

ARTÍCULO ORIGINAL

EFFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE CO₂, OBTENIDO DE VALVAS DE *Argopecten purpuratus* "CONCHA DE ABANICO", EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *Tetraselmis suecica* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

EFFECT OF THREE CONCENTRATIONS OF CO₂ OBTAINED FROM LEAFLETS *Argopecten purpuratus* "CONCHA DE ABANICO" IN *Tetraselmis suecica* POPULATION GROWTH UNDER LABORATORY CONDITIONS

Juan Merino-Moya*, Flor Alva-López, Amada Román- Ramos & Sorayda Mendoza- Espinoza
Laboratorio de Cultivo de Especies Auxiliares. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú.
E-mail: fmerino@uns.edu.pe*

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de tres concentraciones del CO₂ (1, 5 y 10 %) obtenido de valvas de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" en el crecimiento poblacional de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio, utilizándose el diseño experimental completamente al azar. Todos los cultivos fueron fertilizados con el medio Guillard. Los resultados permiten establecer una relación directa entre la dosificación de CO₂ y la disminución del pH y el mejor incremento de biomasa se obtuvo con el tratamiento al 10% de CO₂, aunque sin mostrar diferencias estadísticas significativas con valores de 210, 220.23, 249 y 250 mg L⁻¹ para los cultivos dosificados con 0, 1, 5 y 10 % de CO₂, respectivamente. Las mayores dosificaciones de CO₂, al parecer, no afectan la fisiología fotosintética e incrementan su disipación por desorción de los cultivos algales.

Palabras claves: *Tetraselmis*, CO₂, crecimiento algal.

ABSTRACT

In this paper the effect of three concentrations of CO₂ was evaluated (1, 5 and 10%) obtained from leaflets *Argopecten purpuratus* "scallops" on the population growth of *Tetraselmis suecica* in laboratory conditions, completely experimental design used to randomly. All cultures were fertilized with Guillard medium. The results indicate a direct relationship between the dosage of CO₂ and decreasing pH and the best increase in biomass was obtained with treatment 10% of CO₂, but not show statistically significant differences with values of 210, 220.23, 249 and 250 mg L⁻¹ for crops dosed with 0, 1, 5 and 10% of CO₂, respectively. The higher doses of CO₂, apparently not affect the photosynthetic physiology and increase its dissipation by desorption of algal cultures.

Keywords: *Tetraselmis*, CO₂, algae growth.

Recibido: 03 Agosto 2015

Aceptado: 22 Noviembre 2015

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotoautótrofos o fotosintéticos que mediante el uso de agua, CO₂ y luz son capaces de obtener su propia materia orgánica y realizar todas sus funciones vitales, tales como los procesos de reproducción y crecimiento.

Tetraselmis suecica es una microalga clorofítica marina muy utilizada en la alimentación de rotíferos, moluscos bivalvos, peces herbívoros (Fábregas *et al.*, 1995). Tienen alto valor nutricional, atóxicas, gran adaptabilidad a las condiciones de cultivo masivo y alta tasa de reproducción, que mediante la fotosíntesis absorben el carbono en forma de CO₂ disuelto en el agua para formar carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Said, 2007), en un proceso de disociación del agua y la

adhesión del hidrógeno a las moléculas del CO₂ para formar glucosa y oxígeno (García, 2006). Las fuentes de carbono inorgánico utilizadas por las microalgas son CO₂, CO₃²⁻, y HCO₃⁻, cuyas interconversiones están influenciadas por las variaciones del pH del medio de cultivo que en condiciones ambientales normales, la hidratación del CO₂ en HCO₃⁻ es un proceso muy lento comparado con la velocidad de la fijación del CO₂ durante la fotosíntesis.

Según Pulz (2001) las microalgas muestran crecimiento limitado cuando se les inyecta 1 L min⁻¹ de aire por tener baja concentración de CO₂ (0,003%), sugiriendo que la productividad mejoraría si aumentamos la concentración del CO₂ en el aire, en tal sentido, Velea *et al.*, (2009), recomiendan concentraciones de 0.2% a 5% y Gordillo (2003) demostraron que la fotosíntesis y las tasas de crecimiento de *Dunaliella viridis* mejoran al adicionarle 1% de CO₂ y algunas especies, como *Chlorococcum littorale*, pueden crecer normalmente hasta 40% de CO₂ previa adecuación, que evite la inhibición originada por la disminución del pH intracelular, como resultado de la actividad de la anhidrasa carbónica bajo condiciones de excesivo CO₂ de las células algales (Velea *et al.*, 2009).

Las valvas de “concha de abanico” *Argopecten purpuratus*, contienen alrededor de 96% de carbonato de calcio susceptibles de ser transformados en CO₂ y diversos elementos minerales como magnesio y potasio (Dauphin *et al.*, 2003) que pueden ser utilizados como nutrientes en el cultivo de microalgas, de tal manera que la utilización de este CO₂ sería una fuente barata de carbono inorgánico que permitirá incrementar la productividad de los cultivos algales y disminuir los costos de la producción del alimento vivo (microcrustáceos) utilizado en la acuicultura o en la obtención de sustancias químicas de interés económico (pigmentos, lípidos, proteínas, etc.). Asimismo, esta nueva manera de obtener CO₂, por la gran disponibilidad de valvas durante todo el año, permitirá el reciclaje de residuos que actualmente no son compatibles con el medioambiente terrestre y marino.

En el presente estudio consideramos como objetivo general, la evaluación del efecto de tres concentraciones de CO₂ (1, 5 y 10%) obtenido de valvas de *A. purpuratus* “concha de abanico”, en el crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio; y como objetivos específicos: determinar las tasas de crecimiento, y las variaciones del pH y temperatura de los cultivos en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del experimento

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Tesistas de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa (Ancash, Perú).

Cepa de *Tetraselmis suecica*

Se utilizó la microalga *T. suecica* obtenida del Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares y cultivada con medio Guillard f/2 (Guillard, 1975) en matraces de vidrio de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo, los que fueron transferidos a matraces de 500 ml con 250 ml de medio de cultivo, y luego a botellas con 1 L y 2 L de cultivo.

Los cultivos fueron iniciados con inóculo de 0,15 g L⁻¹ procedente de la fase de crecimiento exponencial, iluminados constantemente con tres fluorescentes de 40 watts y 4 L min⁻¹ de flujo de aire continuo.

Obtención de CO₂ de valvas de *Argopecten purpuratus* “conchas de abanico”

Las valvas de “conchas de abanico” fueron recolectadas de los centros de producción de la bahía de Samanco (Ancash, Perú) y transportadas al laboratorio, donde fueron limpiadas, secadas y molidas con un molino mecánico. Las valvas finamente molidas fueron disueltas en una solución ácida al 20% dentro del reactor plástico de 3 L de capacidad (fig. 1) conteniendo dos aberturas tapadas herméticamente, una para el ingreso de la solución ácida y la otra para las valvas molidas.

El CO₂ dosificado a los cultivos fue obtenido de la disolución de 50 g de valvas molidas en 400 ml de una solución ácida conteniendo 100 ml de ácido clorhídrico comercial (HCl al 28%) y 300 ml de agua de caño. La inyección del CO₂ se realizó mediante una manguera de 5 mm de diámetro y la dosificación fue regulada por llaves de paso y toberas calibradas.

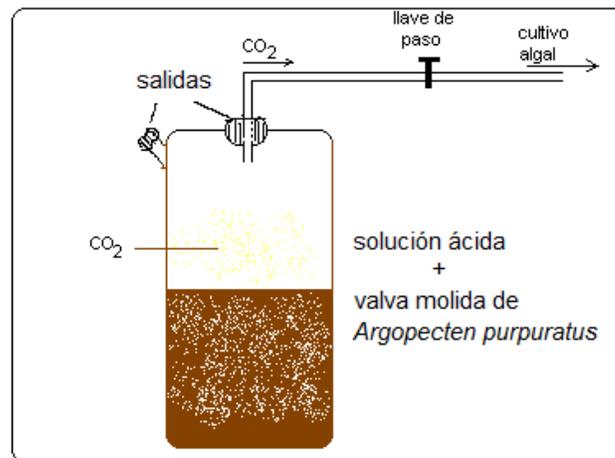


Fig. 1. Reactor plástico con CO₂ obtenido de valvas de “concha de abanico” para dosificar a los cultivos de *T. suecica*.

Dosificación del CO₂

La dosificación del CO₂ a los cultivos algales fue realizada directamente a través de llaves y toberas calibradas para obtener los porcentajes de CO₂ ensayados (1, 5 y 10%). Las toberas fueron confeccionadas con agujas hipodérmicas de diferente diámetro y las cantidades del CO₂ dosificados fueron determinados mediante el método de desplazamiento del líquido contenido en una probeta invertida dentro de un recipiente con agua.

El CO₂ fue dosificado cada dos horas por dos minutos durante las 54 horas que duraron los ensayos.

Diseño experimental

Se empleó el diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y un tratamiento control, con tres réplicas para cada tratamiento.

Unidades experimentales y parámetros de cultivo

Se utilizaron 12 botellas plásticas de 3 L de capacidad conteniendo 2 L de cultivo de acuerdo a los tratamientos y repeticiones antes descritos. Se realizaron registros diarios de temperatura, con un termómetro de mercurio ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de sensibilidad) y del pH de los cultivos con pH-metro digital marca Checker ($\pm 0,01$ de sensibilidad). El pH fue registrado antes y después de cada dosificación del CO₂ a

cada unidad experimental a fin de evaluar las variaciones del pH y el consumo de CO₂ por las microalgas.

Tasa de crecimiento algal

El crecimiento algal fue calculado, mediante determinaciones fotocolorimétricas de la transmitancia (T) a 560 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro marca Turner. Los datos de T obtenidos fueron transformados en D.O (g L⁻¹) según la siguiente ecuación de Sorokin (1975):

$$D.O. = \log (100 / T)$$

La tasa de crecimiento (u) fue determinada según la siguiente ecuación:

$$u = \text{Ln} (B_f - B_i) / T_f - T_i$$

Donde B_f y B_i son los valores de la biomasa al final e inicio de los cultivos en los correspondientes tiempos T_f y T_i

Análisis de datos

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) usando un nivel de significancia de 0,05 para establecer diferencias entre los promedios del crecimiento algal de cada uno de los tratamientos y se realizó el tratamiento estadístico mediante el programa estadístico SPSS 14.0 para Microsoft Windows XP.

RESULTADOS

Tasa de crecimiento

Los cultivos de *T. suecica* mostraron continuos incrementos de la biomasa durante las 54 horas que duró el experimento, siendo más altos los dosificados con 10% de CO₂ (0.23 g.L⁻¹) que con 5% (0.21 g. L⁻¹), y 1% (0.21 g.L⁻¹) sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1); sin embargo, estas diferencias son significativas al final de la fase logarítmico (36 horas o 1,5 días) (Tabla 1 y fig. 2).

Tabla 1. Crecimiento (g.L⁻¹) de *T. suecica* cultivadas a diferentes concentraciones de CO₂, en condiciones de laboratorio.

Tiempo (horas)	Control	1%	5%	10%
0	0.15	0.15	0.15	0.15
6	0.16	0.16	0.16	0.16
12	0.17	0.17	0.17	0.19
18	0.18	0.18	0.18	0.21
24	0.19	0.19	0.19	0.23
30	0.20	0.20	0.22	0.24
36	0.21	0.22	0.24	0.25
42	0.21	0.22	0.24	0.25
48	0.20	0.21	0.22	0.24
54	0.20	0.21	0.21	0.23

Asimismo, los valores de las tasas de crecimiento algal (u) aumentan con la inyección del CO₂ (Tabla 2), cuyas diferencias serán muy significativas al extrapolarlas a cultivos de varios m³.

Tabla 2. Tasa de crecimiento (u) de *T. suecica* cultivadas a diferentes concentraciones de CO₂, en condiciones de laboratorio.

Tiempo (días)	Control	1%	5%	10%
Biomasa inicial (mg L⁻¹)	150	150	150	150
Biomasa final (mg L⁻¹)	210	220	240	250
Tiempo (días)	1,5	1,5	0,15	0,15
u	2,73	2,83	3,00	3,07

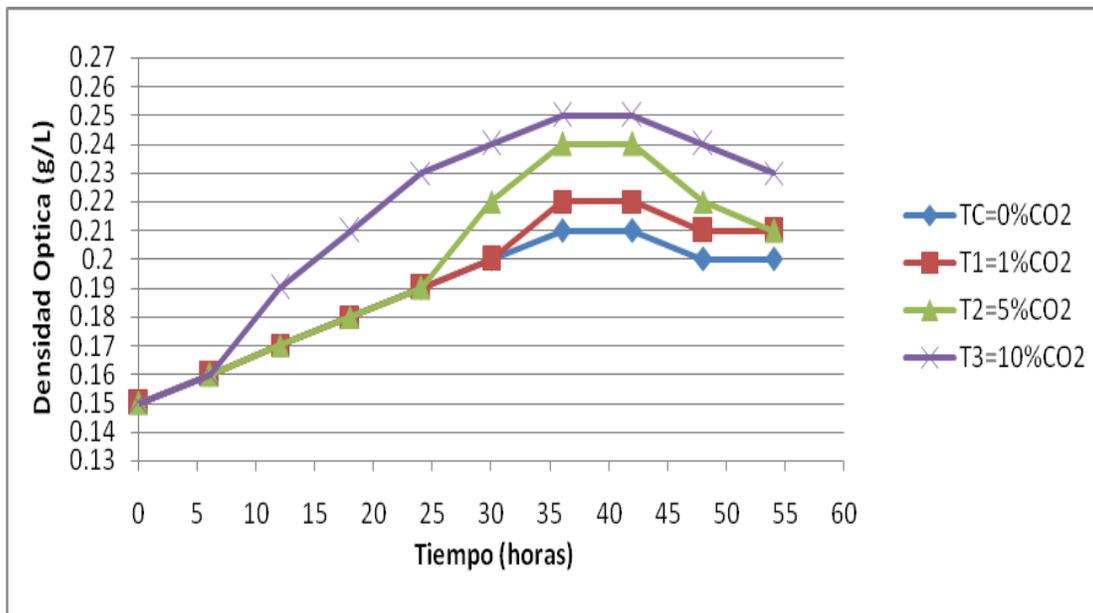


Fig. 2. Crecimiento (g.L⁻¹) de *T. suecica* (g.L⁻¹) cultivadas a diferentes concentraciones de CO₂ en condiciones de laboratorio.

Variaciones del pH

Los cultivos se iniciaron con pH de 8.6 y variaron de acuerdo a las dosificaciones de CO₂ con valores mínimos de 6,63, 8,90 y 7,83 los cultivos dosificados con 10, 5 y 1 %, respectivamente; demostrándose que el pH de los cultivos disminuye conforme se incrementa la dosificación del CO₂ y amplitud es mayor según la dosificación del CO₂, mientras que el control muestra ligeras variaciones (8.60 a 8.77) debido al limitado aporte de CO₂ del aire. La recuperación del pH a sus valores iniciales denota el activo consumo del CO₂ por los cultivos algales (Tabla 3).

Tabla 3. Variaciones del pH de los cultivos de *T. suecica*, antes (pH_i) y después (pH_f) de la dosificación del CO₂.

Tiempo (horas)	Control	1%		5%		10%	
	pH	pH _i	pH _f	pH _i	pH _f	pH _i	pH _f
0	8.6	8.6	8.47	8.6	8.07	8.6	7.57
2	8.6	8.57	8.57	8.37	8.13	8.3	6.87
4	8.63	8.57	8.37	8.43	7.87	8.27	7.07
6	8.63	8.5	8.53	8.33	7.8	8.27	7
8	8.7	8.53	8.23	8.33	7.3	8.23	7.17
10	8.67	8.43	8.2	8.2	7.77	8.23	7.17
12	8.67	8.33	8.33	8.23	6.9	8.2	6.8
14	8.67	8.43	8.17	8.03	7.47	8.27	6.87
16	8.67	8.27	8.03	8.03	7.5	8.27	7.03
18	8.67	8.23	8.23	8.17	7.63	8.17	6.73
20	8.67	8.33	8.2	8.2	7.67	8.2	6.7
22	8.63	8.3	8.27	8.1	7.6	8.1	6.93
24	8.7	8.37	8.29	8.23	7.8	8.23	7.23
26	8.7	8.37	8.23	8.23	7.7	8.2	7.27
28	8.7	8.33	8.23	8.17	7.83	8.2	6.9
30	8.73	8.33	8.13	8.17	7.6	8.17	6.7
32	8.77	8.23	8.02	8.03	7.6	8	6.73
34	8.73	8.17	7.96	8.13	7.7	8.07	7.33
36	8.7	8.13	7.94	8.07	7.7	8.07	7.6
38	8.73	8.17	8.1	8.13	7.8	8.17	7.37
40	8.73	8.17	8.07	8.2	7.83	8.1	7.27
42	8.7	8.17	7.87	8.2	7.67	8.13	6.94
44	8.73	8.17	7.97	8.03	7.7	8	7.13
46	8.73	8.23	7.93	8.03	7.67	8.07	6.67
48	8.73	8.23	7.8	8.03	7.67	8.07	6.87
50	8.73	8.23	7.83	8.13	7.53	8.03	7.26
52	8.77	8.2	8.13	8.13	7.73	8	6.63
54	8.77	8.2	0	8.13	0	8	0

Volúmenes de CO₂ inyectados a los cultivos de *T. suecica*

Los volúmenes inyectados los cultivos de *T. suecica* fueron determinados considerando la cantidad de CO₂ aportado por la aireación constante y los tiempos de dosificación del CO₂ y su transformación en biomasa algal (Tabla 4).

Temperatura

Las variaciones de la temperatura (24,0 – 24,6 °C) de los cultivos de *T. suecica* por no presentar diferencias significativas en todos los tratamientos ensayados no ha afectado la dinámica del crecimiento algal (Tabla 5).

Tabla 4. Volumen (L) de CO₂ dosificados a los cultivos *T. suecica*

PARAMETRO	Control	1 %	5 %	10 %
Inyección de Aire (L min ⁻¹)	4	4	4	4
Tiempo de inyección de aire(min)	324	324	324	324
Tiempo de inyección de CO ₂ (min)	-	54	54	54
CO ₂ aportado por el aire (L)	0.39	0.39	0.39	0.39
Inyección de CO ₂ (L)	-	2.16	10.8	21.0
Total de CO ₂ (L)	0.39	2.55	11.19	21.39
Biomasa algal (mg L ⁻¹)	210	220	240	250

Tabla 5. Variación de la temperatura (°C) en los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones (1, 5 y 10%) de CO₂, en condiciones de laboratorio.

Tiempo (horas)	Control	1%	5%	10%
0	24.0	24.0	24.0	24.0
6	24.4	24.3	24.2	24.2
12	24.2	24.2	24.3	24.4
18	24.3	24.4	24.4	24.4
24	24.6	24.5	24.4	24.3
30	24.3	24.4	24.3	24.5
36	24.4	24.6	24.5	24.4
42	24.4	24.4	24.4	24.3
48	24.5	24.4	24.3	24.3
54	24.6	24.4	24.3	24.4

DISCUSIÓN

El CO₂ es considerado la mejor fuente inorgánica de carbono y es ampliamente utilizada en los cultivos masivos de microalgas por permitir adecuados crecimientos y perfiles bioquímicos (Acién, 2007), habiéndose demostrado que el bajo contenido del CO₂ del aire en condiciones atmosféricas normales (0.03%), permite el lento crecimiento de los cultivos algales y que la adición del CO₂ optimiza la generación de la biomasa algal (Velea, 2009), en tal sentido, algunas especies algales (*Cyanidium caldarium*, *Synechococcus elongatus*, *Chlorococccum littorale*, *Scenedesmus sp*, *Euglena gracilis*, *Chlorella sp*, *Eudorinasp*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloris sp*, *Chlamydomonas sp* y *Tetraselmis suecica*) pueden tolerar concentraciones de 14% hasta 100% de CO₂.

La adición de 1% de CO₂ favorece el crecimiento de *Dunaliella viridis* y el 2% estimula el crecimiento y la síntesis de clorofila y carotenoides de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina platensis*, *Nostoc* y *Stigonema* (Gordillo *et al.*, 2003, Sorokin, 1975)).

En nuestras experiencias, las concentraciones de CO₂ (1, 5 y 10%) dosificadas a los cultivos de *T. suecica* favorecen el crecimiento algal, alcanzando los máximos valores a las 36 horas o 1,5 días

(Tabla 1), demostrando la capacidad de metabolizan el CO₂ obtenido de las valvas de “concha de abanico”. Los cultivos dosificados con 10% de CO₂, presentan mayor crecimiento (Fig. 2) debido a la mejor adecuación del mecanismo de transporte y metabolismo del carbono, ya que es necesario la adecuación de los sistemas metabólicos para optimizar el consumo del CO₂ a altas concentraciones y evitar interferencias metabólicas derivadas de las variaciones del pH de los cultivos producto de las dosificaciones del CO₂ (Yang & Gao, 2003).

El CO₂ es asimilado por las algas mediante la participación de la enzima rubisco cuya afinidad por el CO₂ se debe a la presencia de mecanismos de concentración de carbono que favorecen el aumento de la concentración del CO₂ en el entorno de la enzima y la actividad de la carboxilasa (Shiraiwa, 1992). Los mecanismos de concentración del carbono están basados en el transporte a través de membrana mediante la anhidrasa carbónica que acelera la transformación reversible del CO₂ a HCO₃ y la presencia de esta enzima en la superficie de las células algales permite el uso de CO₂ como fuente de carbono inorgánico para la fotosíntesis (Mercado, 1999). Nuestros resultados demuestran que la dosificación del CO₂ favorece el incremento de la biomasa algal (Tabla 2) y es responsable de las variaciones del pH de los cultivos por la rápida formación de ácido carbónico y su consumo fotosintético permite la recuperación del pH.

Respecto a los volúmenes de CO₂ inyectado, las mayores dosificaciones (10%) conlleva al aumento del proceso de desorción del gas por el aumento de la presión parcial del gas en el agua y la constante aireación de los cultivos no permiten establecer una relación directa entre el aporte del CO₂ y la biomasa algal generada (Tabla 4); sin embargo, queda demostrado la capacidad de las microalgas de utilizar el CO₂ obtenido a partir de valvas de “concha de abanico”.

Las variaciones de la temperatura (Tabla 5) de los cultivos son similares debido al sistema cerrado (botellas de plástico) utilizado y a las condiciones de laboratorio y aireación constante; en consecuencia, consideramos que este parámetro no ha interferido en la dinámica del crecimiento algal por lo que los incrementos de la biomasa es el resultado directo de la asimilación del CO₂ durante el proceso fotosintético (Yang y Gao, 2003).

CONCLUSIONES

- El cultivo de *T. suecica* dosificado con el 10% de CO₂ presenta mayor incremento de biomasa que aquellos cultivos dosificados con Guillard, 1 y 5% de CO₂, cuyos valores son de 250, 220, 240 y 210 mg L⁻¹, respectivamente, asimismo, las tasas de crecimiento (*u*) muestran la misma tendencia.
- Las variaciones del pH de los cultivos de *T. suecica* dependen de las dosificaciones del CO₂ siendo mayores en los cultivos dosificados con 10%, y su activa asimilación permite la recuperación del pH a valores iniciales.
- Las variaciones de la temperatura no han influidos en los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acién G.** 2007. Usos y Valorización del CO₂. Dpto. Ingeniería Química, Universidad Almería. Curso de Verano: Generación de Electricidad mediante Carbón – EL reto del CO₂, Pp. 1-65. España.
- Dauphin, Y.; N. Guzman; A. Denis; J. Cuif & L. Ortlieb.** 2003. Microstructure, nanostructure and composition of the shell of *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Muricidae). Aquatic Living Resources. Vol. 16, Number 2, Pp. 95-103.

- Fábregas, J., E. Morales, J. Arán & A. Otero.** 1995. Germinated *Solanum tuberosum*: An Agricultural Product for marine microalgae culture. *Bioresource Technology*. 66:19-24.
- García, M.** 2006. Regulación Redox de la Rubisco: Contribución estructural y funcional del par de residuos conservados Cys172 y Cys192. Departamento de Bioquímica I Biología Molecular. Universidad de Valencia. Pp. 1-224. España.
- Guillard, R.** 1975. Division rates. In: Handbook of phycollogical methods and growth measurement. J. R. Stein (ed). Cambridge University Press. London. 290-311 pp.
- Gordillo, F. et al.** 2003. Influence of elevated CO₂ and nitrógeno suplionthe carbon assimilation performance and cell composition of the unicellular alga *Dunaliella viridis*. *Physiologia Plantarum* 119:513-518..
- Mercado, J.** 1999. Fotosíntesis y cambios en la composición de la atmósfera. *Ciencia al Día Internacional*, Nro. 2, Vol. 2, ISSN 0717-3849.
- Pulz, O.** 2001. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:287-293.
- Said, A.** 2007. El Bióxido de Carbono y la vida. *Biology Cabinet*, Pp. 4.
- Shiraiwa, Y.; A. Goyal & N. Tolbert.** 1992. Alkalization of the Medium by Unicellular Green Algae during Uptake of dissolved Inorganic Carbon. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 34, Issue 5, Pp. 649-657.
- Sorokin, C.** 1975. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343 p. en Sein, J.R. (Ed). Handbook of phycollogical methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. Cambridge. MA.USA. 448 pp.
- Velea, S.; N. Dragos; S. Serban; L. Ilie; D. Stalpeanu; A. Nicoara & E. Stepan.** 2009. Biological sequestration of carbon dioxide from Thermal power plant emissions, by absorbtion in Microalgal culture media. *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 14, No. 4, 2009, pp. 4485-4500.
- Yang, Y. & K. Gao.** 2003. Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 0:1-11.

