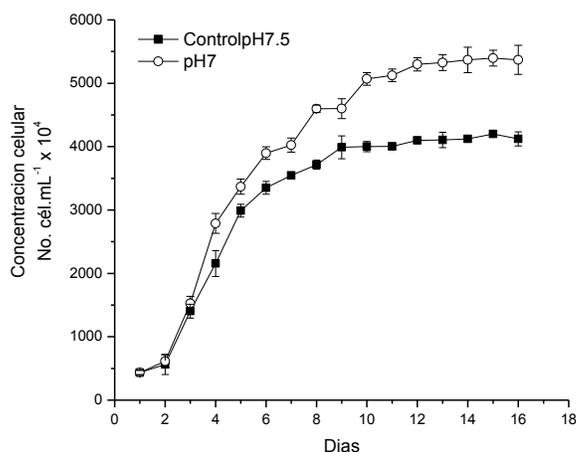


Fig. 6- Cinética de crecimiento en cultivos de 1L establecidos a pH 7 y 7,5 (Control) con la cepa local de *Chlorella vulgaris*

La variación de las condiciones de cultivo, tales como pH, intensidad luminosa, el tipo y concentración de nutrientes, temperatura, fotoperíodo, régimen de cosecha de cultivos discontinuos, continuos o semicontinuos, entre otros ha contribuido a establecer sistemas dirigidos hacia la obtención de biomasa microalgal como fuente para la obtención de valiosos productos para diferentes industrias.

La respuesta de las microalgas al pH varía, debido a que este factor determina la solubilidad del dióxido de carbono y de los minerales en los cultivos e influye directa o indirectamente en su metabolismo; al igual que la temperatura no solo afecta las reacciones celulares, sino también los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, así como la solubilidad de los gases en el agua.^(50, 53)

Las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo; diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Cada microalga presenta un rango de pH óptimo para su cultivo. Un descenso de pH suele ser letal, en cambio soportan mejor los incrementos del pH,^(4, 6) de aquí la importancia de determinar los valores óptimos y la influencia del pH en cada cepa aislada a nivel local con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Conclusiones

La concentración celular máxima y la viabilidad celular en cultivos a escala de laboratorio de la cepa local de *C. vulgaris* objeto de esta investigación, varía con el pH; esta cepa resultó ser tolerante al rango de pH ensayado (5-8); siendo el valor que permite concentraciones celulares máximas y mayor viabilidad en cultivos densos a escala de laboratorio, el pH 7.

Esta microalga autóctona, bajo condiciones axénicas presenta un gran potencial biotecnológico por su capacidad de crecimiento y viabilidad en el intervalo de pH ensayado.

Agradecimientos

Se agradece de forma especial a la Universidad de Islas Baleares y al Proyecto 1 del Macroproyecto VLIR-IUC-USO 1^{ra} fase, gracias a las cuales se desarrolló esta investigación sin limitaciones logísticas.

Referencias bibliográficas

1. SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN C; DURAN E.; ISAMBERT A.. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, **101**(2), pp. 87-96. ISSN: 1389-1723
2. GOMEZ LUNA, L. Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* en Cuba. Tesis de Doctorado, Universidad de La Coruña, España, 1997, pp. 265 ISBN 978-84-692-8147-S
3. OH-HAMA, T.; MIYACHI S. *Chlorella*. En: M.A. BOROWIZKA & L.J. BOROWIZKA eds. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988, pp. 3-26. ISBN: 978-0521323499
4. RICHMOND, A. Large scale microalgal culture and applications. *Progress in Phycological Research*, 1990, **7**, pp. 1-62. ISSN: 0167-8574

5. RICHMOND, A. *Handbook of microalgae culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons eds., 2008, 719 pp. ISBN: 978-0470673898
6. RICHMOND, A. Microalgae culture. *Critical Review of Biotechnology*, 1986, **4**, pp. 369-438. ISSN: 1549-7801
7. FOGG, E. *The flexibility and variety of algal metabolism*. En: ROGERS, L.J. and J.R. GALLON eds. *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*. Oxford: Clarendon Press, 1988, B. pp. 3-12. ISBN: 978-0198542391
8. SAFI, C.; ZEBIB B.; MERAH O.; PONTALIER P.-Y.; *et al.* Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, **35**, pp. 265-278. ISSN: 1364-0321. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
9. ORTIZ-MORENO, M.L.; SANDOVAL-PARRA K.X.; SOLARTE-MURILLO L.V. . *Chlorella ¿un potencial biofertilizante?* *Orinoquía*, 2019, **23**(2), pp. 71-78. ISSN: 0121-3709
10. MORRIS, H.J. *et al.* Composición bioquímica y propiedades bioestimulantes de un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Revista Cubana de Química*, 2001, **13**(3), pp. 28-35. ISSN 2224-5421
11. CLEBER, B.F.; E. SANT'ANNA; B.M. *et al.* Lipids, fatty acid composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Grasas y aceites*, 2006, **57**(3), pp. 270-274. ISSN: 0017-3495
12. MORRIS, H. *et al.* Combinaciones enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 2001, **15**(2), pp. 85-89. ISSN: 1561-2929
13. CAMPOS, A.; P. ARAUJO; C. PINHEIRO; J. AZEVEDO; *et al.* Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, **94**(1), pp. 45-53. ISSN 0147-6513
14. GRIFFITHS, D.J. The accumulation of carbohydrate in *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions. *Annals of Botany*, 1965, **29**(3), pp. 347-357. ISSN: 0305-7364

15. HADJ-ROMDHANE, F.; X. ZHENG; P. JAOUEN; J. PRUVOST; et al. The culture of *Chlorella vulgaris* in a recycled supernatant: Effects on biomass production and medium quality. *Bioresource Technology*, 2013, **132**, pp. 285-292. ISSN/0960-8524
16. DAY, J.G.; E.E. BENSON; R.A. FLECK. *In vitro* culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1999, **35**(2), pp. 127-136. ISSN 1054-5476
17. DE ALENCAR, D.B.; K.M. PIRES-CAVALCANTE; J. P. SABOYA; M.B. DE SOUSA; et al. Contents of beta-carotene in supplements and biomass of *Spirulina*. *Ciencia E Agrotecnologia* [en línea], 2011, **35**(2), pp. 386-391. [Consultado 12 septiembre 2020]. ISSN 1981-1829
18. FÁBREGAS, J.; C. HERRERO. Vitamin content of four marina microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1990, **5**(4), pp. 259-263. ISSN: 1367-5435
19. QUINTANA, M.M.; L. HERNÁNDEZ; H. MORRIS; M. FERNÁNDEZ. Contenido de algunas vitaminas en cultivos de la microalga *Chlorella* sp. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 1999, **13**(1), pp. 9-13. ISSN: 1561-2929
20. MATA, T.M.; A.A. MARTINS; N.S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [en línea], 2009, **14**(1), pp. 217-232. [Consultado 6 septiembre 2020]. ISSN: 1364-0321. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
21. CHISTI, Y. Microalgae as sustainable cell factories. *Environmental Engineering and Management Journal*, 2006, **5**(3), pp. 261-274. ISSN: 2392-9545
22. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* [en línea], 2007, **25**(3), pp. 294-306. [Consultado 4 junio 2020]. ISSN: 0734-9750. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
23. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 2008, **26**(3), pp. 126-131. ISSN: 0167-7799
24. CHISTI, Y.; J. YAN. Energy from algae: current status and future trends: algal biofuels—A status report. *Applied Energy*, 2011, **88**, pp. 3277-3279. ISSN: 0306-2619
25. ROMERO, T.; J. LLANES; S. SÁNCHEZ; D. HERNÁNDEZ. Utilización de la microalga *Chlorella* spp. en la producción de ensilados biológicos. En: *Proceedings of*

the CIVA: II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, 2003, pp. 325-335.
Disponible en: <http://www.civa2003.org>.

26. QUINTANA, M.M.; M. FERNÁNDEZ. Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas. *Medisan*, 2004, **8**(3), pp. 27-31. ISSN 2305-6320.

27. JUANTORENA, A.U.; O. ALFARO; I. SÁNCHEZ; A. A. ALMARALES. Alternativas para el tratamiento del residual porcino. Parte II. *Revista Tecnología Química* [en línea], 2000, **XX**(3), pp. 5-12. [Consultado 2 septiembre 2020]. ISSN 2224-6185

28. BARCLAY, W.R.; K.M. MEAGER; J.R. ABRIL. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 1994, **6**(2), pp. 123-129. ISSN: 1573-5176

29. BRUNEEL, C.; C. LEMAHIEU; I. FRAEYE; E. RYCKEBOSCH; et al. Impact of microalgal feed supplementation on omega-3 fatty acid enrichment of hen eggs. *Journal of Functional Foods*, 2013, **5**(2), pp. 897-904. ISSN: 1756-4646

30. GLADYSHEV, M.I.; N.N. SUSHCHIK; A.A. KOLMAKOVA; G.S. KALACHOVA; et al. Seasonal correlations of elemental and omega 3 PUFA composition of seston and dominant phytoplankton species in a eutrophic Siberian Reservoir. *Aquatic Ecology*, 2007, **41**(1), pp. 9-23. ISSN: 1386-2588

31. LYUKEVICH, A.A.; E.A. MOURADYAN; D.A. LOS. Molecular cloning and stress-dependent expression of a gene encoding omega 3-fatty acid desaturase in the microalga *Dunaliella salina*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2003, **50**(4), pp. 481-486. ISSN: 1021-4437

32. BECKER, A.; A. HERSCHEL; C. WILHELM. Biological effects of incomplete destratification of hypertrophic freshwater reservoir. *Hydrobiologia*, 2006, **559**(1), pp. 85-100. ISSN: 0018-8158

33. BECKER, E.W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, 1994, 293 pp. ISBN: 978-0521350204.

34. BECKER, E.W. *Microalgae for human and animal consumption*. En: BOROWITZKA, M.A. and L.J. BOROWITZKA eds. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1998, pp. 222-256. ISBN: 978-0521323499

35. BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 2007, **25**(2), pp. 207-210. ISSN: 0734-9750

36. SIVALINGAM, P. Evaluation of nutritive values of SCP *Chlorella vulgaris* propagated in palm oil mill effluent shed. *Journal of Phycology* [en línea], 1983, **31**, pp. 71-75. [Consultado 12 septiembre 2020]. ISSN: 1529-8817
37. ADRIAN-ROMERO, M.; G. BLUNDEN; B.G. CARPENTER; E. TYIHAK. HPLC quantification of formaldehyde, as formaldemethone, in plants and plant- like organisms. *Chromatographia*, 1999, **50**(3-4), pp.160-166. ISSN: 0009-5893
38. RAMOS, R.; PIZARRO, R. Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* [en línea], 2018, **53**(1), p. 75-86. [Consultado 12 diciembre 2020]. ISSN 0718-1957. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572018000100075>
39. MUJTABA, G.; LEE, K. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. *Water research*, 2017, **120**, pp. 174-184. ISSN: 0043-1354. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.078>
40. CHACÓN, C.; C. ANDRADE; C. CÁRDENAS; I. ARAUJO, et al. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. para la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas en Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* [en línea], 2006, **38**(2), pp. 94-108. [Consultado 14 noviembre 2020]. ISSN: 2477-9458
41. XU, H.; X. MIAO; Q. WU. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology* [en línea], 2006, **126**(4), pp. 499-507. [Consultado 14 noviembre 2020]. ISSN: 0168-1656
42. DEMIRBAS, A. Production of biodiesel from algae oils. *Energy Sources Part A: Recovery, Utilization & Environmental Effects* [en línea], 2009, **31**(2), pp. 163-168. [Consultado 14 noviembre 2020]. ISSN 1556-7230. <https://doi.org/10.1080/15567030701521775>
43. MONTERO-SÁNCHEZ, Y.; A. GALLO; L.M. GOMEZ; I. ÁLVAREZ, et al. Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. *Investigación y Saberes*, 2012, **1**(2), pp. 37-43. ISSN: 1390-8146
44. LAKANIEMI, A.-M.; C.J. HULATT; D.N. THOMAS; O.H. TUOVINEN, et al. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, **4**(1), p. 34. ISSN: 1754-6834

45. ALVEAR-ALAYÓN, M.R.; C.R. CASTILLO-SALDARRIAGA; D.L. HENAO; L.P. ARGUMEDO; A. TEJEDA. Evaluación del pH y concentración de Nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chorella* nativa como fuente de aceite vegetal para la producción del biodiesel. Tesis de Doctorado, Universidad de Cartagena, 2011, Cartagena de Indias, Colombia. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11227/121>.
46. FENG, P., *et al.* Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp. GN1 outdoors. *Bioresource Technology* [en línea], 2020, **301**, p. 122762. [Consultado 9 enero 2021]. ISSN: 1873-2976. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122762>.
47. GOMEZ-LUNA, L.; I. ÁLVAREZ; R. RIVERO. Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2011, **13**(2), pp. 27-38. ISSN: 0123-3475.
48. SILVEIRA-FONT, Y.; L. GÓMEZ-LUNA; M. KUFUNDALA-WEMBA; D. SALAZAR-HERNÁNDEZ; *et al.* Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck con la aplicación del campo magnético estático. *Revista Cubana de Química*, 2018, **30**(1), 54-67. ISSN 2224-5421
49. WANG, H-Y; *et al.* Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society* [en línea], 2008, **29**(1), pp. 39-46. [Consultado 9 julio 2020]. ISSN 1521-186X
50. ABALDE, J.; A. CID; P. FIDALGO; E. TORRES; *et al.* *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidade da Coruña, Servizo de Publicacións. 1995, 210 pp. ISBN: 978-84-97497-69-5. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
51. OROSA, M.; E. TORRES; P. FIDALGO; J. ABALDE. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, 2000, **12** (3-5), pp. 553-556. ISSN: 1573-5176
52. POSTEN, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering Life Science* [en línea], 2009, **9**(3), pp. 165-177. [Consultado 9 noviembre 2020]. ISSN: 1618-2863
53. MORONTA, R.; R. MORA; E. MORALES. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas.

- Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia*, 2006, **23**(1), pp. 27-41. ISSN: 0378-7818
54. VENKATARAMAN, G. Algalization. *Phykos*, 1966, **5**(1), pp.748-749. ISSN:0554-1182
55. VENKATARAMAN, R. and T. RAMANUJAM. A study on microbiology of biological film layer in rotating biological contactors. *Bioprocess Engineering*, 1998, **18**(3), pp.181-186. ISSN: 2578-8698.
56. FUGGI, A.; V.D. RIGANO; V. VONA; C. RIGANO. Nitrate and ammonium assimilation in algal cell-suspensions and related pH variations in the external medium, monitored by electrodes. *Plant Science Letters*, 1981, **23**(2), pp.129-138. ISSN: 0304-4211
57. CASÁ, N. E., *et al.* Optimización de la concentración de inóculo y pH del medio de cultivo, para aumentar la producción de *Chlorella vulgaris* en suero de ricota. *AJEA* [en línea], 2020, no 5. [Consultado 1 Noviembre 2020]. ISSN: ISBN 978-950-42-0200-4. <https://doi.org/10.33414/ajea.5.783.2020>
58. LECINA, M., *et al.* Optimization of ferric chloride concentration and pH to improve both cell growth and flocculation in *Chlorella vulgaris* cultures. Application to medium reuse in an integrated continuous culture bioprocess. *Bioresource technology* [en línea], 2016, **216**, p. 211-218. [Consultado 22 diciembre 2020]. ISSN: 1873-2976. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.063>
59. GOMEZ-LUNA, L.; J. MENÉNDEZ; I. ÁLVAREZ; I. FLORES. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. *Bioteología Vegetal* [en línea], 2009. **9**(2), pp.105-117. [Consultado 7 octubre 2020]. ISSN 1609-1841
60. GINZBURG, M. *Dunaliella*: A green alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research*, 1987, **14**, pp. 93-183. ISSN: 00652296. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60271-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60271-2)
61. RODRÍGUEZ-TITO, J.C.; L.M. GOMEZ-LUNA. Estado trófico de 24 embalses de agua en el oriente de Cuba. *Revista Cubana de Química* [en línea], 2020, **32**(1), pp. 136-153. [Consultado 13 septiembre 2020]. ISSN 2224-5421

62. HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.; J.I. LABBÉ. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* [en línea], 2014, **49**(2), pp. 157-173. [Consultado 1 octubre 2020]. ISSN: 0718-3326. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
63. MORA, R.; R. MORONTA; J. ORTEGA; E. MORALES. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Ciencia Completa* [en línea], 2004, **12**(2), pp. 1-9. [Consultado 13 septiembre 2020]. Disponible en:http://www.revencty.ula.ve/storage/repo/ArchivoDocumento/cienc/v12n2/art_01.pdf
64. PARK, J.; R. CRAGGS; A. SHILTON. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 2011, **102**(1), pp.35-42. ISSN: 09608524

Conflicto de interés

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses

Contribución de los autores

Liliana María Gómez Luna: participó en la concepción general de la investigación, en la definición de los métodos y técnicas. Aisló y mantuvo viable la cepa de *Chlorella vulgaris*. Participó en el desarrollo de la parte experimental, en la obtención y procesamiento de la data experimental, y en el análisis y discusión de resultados. Concibió, estructuró y escribió el artículo científico.

Yadenis Ortega Díaz: contribuyó al mantenimiento de la cepa de *C. vulgaris*. Participó en el desarrollo de la parte experimental, en la obtención y procesamiento de la data experimental, y en el análisis y discusión de resultados. Contribuyó en la escritura del artículo científico.

Lilisbet Tormos Cedeño: participó en el desarrollo de la parte experimental. Realizó una revisión sistemática que facilitó la escritura del artículo científico. Contribuyó en la escritura del artículo científico.