



## Efecto de la adición de aminas usadas como colectores en el crecimiento de *Chlorella vulgaris*

\*López Santiago Norma Ruth<sup>1</sup>, López Hernández Leiny Karla<sup>1</sup>, Gutiérrez Ruiz Margarita E.<sup>1</sup>, Ceniceros Gómez Agueda Elena<sup>1</sup>, Martínez Jardines Luis Gerardo<sup>2</sup>, Morales Zamudio Enrique<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental. Av. Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04510, México.

<sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Geología. Av. Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04510, México.

<sup>3</sup>LEACSA. Alfonso Esparza Oteo 63, Guadalupe Inn, Álvaro Obregón, Ciudad de México, C.P. 01020, México.

\*Autor para correspondencia: nruths@yahoo.com

### Recibido:

20/mayo/2016

### Aceptado:

25/julio/2016

### Palabras clave

*Chlorella vulgaris*, aminas, parámetros de crecimiento

### Keywords

*Chlorella vulgaris*, amines, growth parameters

### RESUMEN

El estudio expone la capacidad de *Chlorella vulgaris* para reproducirse en presencia de sales de amonio empleadas como agentes de flotación. El crecimiento de los cultivos se monitoreo con base en los parámetros de absorbancia y biomasa mediante un equipo de espectroscopia UV-VIS y gravimetría. Los ensayos muestran un aumento en la biomasa tras la adición de las aminas, con una tasa de crecimiento menor a la referencia, lo que supone una inhibición en el desarrollo. Adicionalmente, se obtuvieron tiempos de generación superiores al testigo que alude a un lento aumento de microorganismos. Sin embargo, el estudio demuestra la habilidad de *Chlorella vulgaris* para producir biomasa mediante un mecanismo heterotrófico, aún en presencia de contaminantes. Efecto también relacionado con el número de carbonos presentes en la cadena y la concentración de la amina parámetros directamente proporcionales a la tasa de crecimiento e inversas al tiempo de generación, consecuencia de la cantidad de nutrientes en el medio.

### ABSTRACT

The study provides the ability *Chlorella vulgaris* to reproduced in the presence of ammonium salts, used as flotation agents. The crop growth was determined based on the absorbance and biomass by UV-VIS spectroscopy and gravimetry. Tests show an increase in biomass after addition of the amines with growth rate is less than the reference which means witness a development inhibition of the cells. Additionally, build times are higher, which translates as a slow growth of microorganisms. Growth, even in the presence of pollutants, demonstrates the ability of *Chlorella vulgaris* to produce biomass by means of a heterotrophic. Finally, it was observed that both the number of carbons in the chain and the amine concentration are directly proportional to the growth rate and reverse at the time of generation, because of the amount of nutrients in the environment.

## Introducción

Los microorganismos y en particular las microalgas se utilizan como indicadores biológicos de la contaminación en estudios ecotoxicológicos. En ellos se pretende determinar la relación que existe entre la cantidad de compuesto químico a la que el organismo es expuesto y la naturaleza y grado de sus efectos perjudiciales. La relación dosis-respuesta proporciona la herramienta necesaria para el análisis de los peligros potenciales que presentan los productos químicos para el medio ambiente (Cid-Blanco, 2014), en este caso particular los agentes de flotación a base de aminos. Para cuantificar el efecto de un compuesto se puede recurrir a diferentes parámetros: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento de la población o la alteración del comportamiento, entre otras (Puig, 2013; Cid-Blanco, 2014). Los bioensayos de toxicidad consisten en la exposición de grupos de organismos, a concentraciones definidas del tóxico por un tiempo determinado.

Para los fines anteriores, es preciso preparar un cultivo de los microorganismos del estudio, que consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada; los cultivos sólidos se utilizaron para preservar la cepa mientras que los medios líquidos son empleados para realizar los bioensayos (Madigan et al., 2009). El siguiente apartado describe un crecimiento en este último.

### Crecimiento microbiano en medio líquido

En un medio líquido, las células se reproducen de manera independiente dando lugar a una suspensión. Si los microorganismos además se encuentran bajo un régimen típico en un sistema cerrado donde el suministro de alimentos es limitado, las células presentan diferentes fases de crecimiento en función de la reacción de la población a los cambios de las condiciones del ambiente que dependen a su vez de la inoculación, la concentración de nutrimentos, intensidad de luz y temperatura (Becker, 1995). En un cultivo discontinuo se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento (Madigan et al., 2009):

- **Fase lag** o de adaptación, etapa donde los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo), para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

- **Fase exponencial o logarítmica (fase log)**, en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase los microorganismos consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.
- **Fase estacionaria**, durante este periodo no se observa un aumento en el número de microorganismos debido a que la tasa de crecimiento disminuye y el número de muertes microbianas compensa el de células nuevas por lo que la población se estabiliza. Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y representan con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en ambientes naturales. Existen diversas razones por las que un cultivo llega a la fase estacionaria, la principal implica el agotamiento de algún nutriente. Otra causa aparente es la generación durante la fase exponencial de metabolitos secundarios y productos de desecho.
- **Fase de muerte**, se produce una reducción del número de microorganismos viables del cultivo, debido a la acumulación de residuos tóxicos. En esta etapa el número de decesos sobrepasa el número de células formadas el cultivo, por lo que los parámetros de crecimiento del cultivo disminuyen considerablemente.

De las anteriores, la **fase logarítmica** permite, mediante un ajuste matemático, determinar la tasa de crecimiento del cultivo, parámetro que se expresa como el incremento del número de células en un determinado tiempo con unidades de  $h^{-1}$ , ecuaciones 1 y 2 (Pumarola, et al. 1999). Durante la **fase exponencial**, la velocidad de crecimiento es constante, por lo que su representación logarítmica se presenta como una diagonal hacia arriba donde la pendiente corresponde a la **tasa de crecimiento** (Brock et al., 2004), calculada a partir de la siguiente ecuación.

$$\ln N_t = \ln N_0 + kt \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $N_t$  es número final de células al tiempo  $t$ ,

$N_0$  es el número inicial de células

$t$  es el tiempo transcurrido

$k$  es la tasa de crecimiento

Por su parte, la tasa de crecimiento está relacionada con el tiempo de generación a través de la ecuación 2

$$k = \frac{\ln 2}{\tau} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $\tau$  es el tiempo de generación.

El presente trabajo examina la viabilidad de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medios de cultivo adicionados con aminas alifáticas, comúnmente empleadas como colectores en procesos de flotación. Adicionalmente, se estudia el efecto a corto tiempo de estos agentes en el crecimiento del microorganismo.

El análisis reciente de un agente de flotación mostró una composición mayoritaria de  $C_{12} \approx 85\%$ , seguido de  $C_{10} \approx 8\%$ ,  $C_8 \approx 3\%$ ,  $C_{14} \approx 2.55\%$  y  $C_{16} < 1\%$  (Sosa et al., 2014). De las anteriores se seleccionaron las aminas de ocho, doce y catorce carbonos para realizar las pruebas en microalgas.

## Metodología

### Reactivos, materiales y equipos

Se utilizaron sales de amonio preparadas a partir de ácido acético glacial de la casa comercial J.T. Baker con una pureza del 99.7% y estándares de aminas alifáticas Sigma-Aldrich con una pureza igual o mayor de 98%: octilamina, dodecilamina y tetradecilamina. Medio de cultivo Bristol-proteosa-peptona (P-P) No. 3 MCD LAB, agua tipo I. Adicionalmente se empleó un autoclave marca Presto, un espectrofotómetro UV-Vis Varian Modelo CARY3E, una balanza analítica Sartorius modelo 1416MP8 con resolución de 0.0001 g y una centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 30 F.

### Cepa

La microalga *Chlorella vulgaris*, se adquirió en el Laboratorio de algas continentales de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

### Curvas de crecimiento

Todos los cultivos empleados en el ensayo se desarrollaron a temperatura ambiente e iluminación artificial (luz fría). Se emplearon dos parámetros para el monitoreo del crecimiento; absorbancia y biomasa. La primera fue determinada mediante un espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 670 nm, máximo para las células que tienen clorofila. Mientras que la cantidad total de biomasa se obtuvo mediante el análisis gravimétrico de la masa seca por unidad de volumen. Previo a la determinación son centrifugados 10 mL del medio y el exceso de agua es retirado mediante decantación y evaporación.

### Curva de crecimiento del testigo de *Chlorella vulgaris*

La construcción de la curva de crecimiento testigo inicia con la inoculación de la especie en medio Bristol, en condiciones estériles, a partir de un cultivo sólido de *Chlorella vulgaris*. La absorbancia y biomasa del cultivo testigo (no sometido a la exposición con aminas) fue monitoreada por un total de 600 y 840 horas en ausencia y presencia de la fuente de carbono y nitrógeno (proteosa-peptona) respectivamente. En ambos métodos el cultivo fue previamente homogenizado por agitación.

### Curva de crecimiento en presencia de aminas (bioensayos)

Las curvas de crecimiento de los bioensayos se construyeron mediante la determinación de la biomasa de cada uno de los experimentos con microalgas a partir de la adición de la sal de amonio correspondiente de las aminas de ocho, doce y catorce carbonos; acetato de octilamina ( $A-C_8NH_2$ ), acetato de dodecilamina ( $A-C_{12}NH_2$ ), y/o acetato de tetradecilamina ( $A-C_{14}NH_2$ ). Se realizaron ensayos simples y ensayos mixtos. A diferencia del testigo, los ensayos de exposición se realizaron a un menor tiempo, la Tabla 1 presenta las condiciones correspondientes para las aminas empleadas en cada caso. En los ensayos simples, el volumen de alícuota del cultivo de partida fue de 1.5 mL para un volumen final de 10 mL. Mientras que en los ensayos mixtos el volumen de la alícuota del medio fue de 1 mL con un volumen final de 10 mL.

**Tabla 1.** Condiciones de exposición de los bioensayos (\*concentración por amina).

Ensayos simples		
Amina	mg/L	Tiempo (hrs)
$A-C_8NH_2$	2.1	1, 2, 3, 4
$A-C_{12}NH_2$	2.1	5, 10, 15, 20, 25, 30
	5.0	6, 12, 24, 36, 48
$A-C_{14}NH_2$	2.1	5, 10, 15, 20, 25, 30
Ensayos mixtos		
Mezcla de aminas	mg/L	Tiempo (hrs)
$A-C_8NH_2$ y $A-C_{12}NH_2$	2.1*	2, 4, 6, 8
$A-C_{12}NH_2$ y $A-C_{14}NH_2$	2.1*	3, 6, 9, 12

Cada lote de experimentos (por nivel de concentración y tiempo de exposición), consistió de los siguientes ensayos:

- **Blanco microalgas.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris*

- **Testigo de ácido acético.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y ácido acético en la misma concentración que el bioensayo
- **Blanco de acetato de amina.** Disolución de acetato de amina en la misma concentración que el bioensayo (no sometido a las condiciones experimentales)
- **Testigo de acetato de amina.** Medio de cultivo estéril y acetato de amina bajo las mismas condiciones experimentales que el bioensayo
- **Bioensayo.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y acetato de amina
- **Duplicado (bioensayo).** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y acetato de amina.

## Resultados y discusión

### Curva de crecimiento del testigo de *Chlorella vulgaris*

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento del cultivo en ausencia y presencia de proteosa-peptona (fuente de nitrógeno y carbono para el crecimiento de los cultivos de la microalga). Los resultados exponen un menor crecimiento del cultivo de *Chlorella vulgaris* en ausencia de proteosa-peptona comparado con el cultivo que cuenta con dicha fuente. Sin embargo, en ambas es posible distinguir las principales fases de crecimiento enumeradas a continuación:

- **Fase lag.** Ambos cultivos de *Chlorella vulgaris* poseen una fase de adaptación inferior a 5 días. Durante este tiempo la microalga se ajusta a la composición del nuevo medio y en consecuencia la velocidad de crecimiento es significativamente baja comparada a las fases posteriores.
- **Fase log.** El aumento exponencial de la densidad poblacional de la microalga ocurre hasta aproximadamente a los treinta días para el cultivo sin P-P y cerca de los quince días con P-P. Durante esta etapa las células se dividen a una velocidad determinada por la naturaleza de la microalga y el cultivo.
- **Fase estacionaria.** Esta fase se presenta a los 32 días sin P-P y a partir de los 15 con P-P. En esta fase el número de células que se han dividido en el cultivo impide que todas reciban la misma cantidad de luz, por lo que aunado a la limitación de los nutrientes del cultivo y la acumulación de residuos tóxicos la velocidad de crecimiento se reduce. En este periodo la respiración celular juega un papel importante (Brock, et al. 2004) puesto que la degradación oxidativa de las sustancias sintetizadas evita el incremento celular y se

establece un equilibrio entre el proceso de división y de muerte debido a la degradación. En consecuencia, la biomasa permanece constante en función del tiempo.

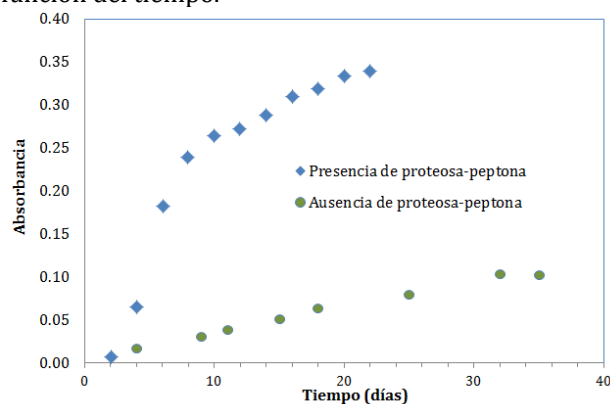


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en ausencia y presencia de P-P.

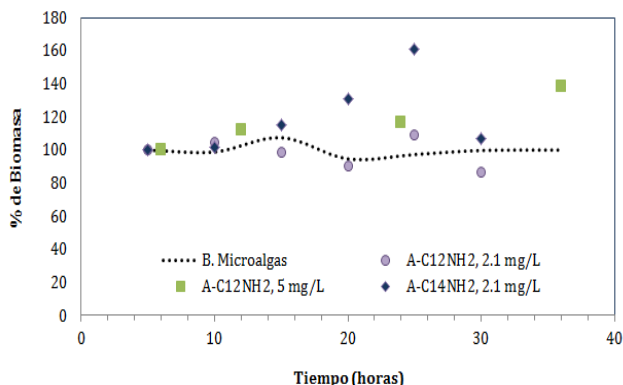
Todos los cultivos empleados en los bioensayos se encuentran en **fase estacionaria** por lo que el cambio en la biomasa de *Chlorella vulgaris* depende únicamente del efecto de la sal de amonio respectiva.

### Crecimiento en ensayos simples con aminas

#### Efecto de la adición de ácido acético a los cultivos de *Chlorella vulgaris*

La acidez o basicidad del medio de cultivo es un parámetro importante para el crecimiento celular por lo que su variación en los ensayos de biodegradación debe ser monitoreado (Gulnaz y Dincer, 2009). En el estudio realizado, los agentes fueron adicionados como acetatos. Mientras las aminas poseen un carácter básico, que resulta tóxico para la microalga, las sales de amonio presentan valores cercanos a pH 5.0. Adicionalmente a lo largo del experimento el pH se mantiene ~6.5, como consecuencia del sistema amortiguado (fosfatos) del medio de cultivo (Bristol). Con base en lo anterior, se revisó el efecto de la adición de ácido acético, en la misma proporción que en los bioensayos. En la Figura 2 se presentan los gráficos que ilustran el cambio en la biomasa en función del tiempo del control y los blancos con ácido acético en la misma concentración que el bioensayo, se omite el ensayo de octilamina debido al corto periodo de exposición.

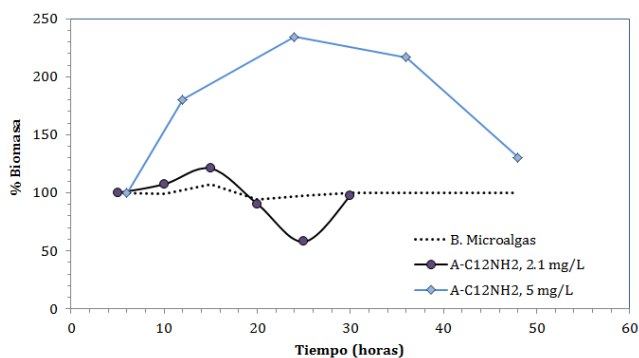
Comparado con el blanco de microalgas, no se aprecian diferencias significativas debidas a la adición de ácido acético, por tanto, se deduce que todos los cambios de biomasa en los bioensayos se deben principalmente a la acción de la amina.



**Figura 2.** Cambio en la biomasa en los ensayos con ácido acético en función del tiempo.

### Efecto de adición acetato de dodecilamina (A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>)

Se encuentra reportado que el componente mayoritario en los agentes de flotación es C<sub>12</sub> (Sosa et al., 2014), por lo que el efecto de la adición de la sal de amonio de esta amina se examinó a dos niveles de concentración. En la Figura 3 se muestra el cambio en la biomasa del blanco de microalgas y el promedio de los cultivos expuestos (bioensayo y duplicado) a 2 niveles de concentración (2.1 y 5 mg/L).



**Figura 3.** Cambio de biomasa para los testigos y los cultivos expuestos a A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L y 5 mg/L en función del tiempo.

En este estudio ambos cultivos muestran un corto periodo de adaptación (< 6 hrs), seguido de un aumento importante de biomasa, efecto que difiere con el blanco de microalgas cuya biomasa se mantiene constante a lo largo del tiempo. Dado que en fase estacionaria la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte celular, los gráficos de la Figura 3 indican que el aumento de células es capaz de superar las pérdidas por degradación. Este comportamiento concuerda con la capacidad algunas especies de algas para captar fuentes de carbono orgánico (El-Sheekh, et al. 2013).

Posterior a 15 horas de exposición para el cultivo a 2.1 mg/L y a 24 horas para el cultivo con 5 mg/L de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>, la biomasa de los cultivos disminuye, comportamiento que es interpretado como un proceso de muerte celular debido a la posible intoxicación de la microalga o incluso el probable producto de degradación. Sin embargo, en el caso del cultivo expuesto a 2.1 mg/L muestra un aumento repentino tras 30 horas de exposición que indica una posible recuperación después de la adición del agente, este patrón ha sido observado en la exposición de *Chlorella vulgaris* al pesticida isoproturon, que en concentraciones altas inhibe del crecimiento seguido de un leve aumento de células (Rioboo, et al. 2003).

La Tabla 2 muestra los parámetros de crecimiento para los cultivos expuestos, descritos en apartados posteriores, y el testigo de microalgas. Comparado con el testigo en ausencia de proteosa, es evidente una diferencia en el crecimiento de la microalga. Dicho efecto ha sido observado en diversas especies de microalgas (Blanck, 1985) y se explica mediante la inhibición de fotosíntesis y la fijación del nitrógeno tras la adición de aminas empleadas en procesos de extracción (Crist et al., 1992). Estudios con la bacteria *Bacillus polymyxa* (Chockalingam et al., 2003) han mostrado una respuesta positiva a la adición de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> con una fase lag de 3 horas, similar a lo encontrado en el experimento, y una fase estacionaria establecida después de 6 horas de exposición. Los datos anteriores establecen la capacidad de *Chlorella vulgaris* para asimilar el A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>, sin embargo, comparado con el testigo, el crecimiento en presencia de este agente, muestra una inhibición importante además de una fase de muerte temprana.

**Tabla 2.** Condiciones de exposición de los bioensayos.

Cultivo	Amina (mg/L)	Tasa de crecimiento (horas <sup>-1</sup> )	Tiempo de generación (horas)
Testigo	0.0	0.070	9.90
A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	0.020	34.66
	5.0	0.043	16.12
A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	0.039	17.77
A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> + A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub>	2.1*	0.053	13.07

\* Concentración por amina

### Efecto de adición de acetato de octilamina (A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub>)

Un ensayo preliminar con octilamina mostró una baja capacidad de *Chlorella vulgaris* para responder ante la toxicidad de la amina, Figura 4, por lo anterior y debido a la baja concentración de la amina de ocho carbonos en

el agente de flotación, se establecieron tiempos de exposición cortos (4 horas) con un sólo nivel de concentración de acetato de octilamina ( $A-C_8NH_2$ ).

Los resultados de los bioensayos de exposición se presentan en la Figura 5. Las gráficas exponen el cambio en la biomasa en función del tiempo para el ensayo con  $A-C_8NH_2$  y el blanco microalgas. Dada la brevedad del bioensayo, lo ilustrado corresponde a la fase *lag* o de adaptación a la nueva composición del medio de cultivo (no observado en los bioensayos anteriores) donde la tasa de crecimiento es mínima y la biomasa permanece relativamente constante, limitada únicamente por la cantidad de células preexistentes a la adición de acetato de octilamina. Sin embargo, en los últimos puntos se observa un leve aumento de biomasa, conducta que también es observada en el blanco por lo que no se considera como fase exponencial. Por lo anterior, no es posible determinar los parámetros de tasa de crecimiento y tiempo de generación.

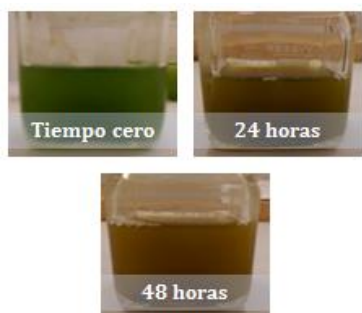


Figura 4. Ensayo visual de exposición a octilamina.

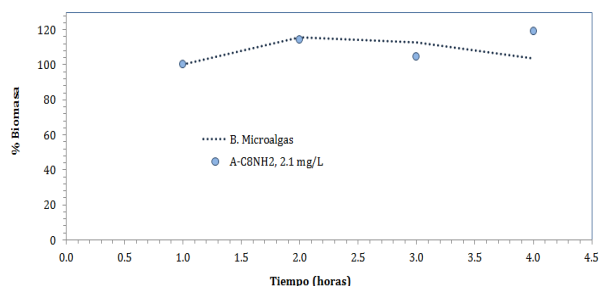


Figura 5. Cambio de biomasa para los testigos y los cultivos expuestos a  $A-C_8NH_2$  2.1 mg/L en función del tiempo.

### Efecto de adición de acetato de tetradecilamina ( $A-C_{14}NH_2$ )

Dada la baja concentración de tetradecilamina en el agente de flotación únicamente se estableció una concentración de 2.1 mg/L para los ensayos con *Chlorella vulgaris*. El cambio de la biomasa para el

blanco de microalgas del experimento y el promedio de los cultivos tras la adición de acetato de tetradecilamina ( $A-C_{14}NH_2$ ) se expone la Figura 6.

Similar a lo observado en los ensayos con  $A-C_{12}NH_2$ , los cultivos expuestos a  $A-C_{14}NH_2$  muestran un aumento significativo en la biomasa luego de una breve fase de adaptación. Aunque existe un aumento en la biomasa tras las primeras horas de exposición, comparado con el testigo en ausencia de proteasa, el cultivo expone la inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris*, Tabla 2, por lo que este agente también resulta perjudicial para su desarrollo. Además, se observa una fase de muerte temprana a partir del cuarto ensayo (tras 20 horas de exposición).

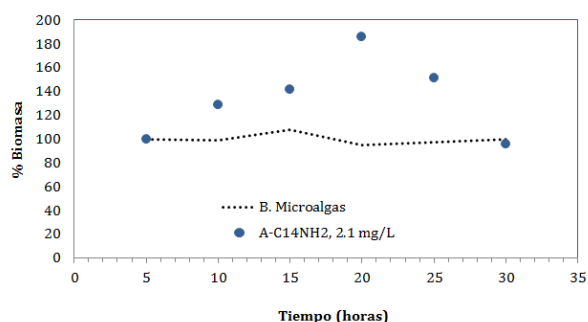


Figura 6. Cambio de biomasa para los testigos y los cultivos expuestos a  $A-C_{14}NH_2$  2.1 mg/L en función del tiempo.

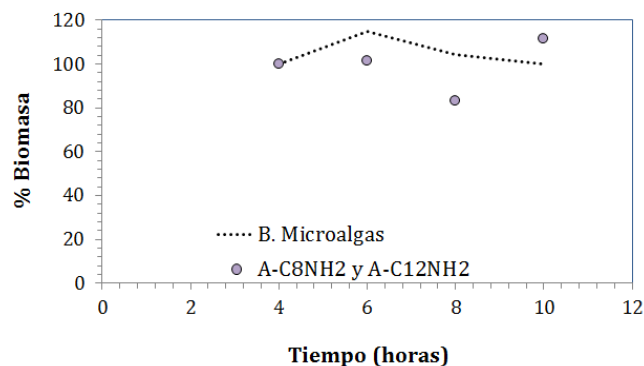
Por otro lado, si bien el  $A-C_{14}NH_2$  inhibe el crecimiento, los parámetros de crecimiento, comparados con los obtenidos con  $A-C_{12}NH_2$ , muestran una respuesta favorable al cambio de amina de acuerdo a lo observado en la Tabla 2.

### Crecimiento en ensayos mixtos con aminas

#### Bioensayos con acetato de octil y dodecilamina ( $A-C_8NH_2$ y $A-C_{12}NH_2$ )

Algunos estudios sugieren que las mezclas de aminas pueden ser más tóxicas que los ensayos individuales (Blank, 1985), por lo anterior y debido a la baja capacidad de *Chlorella vulgaris* para responder a la adición de octilamina se planteó un ensayo corto con la amina de ocho y doce carbonos. La Figura 7 muestra las gráficas del cambio en la biomasa en función del tiempo para el promedio de los ensayos, el control de microalgas y el testigo de ácido acético. Si bien la amina de doce carbonos ha demostrado ser un agente que promueve el crecimiento, el ensayo no muestra cambios significativos de biomasa en función del tiempo. La constancia del número de células a lo largo del experimento, se muestra una extensión de la fase de

aclimatación a las condiciones del nuevo medio, cuya composición ralentiza su adaptación, comparado con ensayos simples donde la *fase lag* abarca sólo las primeras 5 horas, debido a la toxicidad de las aminas aún neutralizadas.

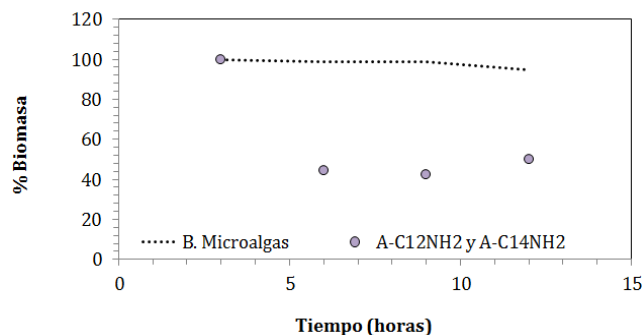


**Figura 7.** Cambio en la biomasa de *Chlorella vulgaris* para el blanco de microalgas y el promedio de los bioensayos de selectividad con A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>.

#### Bioensayos con acetato de dodecil y tetradecilamina (A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>)

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** 8 expone el cambio en la biomasa para el blanco de microalgas (del experimento) y el promedio de los bioensayos en contacto con acetato de dodecil y tetradecilamina.

La adición de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> produce una disminución repentina de la biomasa, efecto que respalda el aumento de toxicidad cuando las aminas se encuentran en una mezcla. No obstante, a partir las 6 horas de exposición se observa un aumento de biomasa, traducida como *fase exponencial*, de donde se obtienen los parámetros de crecimiento presentados en la Tabla 2. Los valores del bioensayo aún muestran una inhibición del crecimiento de la microalga, sin embargo, se acercan a los obtenidos en el testigo.



**Figura 8.** Patrón de cambio en la biomasa de *Chlorella vulgaris* para el blanco microalgas y el promedio de los bioensayos de selectividad con A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>.

#### Discusión final de los ensayos simples y mixtos

De los datos anteriores, se observa que el tiempo de generación del testigo es inferior a los obtenidos en presencia del acetato de amina, por lo que el microorganismo requiere mayor tiempo para duplicar su población. Además, la tasa de crecimiento del testigo es superior a todos los bioensayos, dicho efecto se traduce como una inhibición del desarrollo de la microalga. Sin embargo, aún bajo las condiciones de exposición, *Chlorella vulgaris* es capaz de reproducirse, puesto que todos los cultivos, originalmente fase estacionaria, muestran un incremento en el número de células tras la adición de los acetatos correspondientes. Lo anterior es consecuencia de la ausencia de P-P en el medio, condición que obliga a la especie a consumir las sales de aminas como fuente de carbono y nitrógeno. Estudios similares con bacterias, bajo la ausencia de sacarosa (fuente de carbono), muestran que éstas optan por consumir agentes de flotación como sustitutos para su nutrición (Deo y Natarajan, 1998). Por su parte, las microalgas poseen la habilidad para producir biomasa mediante dos tipos de mecanismo; autótrofo, absorción de luz y carbono inorgánico disuelto y heterotrófico, absorción de carbono orgánico disuelto (Likay y Papadakis, 2009). Esta característica permite el aumento de células como respuesta a la suma de los nutrientes en el medio de cultivo y las sales añadidas, aun cuando éstas causen un efecto negativo a través del tiempo.

Pérez y colaboradores han informado que *Chlorella vulgaris* bajo un régimen heterótrofo desarrolla poblaciones más grandes y tasas de crecimiento más altas que bajo el régimen autótrofo (Perez et al., 2010). En ausencia de proteosa el régimen es autótrofo, sin embargo, cuando se adicionan las sales de aminas, ocurren los dos procesos, pero en mayor medida el heterótrofo. No obstante, debido a la toxicidad de los agentes añadidos no es posible observar una población más grande. En la degradación de compuestos fenólicos por microalgas se ha observado que los productos de biodegradación también contribuyen al crecimiento (Papazi y Kotzabasis, 2007), así que la fase de declinación observada en la mayoría de los ensayos es resultado de los desechos acumulados debido al proceso natural de crecimiento y probablemente los productos de degradación.

Los datos de la tasa de crecimiento, Tabla 2, muestran que la velocidad de reproducción en el ensayo de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> a 2.1 mg/L es prácticamente la mitad de la tasa del cultivo a 5 mg/L. Este hecho es consecuencia de la cantidad de amina añadida, puesto que una



disponibilidad superior de fuente de carbono en el medio permite al microorganismo crecer a un mayor ritmo. Una reacción similar es observada al comparar los ensayos simples A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> a la misma concentración de 2.1 mg/L, ya que el aumento del número de carbonos en el compuesto favorece el crecimiento del microorganismo.

### Conclusiones

Los cultivos de *Chlorella vulgaris* tras la adición de las sales de aminas presentan un aumento importante de la biomasa respecto al blanco de microalgas, que se mantiene en fase estacionaria. En todos los casos, la tasa de crecimiento es menor a la referencia lo que supone una inhibición del mismo respecto al cultivo en ausencia de proteosa y los tiempos de generación son superiores, que se traduce en un aumento lento de biomasa. No obstante, el crecimiento, aún en presencia de contaminantes, demuestra la habilidad de *Chlorella vulgaris* para producir biomasa mediante un mecanismo heterotrófico. Cabe señalar que este proceso únicamente ocurre para cadenas mayores a doce carbonos, puesto que el acetato de octilamina no produce ningún crecimiento debido a la toxicidad del mismo. Por otro lado, se observó que tanto el número de carbonos presentes en la cadena como la concentración de la amina son directamente proporcionales a la tasa de crecimiento e inversas al tiempo de generación, consecuencia de la cantidad de nutrientes en el medio.

### Agradecimientos

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química-UNAM y a la sección 024 del AAPAUNAM por el apoyo otorgado a través de la Cátedra "Fernando Orozco", durante el periodo de abril a septiembre de 2015.

### Referencias

Becker E. (1995). Microalgae. Biotechnology and microbiology. 1era Ed. Cambridge University Press.

Blanck, H. (1985). Inhibition of Growth of Freshwater Microalgae by Long-chained Aliphatic. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 14: 609-620.

Cid-Blanco A. (2014). Aplicabilidad de las microalgas en estudios de contaminación de sistemas acuáticos. Sociedad Española de Microbiología. España. Recuperado el 8 de 01 de 2014, de <http://www.semicrobiologia.org/protistologia/files/SEM%20Microalgae.pdf>

Chockalingam E., Subramanian S., Natarajan, K. (2003). Studies on biodegradation of organic flotation collectors using *Bacillus polymyxa*. *Hydrometallurgy*, 71:249-256.

Crist R., Oberhoiser, K., Wong B. (1992). Amine-Algae Interactions: Cation Exchange and Possible Hydrogen Bonding. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 1523-1526.

Deo N., Natarajan K. (2008). Biodegradation of some organic flotation reagents by *Bacillus polymyxa*. *Bioremediat. J.*, 2: 205-214.

El-Sheekh M., Hamouda R., Nizam, A. (2013). Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 82:67-72.

Lika K., Papadakis I. (2009). Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *J Sea Res.*, 62:135-146.

Madigan M., Martinko J., Parker J. (2009). Brock Biología de los Microorganismos. 10ma ed. Prentice-Hall, 144-145.

Papazi A., Kotzabasis, K. (2007). Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds — exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation. *J. Biotechnol.*, 120: 706-716.

Perez-García O., Bashan L., Hernández, J., Bashan, Y. (2010). Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic and mixotrophic cultivation of 1 *C. vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Phycologia*, 46: 800-812.

Puig A. (2013). Ensayos de toxicidad. Breve Enciclopedia del Ambiente. <recuperado el 15 de abril de 2016 de <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Ensayosde.htm>

A., Rodríguez-Torres A., García-Rodríguez J., Piedrola-Angulo G. (1999). Microbiología y parasitología médica. Pumarola 1era Ed. Masson, p.62-65.

Rioboo C., Herrero C., González, O., Cid A. (2003). Análisis del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cultivos expuestos al herbicida isoproturon. *IX Conferencia Española de Biometría*. 1:17-20.

Sosa Quiroz I. E., Gutiérrez Ruiz M., Cenicerós Gómez A., Martínez Jardines, L., López Santiago N. R. (2014). Caracterización de aminas alifáticas utilizadas en procesos de flotación. *Memorias del XXVII Congreso de Química Analítica*, 1:450-455.