

# CHLORELLA VULGARIS: COMPOSICIÓN Y CULTIVO DE UNA MICROALGA COLECTADA EN EL URUGUAY

M. Sc. T. Pagano, Dr. J. Coll y Dra. M. A. Grompone  
Facultad de Química

## ABSTRACT

**I**n spite of microalgae importance in the fatty acids field, there has been no review of the lipid composition of native Uruguay flora. The objective of this work is to compare the composition of the *Chlorella vulgaris* biomass collected at a sewage treatment pool with the biomass of laboratory cultures prepared from a starter of the first. Adaptation possibilities and biomass modification were thus determined to find an application field for wasted natural resource.

Laboratory cultures were carried out under different lighting (continuous and 16:8 photoperiod), and with different nitrogen sources ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , and urea) at different concentrations. The results showed that, in order to favour the polyunsaturated acids content, nitrogen should be supplied in a molecular form of difficult assimilation (urea), and with discontinuous lighting.

As a general conclusion, it can be said that in the case of *Chlorella vulgaris* isolated in Uruguay, the lipid content of the biomass and its fatty acid composition depend on culture conditions and the stage of development. Particularly, samples collected **in natura** do not show the same values as the cultured **in vitro**. So it is possible to modify the conditions to achieve variations that may increase productivity of special fatty acids.

## RESUMEN

**A** pesar de la importancia actual de las microalgas en el ámbito de los ácidos grasos, no existe en el Uruguay un relevamiento de la composición lipídica de las autóctonas. El objetivo de este trabajo es comparar la composición de la biomasa de *Chlorella vulgaris* colectada en una pileta de tratamiento de efluentes con la de los cultivos realizados en el laboratorio, a partir de un inóculo preparado de aquella. De esta manera se pudo determinar la posibilidad de adaptación y modificación de la biomasa, a los efectos de encontrar distintos campos de aplicación de un recurso natural que actualmente se descarta.

Dichos cultivos se realizaron con diferentes iluminaciones (luz continua y fotoperíodos 16:8) y con distintas fuentes de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$  y urea) a diferentes concentraciones. De ello se deduce que para favorecer el contenido en ácidos grasos poli-insaturados de la biomasa es necesario aportar el nitrógeno bajo formas moleculares de difícil asimilación (urea) y con iluminación discontinua.

Como conclusión general se puede decir que en el caso de la *Chlorella vulgaris* aislada en el Uruguay, el contenido de lípidos de la biomasa y su composición en ácidos grasos dependen de las condiciones de cultivo y de la etapa de desarrollo en la que éste se encuentre. En particular, lo colectado **in natura** no presenta los mismos valores que lo cultivado **in vitro**. En consecuencia, es posible modificar las condiciones de cultivo a los efectos de producir determinadas variaciones como para aumentar su productividad en ciertos ácidos grasos.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un grupo grande y diversificado de microorganismos acuáticos que fijan el CO<sub>2</sub> atmosférico por fotosíntesis y que se consideran fuentes importantes de proteínas. También se las reconoce como fuentes primarias de ciertos compuestos de significancia nutricional o farmacéutica para el ser humano. Por ejemplo, muchas especies producen cantidades significativas de ácidos grasos poli-insaturados de la familia  $\omega$ -3 tales como ácido eicosapentaenoico 20:5 (EPA) y docosahexaenoico 22:6 (DHA). Normalmente estos ácidos grasos se incorporan en nuestra dieta a través de los pescados y frutos de mar, pero ellos los obtienen, a su vez, de las microalgas de su ingesta. Algunas especies de microalgas también producen cantidades significativas de triacilgliceroles, como energía de reserva, además de los ácidos grasos poli-insaturados de la familia  $\omega$ -3. Por ejemplo, algunas diatomeas pueden contener 30-50% de lípidos (en base seca), cuyo principal componente

es el EPA (Kyle y Ratledge, 1992).

La composición química de las microalgas depende, en gran medida, del grupo taxonómico (de la Clase, del Género y de la Especie) a la que pertenecen. Sin embargo, en algunos grupos (por ejemplo, las algas verdes) ésta puede ser alterada por las condiciones de cultivo (temperatura, iluminación, nutrimentos).

Si bien las microalgas suelen contener un bajo porcentaje de lípidos totales (0.5 a 1.5% en base húmeda) y un alto contenido en humedad (70-90%), sus cultivos pueden dar rendimientos de 100 toneladas de materia seca por hectárea por año; un rango típico es 15-25 gramos de biomasa seca por m<sup>2</sup> por día. Su rendimiento en proteínas puede ser de 5.5-40 gramos por m<sup>2</sup> por día. En la Tabla 1 se comparan las producciones de algunos cultivos agrícolas con las de dos microalgas, *Spirulina platensis* y *Spirulina maxima*, así como sus rendimientos en proteínas (Kay, 1991).

**Tabla 1:** Comparación de las producciones de algunos cultivos agrícolas con las de dos microalgas.

cultivo	producción (ton/hectárea/año)	contenido en proteínas %	proteínas (ton/hectárea/año)
trigo	6.7	9.5	0.64
maíz	14.0	7.4	1.04
arroz (con cascarilla)	8.0	7.1	0.57
soya	4.0	35.0	1.4
<i>S. platensis</i>	60-70	65.0	39-45
<i>S. máxima</i>	40.0	70.0	28.0

El rendimiento en aceite de las microalgas es del orden de 26 000 litros por hectárea al año (entre 4 y 13 gramos por m<sup>2</sup> por día), lo cual excede, en valores absolutos, la producción de la mayoría de las oleaginosas. Por ejemplo, el rendimiento de la soya es del orden de 2.5 gramos de semillas por m<sup>2</sup> por día y menos de 1 gramo de aceite por m<sup>2</sup> por día; para la palma es de unos 8 gramos de frutos por m<sup>2</sup> por día y de unos 2 gramos de aceite por m<sup>2</sup> por día (Ratledge, 1987; Ackman, 1981; Kyle, 1991;

Kyle y Ratledge, 1992).

Actualmente hay empresas comerciales que producen biomasa para consumo humano. Hace unos pocos años la producción mundial de *Spirulina* era de 1500 toneladas anuales y la de *Chlorella* de 700 toneladas; también se preveía que la de *Dunaliella salina* superaría las 1000 toneladas. Hay firmas comerciales que se dedican a la obtención de ácidos grasos poli-insaturados a partir de biomasa

microalgal: Cell Systems Ltd. (Reino Unido) extrae EPA y DHA de *Tetraselmis sp.* y Martek (USA) produce biomasa rica en DHA y EPA a partir de *Isochrysis*, *Nannochloropsis* y *Nitzschia*. También se han realizado numerosas investigaciones acerca de la obtención de ácido  $\omega$ -linolénico (GLA) a partir de *Spirulina* y de *Chlorella*.

Uno de los usos más frecuentes de las microalgas se encuentra en el cultivo de invertebrados marinos en cautiverio, principalmente los organismos filtradores que por ser omnívoros, sus estadios larvarios dependen básicamente del plancton. También se ha extendido al cultivo de camarones Peneidos, los que requieren, como tantos otros crustáceos, fitoplancton como alimento durante los primeros estadios larvarios. Pero el uso de microalgas no se limita a la maricultura de invertebrados. Por ejemplo, el mercado japonés de pescados se ha extendido rápidamente y como consecuencia de ello, hay una demanda importante de ejemplares juveniles. Estos requieren zooplancton (especialmente copépodos y rotíferos) como alimento, lo que ha hecho que se desarrollará, a su vez, el cultivo de microalgas tales como *Nannochloropsis oculata* (también llamada *Chlorella* marina) para su cultivo así como una mezcla consistente en una *Chlorella* de agua dulce y una *Nannochloropsis* marina (Kyle y Ratledge, 1992; Shamsudin, 1992).

El empleo de las microalgas también se ha extendido a las raciones para animales. Por ejemplo, se han realizado extensos estudios sobre el empleo de

*Spirulina platensis* en la alimentación de aves y cerdos. Es interesante su uso como complemento de raciones para gallinas ponedoras debido a su alto contenido en GLA y en carotenos, el que permite modificar la composición lipídica de la yema de los huevos (Ross y Dominy, 1990).

A pesar de la importancia actual de las microalgas en el ámbito de los ácidos grasos, no existe en el Uruguay un relevamiento de la composición lipídica de las autóctonas. Debido a ello, en el **Laboratorio de grasas y aceites** (perteneciente a la Cátedra de Fisicoquímica de la Facultad de Química) hace unos años se inició una línea de trabajo con microalgas, el que cuenta con el asesoramiento del Dr. Javier Coll (de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Química). En el año 1996 se completó la Tesis de Maestría en Química de Teresa Pagano titulada "*Composición lipídica de microalgas autóctonas del Uruguay e influencia de las condiciones de cultivo*", de la cual se extrajo el presente trabajo sobre *Chlorella vulgaris*, una microalga dulceacuícola de la familia Chlorellaceae. El objetivo de éste fue comparar la composición de la biomasa colectada en una pileta de tratamiento de efluentes con la de los cultivos realizados en el laboratorio, a partir de un inóculo preparado de aquélla. De esta manera se pudo determinar la posibilidad de adaptación y modificación de la biomasa, a los efectos de encontrar distintos campos de aplicación de un recurso natural que actualmente se descarta.

## DORTAN S.A.

*Insumos industriales*



ANDES 1365 esc. 303  
Tels.: 908 08 05 - 902 45 90  
Fax: (00 598 2) 902 08 89  
P.P. Box 6153  
E-Mail dortan@multi.com.uy

- \* EQUIPOS PARA MOVIMIENTO Y CONTROL DE FLUIDOS
- \* BOMBAS, CAÑERIAS, VALVULAS, FITTINGS
- \* MEDIDORES Y SENSORES INTELIGENTES DE FLUJO, PRESIÓN Y TEMPERATURA.
- \* AUTOMATIZACIÓN DE PROCESOS
- \* COMPRESORES, AGITADORES, FILTROS,
- \* MOTORES, GENERADORES, TRANSFORMADORES
- \* REPUESTOS, REPARACIONES, MANTENIMIENTO

## COLECTA Y ANÁLISIS DE LA BIOMASA

Las muestras de biomasa microalgal fueron colectadas en una pileta facultativa del sistema de depuración de aguas residuales de un establecimiento industrial, durante los meses de junio, setiembre y noviembre. Dichas aguas contenían desechos orgánicos derivados de la producción de raciones para animales (harina de carne y de huesos). La empresa posee tres piletas, las dos primeras anaeróbicas y las tercera facultativa. La toma de muestra se realizó sobre la salida de esta última, donde es netamente aeróbica y existen las condiciones más adecuadas para el crecimiento de microalgas.

La biomasa colectada resultó ser prácticamente monoalgal; ésta fue identificada como *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae), de acuerdo con la bibliografía especializada al respecto. Dicha microalga ya había sido citada como existente en el Uruguay (Coll, 1979).

A las biomásas colectadas se les determinó el peso seco a 105°C (expresado como gramos por 100 gramos de biomasa centrifugada y lavada), la composición en ácidos grasos de los lípidos (determinada por cromatografía de gases y expresada como gramos por 100 gramos de ácidos grasos totales) y el contenido en proteínas (expresado en gramos por 100 gramos de biomasa seca y determinado por el método de Kjeldahl). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Composición de las muestras de biomasa colectadas en una pileta facultativa del sistema de depuración de aguas residuales de una empresa industrial.

	Junio	Setiembre	Noviembre
% peso seco	15.0	16.3	16.8
% proteínas	8.7	8.0	8.5
<b>Acidos grasos:</b>			
16:0	40.7	44.3	42.5
16:1	5.8	6.9	6.3
16:2	5.3	5.9	6.2
16:3	4.2	4.5	3.5
18:0	7.1	6.2	6.8
18:1	15.8	16.5	17.4
18:2	5.3	4.2	4.8
18:3 $\omega$ -6	1.5	2.2	1.8
18:3 $\omega$ -3	-	1.3	1.6

La composición de la biomasa en los meses colectados se mantuvo aproximadamente constante (durante los meses más fríos del invierno la biomasa prácticamente desaparece), siendo su contenido en ácidos grasos saturados del orden del 54%, en mono-insaturados del orden del 25% y en poli-insaturados del orden del 21%. Este alto contenido en ácidos grasos insaturados puede ser interesante para el empleo de la biomasa en raciones para animales. Por otra parte, como el contenido lipídico

de las microalgas y su composición en ácidos grasos puede ser modificado por técnicas adecuadas de estrés, se hicieron cultivos de laboratorio bajo diferentes condiciones de iluminación y de aportes de nitrógeno.

En la bibliografía (Mitsu *et al.*, 1989) se encuentra información sobre las composiciones lipídicas de dos *Chlorella vulgaris* de agua dulce, las que difieren considerablemente de la determinada para



la colectada en Uruguay. Por ejemplo, el contenido en 18:2 es de 34-36% frente al 5.2% de la de este trabajo.

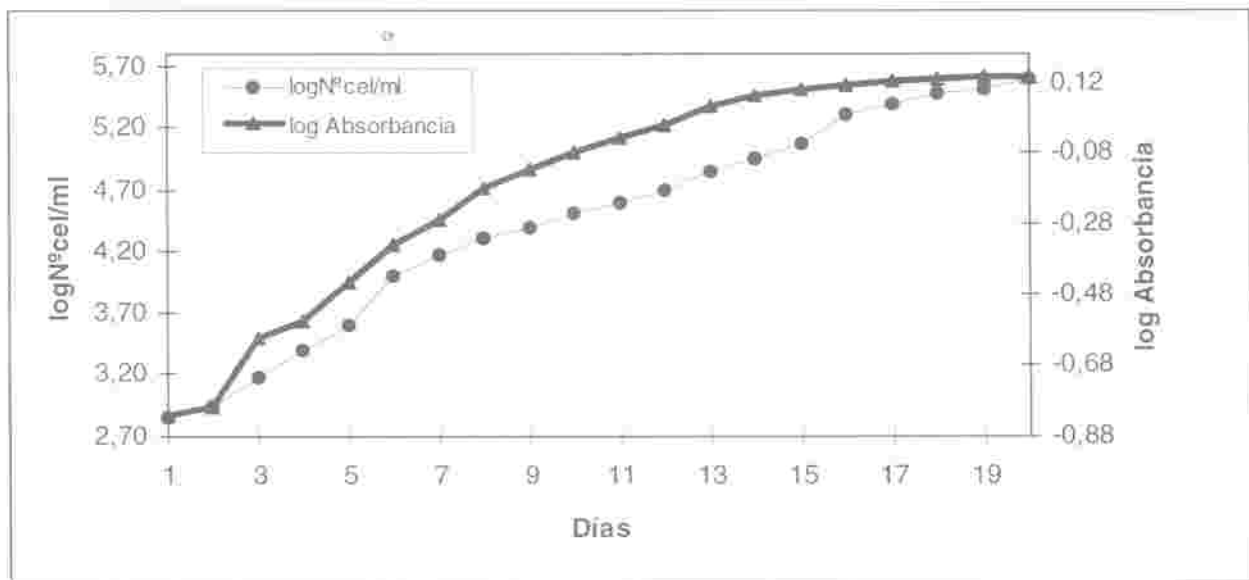
### CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE LABORATORIO.

Para estudiar el crecimiento en condiciones de laboratorio, los cultivos se desarrollaron colocando un inóculo de 5 ml (de concentración  $5 \times 10^3$  células/ml) en un frasco de 1 litro que contenía 500 ml de medio ISO 8692, manteniendo la temperatu-

ra en 28°C, iluminando con luz continua (cuyo espectro se encuentra en el rango de la luz visible) con un flujo total de 2.2 Klux y con un burbujeo de aire de 800 ml/min.

Se estudió la curva de crecimiento de la biomasa midiendo el número de células presentes por ml de cultivo y la absorbancia del cultivo a 540 nm (longitud de onda que da una buena correlación con la densidad de la población). Dichas curvas se muestran en la Gráfica 1.

Gráfica 1: Curvas de crecimiento del cultivo de laboratorio de *Chlorella vulgaris*, en medio ISO 8692, a 28°C y con luz continua.



En dichas curvas se puede definir un primer período de latencia o inducción de unas 48 horas (medidas a partir de la inoculación) y una fase de crecimiento exponencial de unos 13 días (días 3 al 16), antes de que se observe un cambio importante de pendiente (meseta o fase estacionaria). Como fase final de muerte se tomó la correspondiente al cambio de color del cultivo (de verde a marrón), la que se debe, casi exclusivamente, al agotamiento de los nutrientes del medio inicial, ya que nunca se

hizo una reposición de ellos.

Como la composición en ácidos grasos varía durante el desarrollo del cultivo, en la Tabla 3 se resume dicha composición para muestras colectadas: a) a los 13 días de comenzada la etapa exponencial, o sea, 15 días a partir del inóculo; b) 5 días después, o sea, en la fase estacionaria de crecimiento; c) 5 días después, cuando se produjo el cambio de coloración.

**Tabla 3:** Composición en ácidos grasos para muestras colectadas en la fase exponencial de crecimiento, en la estacionaria y en la de muerte.

ácidos grasos	fase exponencial	fase estacionaria	fase de muerte
% saturados	53.7	70.9	70.2
% monoenos	29.3	22.1	19.7
% polienos	17.0	7.0	10.1

Al final de la fase exponencial de crecimiento se obtuvo la mayor cantidad de biomasa y el mayor contenido de ácidos grasos poli-insaturados. En consecuencia, para estudiar la influencia de los factores ambientales, se realizaron colectas a los 13 días de comenzada la fase exponencial (es decir, 15 días a partir del inóculo).

### **CULTIVOS DE LABORATORIO BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ.**

Los cultivos con luz continua se compararon con otros realizados con ciclos de luz, con un fotoperío-

do de 16 horas de luz (con una intensidad de 2.2 Klux) y 8 horas de oscuridad, manteniendo las otras condiciones ambientales iguales (28°C, medio ISO 8692 y burbujeo de aire). En la Tabla 4 se comparan los resultados de los análisis de la biomasa colectada a los 15 días de desarrollo de dichos cultivos (éste contenido se expresa como los gramos de biomasa seca por litro de cultivo) con los de la biomasa de la pileta de tratamiento de efluentes.

**Tabla 4:** Análisis de los cultivos realizados con luz continua y con fotoperíodos 16:8 (ambos a 28°C y con medio ISO 8692) y de la biomasa colectada en la pileta de tratamiento de efluentes.

	pileta de tratamiento de efluentes	laboratorio: luz continua	laboratorio: ciclos 16:8
biomasa (g/l)		3.5	5.0
% peso seco	8.0	9.0	4.5
% proteínas	16.3	17.2	21.3
ácidos grasos:			
% saturados	53.5	78.8	56.1
% monoenos	25.2	6.1	29.3
% polienos	21.3	15.1	14.6

El pasar de luz continua a ciclos con fotoperíodos 16:8 provoca una disminución en el porcentaje de los ácidos grasos saturados (valor similar al de la muestra natural de la pileta de tratamiento de efluentes) así como un aumento en la biomasa total del cultivo.

### **CULTIVOS DE LABORATORIO CON DIFERENTES MEDIOS DE CRECIMIENTO.**

Para tratar de incrementar aún más el contenido en

ácidos grasos poli-insaturados, se realizaron modificaciones en el aporte de nitrógeno del medio de cultivo (manteniendo constantes los otros factores ambientales: 28°C, ciclos de luz 16:8 y burbujeo de aire). Las colectas se efectuaron a los 15 días de inoculados los cultivos.

El medio ISO 8692 contiene 15 mg/l de NH<sub>4</sub>Cl, lo que equivale a 6 mg/l de nitrógeno. Se hicieron cultivos con este medio modificado de diferentes maneras. Una de las modificaciones consistió en reducir a la mitad su contenido en NH<sub>4</sub>Cl (7.5 mg/

l). Otras variaciones consistieron en aportar la misma cantidad de nitrógeno pero bajo compuestos diferentes: a) 24.4 mg/l de  $KNO_3$  (en vez de 15 mg/l de  $NH_4Cl$ ) y b) 17 mg/l de urea (en vez de 15 mg/l de  $NH_4Cl$ ).

Para poder comparar los cultivos respecto a su capacidad de producción de ácidos grasos poli-insaturados se definió un parámetro, llamado **Productividad (P)**, como el producto de la cantidad de biomasa (formada a los 15 días de inoculados los cultivos) por su contenido en lípidos totales y por el contenido en ácidos grasos de éstos. La Producti-

vidad queda así determinada como los gramos de ácidos grasos poli-insaturados que se pueden extraer de 1 litro de cultivo (luego de pasados los primeros 15 días de su desarrollo).

Los resultados de los análisis realizados sobre los cultivos mencionados anteriormente así como su Productividad en ácidos grasos poli-insaturados se informan en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Cultivos realizados con medio ISO 8692 y sus modificaciones: a) con 7.5 mg/l de  $NH_4Cl$ ; b) con 24.4 mg/l de  $KNO_3$ ; c) con 17 mg/l de urea.

	15 mg/l $NH_4Cl$	7.5 mg/l $NH_4Cl$	24.4 mg/l $KNO_3$	17 mg/l urea
biomasa (g/l)	5.0	3.2	4.0	7.0
% peso seco	4.5	4.2	4.7	4.8
% proteínas	21.3	20.0	22.7	20.5
% lípidos	12.6	15.0	13.7	15.8
<b>ácidos grasos:</b>				
% saturados	56.1	59.2	51.0	34.1
% monoenos	29.3	14.7	32.7	32.8
% polienos	14.6	26.1	16.2	33.1
<b>Productividad (g/l)</b>	0.09	0.13	0.09	0.37

De las modificaciones realizadas en el medio ISO 8692 se concluye que la disminución en el aporte de nitrógeno bajo forma de  $NH_4Cl$  provoca un descenso en la biomasa total y un pequeño aumento en su contenido en lípidos y en polienos. Esto

conduce a que la productividad en ácidos grasos poli-insaturados aumenta ligeramente. Cuando se sustituye todo el  $NH_4Cl$  por  $KNO_3$  no se obtienen mejoras en la Productividad pero cuando se le cambia por urea, ésta se hace cuatro veces mayor



**Electroquímica**  
Sociedad Anónima

**MAS DE 50 AÑOS DE EXPERIENCIA  
EN DESINFECCION Y LIMPIEZA**

☞ HIPOCLORITOS DE SODIO ☞ DETERGENTES  
☞ LIMPIADORES ☞ PRODUCTOS ESPECIALES

---

Electroquímica S.A. - Magariños Cervantes 1944 - Tels.: 487 05 12 - 487 12 12 - Fax: (598 2)-487 50 47  
Montevideo - Uruguay  
E-mail: prodquim@electroquimica.com - INTERNET: http://www.wlwctroquimica.com

(debido a un aumento simultáneo de sus tres factores constitutivos: biomasa total, contenido en lípidos y contenido en polienos). De ello se deduce que para favorecer el contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la biomasa es necesario aportar el nitrógeno bajo formas moleculares de difícil asimilación.

En la bibliografía (Iriarte y Butriago, 1991) se encuentran estudios de la influencia de la fuente de nitrógeno y de su concentración en el crecimiento de una *Chlorella sp.* de agua dulce, cultivada en medio Walne. Al contrario de los resultados obtenidos en este trabajo, los mencionados autores no obtuvieron crecimiento del cultivo cuando utilizaron urea aunque encontraron que una deficiencia de nitrógeno generaba un cambio de coloración hacia el amarillo.

## CONCLUSIONES

Como conclusión general se puede decir que en el caso de la *Chlorella vulgaris* aislada en el Uruguay, el contenido de lípidos de la biomasa y su composición en ácidos grasos dependen de las condiciones de cultivo y de la etapa de desarrollo en la que éste se encuentre. En particular, lo colectado *in natura* no presenta los mismos valores que lo cultivado *in vitro*. En consecuencia, es posible modificar las condiciones de cultivo a los efectos de producir determinadas variaciones como para aumentar su productividad en ciertos ácidos grasos.

Esta microalga es sencilla de cultivar ya que, aún en una pileta natural de tratamiento de efluentes y a la temperatura de algunos meses del invierno uruguayo, se presenta bajo forma de cultivos prácticamente monoalgales, de gran crecimiento. Debido a ello, podría ser interesante su utilización, por ejemplo, como complemento de raciones para animales.

## BIBLIOGRAFIA

Ackman, R. G. (1981): "Algae as sources for edible lipids", capítulo 15, págs. 189-220, del

libro "New sources of fats and oils" editado por E. H. Pryde, L. H. Princen y K. D. Mujherjee. - American Oil Chemists' Society, Champaign (USA)

Coll, J. (1979) "Catálogo de algas citadas para Uruguay", Eds. SHOMA & UNESCO, Montevideo, Uruguay

Iriarte, F. y E. Butriago (1991): "Determinación de la concentración y fuentes óptimas de nitrógeno en cultivos de *Chlorella sp.* usados como inóculos de cultivos masivos".- Memorias de la Sociedad de Ciencias Naturales de La Salle, N° 198: 39-45

Kay, R. A. (1991): "Microalgae as food and supplement".- *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **30** (6) :555-573

Kyle, D. J. and C. Ratledge, editores (1992): "Industrial applications of single cell oils".- American Oil Chemists' Society, Champaign (USA)

Kyle, D. J. (1991): "Specialty oils from Microalgae: new perspectives", capítulo 8, págs. 130-143 del libro "Biotechnology of plant fats and oils", editado por J. Rattray.-American Oil Chemists' Society, Champaign (USA)

Mtsu, K., A. Shigeru and S. Sato (1989): "Lipids of Marine Plants", Cap. 10, Vol. II, del libro "Marine Bogenic Lipids, Fats and Oils", editado por R. Ackman.- CRC Press, USA

Ratledge, C. (1987): "Lipid technology: a wonderland for the microbial physiologist".- *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **64** (12): 1647-1656

Ross, E. and W. Dominy (1990): "The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (*Spirulina platensis*) for poultry". *Poultry Sci.* **69** : 794-800

Shamsudn, L. (1992): "Lipid and fatty acid composition of microalgae used in Malaysian aquaculture as live food for the early stage of penaeid larvae". *J. Appl. Phycology* **4**: 371-378.