

EFFECTO DE UN CARBÓN SUBBITUMINOSO SOBRE EL CRECIMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS DE *Dunaliella salina* (TEODORESCO, 1905) CULTIVADA EN FOTOBIOREACTOR DE MÚLTIPLES CÁMARAS OSCILANTES

EFFECT OF SUBBITUMINOUS COAL ON GROWTH AND PIGMENTS CONCENTRATION OF *Dunaliella salina* (TEODORESCO, 1905) CULTIVATED IN PHOTOBIOREACTOR MULTIPLE CHAMBERS OSCILLATING

Euler Gallego, Lena Manjarrez, Leidys Herrera y Edgardo José Leal

RESUMEN

Se estudió el efecto de un carbón subbituminoso sobre el crecimiento y producción de pigmentos de *Dunaliella salina* cultivada en fotobiorreactor de múltiples cámaras oscilantes (FMCO) en condiciones de campo abierto. Se realizaron cinco tratamientos de CSM (10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L) y un control, cada uno por triplicado. El crecimiento poblacional se evaluó mediante conteo celular y el contenido de pigmentos se realizó mediante técnicas espectrofotométricas. Los resultados indicaron que el tratamiento de 20 mg/L de CSM produjo un mayor estímulo sobre el crecimiento de la microalga con $6.50 \pm 0.77 \times 10^6$ cel.ml⁻¹, tasa específica de crecimiento de (μ) 0.52 ± 0.03 div/día y tiempo de duplicación de (Td) de 1.33 ± 0.04 días. Así mismo, evidenció un mayor aumento en la concentración de clorofila y carotenoides totales por volumen de cultivo en la fase logarítmica, con 12.6 ± 0.26 y 0.50 ± 0.04 µg/ml, respectivamente. Estas concentraciones presentaron una correlación significativa con la máxima densidad celular de *D. salina* en función de los tratamientos con el CSM con una $r_{MDC, chla.tot} = 0.918$ y otra $r_{MDC, carot.tot} = 0.919$ a un nivel de significancia de $p < 0.01$. El efecto positivo sobre el crecimiento de la cepa se explica probablemente por las propiedades físicas y químicas del material carbonoso. Los resultados demostraron la factibilidad de utilizar este carbón como un sustrato apropiado para el crecimiento de la microalga, siendo una alternativa innovadora y menos costosa para la obtención de importantes metabolitos.

PALABRAS CLAVE: Carbón subbituminoso, *Dunaliella salina*, pigmentos, fotobiorreactor

ABSTRACT

It was studied the effect of subbituminous coal on growth and pigments concentration of *dunaliella salina* cultivated in photobioreactor multiple chambers oscillating (FMCO) under open field conditions. Five treatments of CSM (10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L) and a control were performed, each in triplicate. Population growth was assessed by count cell, and the pigment content was performed by spectrophotometric techniques. The results indicated that treatment of 20 mg/L of CSM produced a greater stimulus on microalgae growth with $6.50 \pm 0.77 \times 10^6$ cel.ml⁻¹, specific growth rate (μ) 0.52 ± 0.03 div/day and duplication time (Td) of 1.33 ± 0.04 days. Also there was a greater increase in total chlorophyll and carotenoids per volume of culture in the logarithmic phase, with 12.6 ± 0.26 and 0.50 ± 0.04 µg/ml, respectively. These concentrations show a significant correlation with maximum cell density of *D. salina* on function to the treatments of CSM with $r_{MDC, chla.tot} = 0.918$ and with $r_{MDC, carot.tot} = 0.919$ at a significance level of $p < 0.01$. The positive effect on the growth strain is probably explained by the physical and chemical properties of the carbonaceous material. The results demonstrated the feasibility of using this coal as a suitable substrate for the microalgae growth, being an innovative alternative and less costly to obtain important metabolites.

KEY WORDS: *Dunaliella salina*, pigments, photobioreactor, subbituminous coal

Dirección de los autores:

Centro de Investigación, Universidad de La Guajira-Colombia Km 5 vía Riohacha-Maicao, teléfono móvil: 300-4363626, eulergc@gmail.com (E.G.C). Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia. Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología. lenajmanjarrezrodriguez@gmail.com, herreraBrittol@gmail.com (L.M.R., L.H.B). Universidad Antonio Nariño, Sede Riohacha. edgarlealfe@gmail.com (E.J.L).



INTRODUCCIÓN

En las últimas cuatro décadas, las microalgas han adquirido un creciente interés en diversos campos de la economía, especialmente en la industria de alimentos saludables, concentrados para animales, productos farmacéuticos y cosméticos (Gavrilescu y Chisti, 2005; Mendiola, 2007; Mimouni et al., 2012; Priyadarshani y Rath, 2012). Sin embargo, los rendimientos de cultivos a gran escala de microalgas no son tan eficientes comparados con los microorganismos heterotróficos. No obstante, el cultivo industrial de las microalgas apenas se encuentra en los albores de desarrollo, estado que motiva el desarrollo de procesos biotecnológicos innovativos que incrementen la eficiencia productiva de los microorganismos fototróficos (Norsker et al., 2011).

Entre los esfuerzos investigativos que buscan lograr la mayor eficiencia productiva en cultivos de microalgas, se destacan el uso de nuevos materiales minerales, orgánicos o de compleja combinación química (orgánico/inorgánico). Se ha demostrado que sustancias tales como ácidos húmicos (Sun et al., 2005), fitohormonas (Tarakhovskaya et al., 2007), zeolitas (Nieves, 2000; Leal et al., 2004) actúan como sustancias estimulantes del crecimiento poblacional de determinadas especies de microalgas en cultivos, aunque se ha experimentado con otras bastante efectivas y de amplio espectro para su aplicación en los cultivos de muchas especies, son costosas y no asequibles comercialmente (Jezequiel et al., 2000; Nishibori et al., 2009).

Dunaliella salina, microalga sintetizadora natural de β -caroteno -un metabolito secundario-, es cultivada industrialmente para la producción y comercialización de este importante pigmento que posee propiedades nutricionales y terapéuticas (Dipak y Lele, 2005). En la actualidad, se han realizado diversas estrategias de cultivo de *D. salina* para maximizar la producción de β -caroteno, aunque, sin lograr rebasar los mayores límites alcanzados, debido a que las altas tasas de crecimiento no corresponden con una mayor acumulación intracelular de β -caroteno (Ben-Amotz y Avron, 1983). Sin embargo, se ha observado que una mayor producción de biomasa incrementa el contenido de β -caroteno por volumen de cultivo (Guedes et al., 2011).

Estudios realizados con una variedad de carbón fósil (subbituminoso) procedente de los yacimientos carboníferos de Montelíbano (departamento de Córdoba, Colombia) o CSM, han demostrado que el uso

de partículas de este carbón en bajas concentraciones -20 a 60 mg/L- en cultivos de *D. salina* en condiciones de laboratorio, ejerce un efecto optimizador sobre el crecimiento poblacional de la cepa (Gómez, 2000; Gallego et al., 2005; Gallego et al., 2007). El propósito de este estudio fue probar el efecto del CSM sobre el crecimiento y concentración de pigmentos cloroplásticos en una cepa nativa de *D. salina* aislada de las salinas de Manaure (departamento de La Guajira, Colombia) cultivada en fotobiorreactor de múltiples cámaras oscilantes bajo condiciones de campo y expuesta a la incidencia de la luz solar. Este estudio proporciona información innovadora sobre una alternativa tecnológica para el campo de la biotecnología de microalgas que redunde en beneficios relacionados a la disminución de costos para la producción de biomasa de *D. salina* rica en metabolitos valiosos comercialmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de la cepa

La cepa de *D. salina* se aisló a partir de muestras de agua colectadas de las piscinas artificiales de las salinas de Manaure ubicada en el litoral marinocostero del municipio de Manaure, ubicado a los 11° 46' 31.8''N y 72° 27' 30.5''O. Las muestras de agua natural de las salinas fueron colectadas en el fondo y en la superficie de los estanques, mediante frascos de vidrio de 500 ml previamente esterilizados y rotulados que fueron introducidos hasta llenar 300 ml. Las muestras fueron colectadas a comienzos de enero de 2011, fecha que coincide con la época de sequía tardía, alta irradiación solar, temperatura de la capa superficial del agua de aproximadamente 60°C y salinidad total a una concentración de 4.0 M. El material recolectado se almacenó en una nevera y fue trasladado al área de microbiología del laboratorio del Instituto de Estudios Ambientales y Aprovechamiento de Agua de la Universidad de la Guajira (INESAG). Para obtener cultivos monoalgales de *D. salina* se llevó a cabo la combinación de dos métodos de aislamiento: pipeteo capilar y rayado en placas de agar (Moreno y Albarracín, 2012).

Material carbonoso utilizado

El material carbonoso utilizado fue colectado de los yacimientos carboníferos del municipio de Montelíbano, departamento de Córdoba-Colombia, localizados a los 9°36'N y 37°59'O. Esta variedad de carbón fósil ha sido tipificado químicamente con base a la norma ASTM

como un carbón subbituminoso (Montero et al., 1998). Las muestras en bruto de carbón traídas de la mina fueron sometidas a procesos mecánicos de molienda y tamizaje hasta obtener partículas promedios de 1.0 ± 0.01 mm de diámetro en el Laboratorio de Carboquímica del Grupo de Investigación del Carbón de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Atlántico. Luego, se seleccionaron 100 g de partículas que se adicionaron a 500 ml de agua destilada con el fin de liberar el material acidulante, para lo cual se monitoreó diariamente el pH (pHmetro WTW 315i) durante 20 días, periodo en el que se estabiliza el pH hasta un valor de 4.0 ± 0.13 (Gallego et al., 2007). La composición química del carbón fue certificada por BSI, Inspectorate Barranquilla-Colombia Ltda (Tabla 1).

Tabla 1. Composición en cenizas y óxidos del CSM utilizado en los bioensayos.

ANÁLISIS MINERAL DE CENIZAS, % peso seco	
Componente	Material calcinado
Sílice (SiO ₂)	
Alumina (Al ₂ O ₃)	23.46
Titanio (TiO ₂)	1.95
Óxido férrico (Fe ₂ O ₃)	13.86
Lima (CaO)	9.17
Magnesio (MgO)	3.57
Óxido de sodio (Na ₂ O)	2.61
Óxido de potasio (K ₂ O)	1.09
Óxido de manganeso (Mn ₃ O ₄)	0.11
Pentóxido fosfato (P ₂ O ₅)	0.28
Trióxido de sulfuro (SO ₃)	16.13

Medio de cultivo

Se empleó el Medio Johnson modificado J/1 y esterilizado previamente con base en la mezcla de macronutrientes, micronutrientes y hierro con EDTA; medio específico para microalgas del género *Dunaliella* (Borowitzka, 1988).

Biorreactor utilizado

Se utilizó un fotobiorreactor de múltiples cámaras oscilantes -FMCO- (Figura 1); una versión tecnológica modificada del original diseñado por Leal y Mancilla (2001). Este modelo de biorreactor se utilizó debido a que presenta un efectivo y eficiente sistema controlado de agitación del cultivo. El aparato consiste en una estructura metálica rectangular que proporcionó soporte a dos bandejas, cada una con cabida a 18 cámaras de cultivo. Las cámaras fueron construidas de material acrílico transparente con dimensiones de 28 cm de longitud por 7.0 cm de altura con una geometría ovoide-rectangular con capacidad volumétrica de 1.2 L; en cada extremo un orificio conectado a un tubo de PVC x 12 cm de altura con filtros de algodón compactado de forma que este facilitara el intercambio gaseoso con la atmósfera y la cámara. Las dos bandejas con sus respectivas cámaras de cultivo fueron agitadas por un movimiento tipo oscilante, proporcionado por un tubo tipo eje del que pendían; el movimiento del eje era impulsado por un sistema mecatrónico de biela-manivela con motor de ½HP de fuerza y un variador de frecuencia para regular el movimiento oscilante.



Figura 1. Vista lateral del FMCO utilizado en los bioensayos.

Diseño experimental

El experimento se realizó en condiciones de campo abierto en predios del Laboratorio de Ciencias Biológicas y Aplicadas de La Universidad de La Guajira. Los cultivos experimentales de *D. salina* efectuados en las cámaras del fotobiorreactor consistieron en cinco tratamientos de 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L de partículas

promedios de 1.0 ± 0.01 mm de diámetro de CSM. Los tratamientos con CSM se hicieron por triplicado, más un tratamiento control sin CSM, para un total de 18 cultivos experimentales. El crecimiento de las células de *D. salina* se hizo mediante las técnicas de cultivo discontinuo (Abalde et al., 1995). Los parámetros de cultivo aplicados a los tratamientos fueron los siguientes: a) medio de cultivo J/1; b) volumen de cultivo 0.8 L; c) luz solar atenuada con polisombra para un promedio diario de intensidad lumínica de $420 \pm 0.012 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; d) fotoperiodo natural; e) pH inicial de 8.2 ± 0.23 ; f) promedio diario de temperatura ambiental: externa a los cultivos $32 \pm 0.52^\circ\text{C}$, e interna de los cultivos $28 \pm 0.02^\circ\text{C}$; g) cultivos agitados diariamente con aplicación de 80 oscilaciones/min durante las 12 horas del periodo lumínico solar; h) concentración salina: 1.0 M de NaCl; y, i) densidad celular de *D. salina* $2 \pm 0.10 \times 10^4$ cel. ml^{-1} (Cifuentes et al., 1996).

Determinación de los parámetros crecimiento

Densidad celular

El crecimiento de *D. salina* en relación con las concentraciones de CSM, se realizó mediante recuento celular diario y a la misma hora, con una cámara Neubauer (células. ml^{-1}) en microscopio óptico binocular desde el primer día hasta alcanzar la fase temprana estacionaria. La densidad celular, tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación se estimó según la metodología de Guillard (1973).

Determinación de la producción de pigmentos

La determinación de la concentración de clorofila *a* y *b*, y carotenoides totales de *D. salina* en los cultivos experimentales se efectuó durante la fase de crecimiento logarítmica según la metodología de (Wegmann y Metzner, 1971). La concentración de los pigmentos de clorofila *a* y *b* se calculó según ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975), y para determinar la concentración de carotenoides totales se utilizó la ecuación de Strickland y Parson (1972).

Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de los parámetros de crecimiento y producción de los pigmentos cloroplásticos de los cultivos de *D. salina* en función de la cantidad adicionada de CSM mediante el modelo I ANOVA, una vez se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para la diferencia entre las medias. Mediante coeficiente de correlación de Pearson se estableció la relación entre la producción de pigmentos fotosintéticos y las densidades celulares con los tratamientos. Se utilizó el software SPSS Statistics 17.0.

RESULTADOS

Crecimiento

El tratamiento de 20 mg/L de CSM alcanzó el mayor rendimiento en relación con densidad celular con una MDC de $6.50 \pm 0.77 \times 10^6$ cel. ml^{-1} , coincidiendo con la más alta tasa específica de crecimiento (μ) de 0.52 ± 0.03 div/día y el menor tiempo de duplicación (Td) de 1.33 ± 0.04 . Los tratamientos de 30, 40 de CSM y el control presentaron unas MDC de 4.87 ± 0.27 , 5.50 ± 0.15 y $5.17 \pm 0.17 \times 10^6$ cel. ml^{-1} respectivamente; a su vez obtuvieron valores de (μ) y (Td) relativamente similares, a excepción del de 40 mg/L de CSM que presentó el menor (μ) con 0.20 ± 0.01 div/día y el mayor (Td) con 3.46 ± 0.16 días (Tabla 2). Durante los primeros cinco días la cepa presentó un crecimiento lento coincidiendo con la fase de latencia; posteriormente se observó el aumento acelerado de las densidades celulares indicando la fase logarítmica en la que se presentaron las MDC de la mayoría de los tratamientos entre los días 14 y 17, con excepción del tratamiento 20 mg/L de CSM que lo obtuvo en el día 11 (Figura 2).

Los datos de crecimiento de *D. salina* en relación con los tratamientos con CSM presentaron normalidad y homogeneidad de varianzas (S-K = 0.754; $p > 0.05$; Levene = 2.491; $p = 0.442 > p = 0.05$). En tanto que el ANOVA mostró que las partículas de CSM produjeron efectos sobre el crecimiento de *D. salina* cultivada en

el FMCO en condiciones de campo abierto ($F = 5.909$; $p < 0.05$). El test de Tukey indicó que el tratamiento de 20 mg/L de CSM difiere significativamente ($p < 0.05$), lo que significa que este presentó la mayor densidad promedio de *D. salina* en el experimento (Tabla 2).

Concentración de pigmentos

Durante la fase logarítmica, *D. salina* presentó la mayor producción de clorofila total y carotenoides totales por volumen en relación con las concentraciones de CSM.

Los tratamientos 20 y 40 mg/L de CSM alcanzaron los mayores contenidos de clorofila total con 12.6 ± 0.26 y 12.30 ± 0.06 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Mientras que con 60 mg/L de CSM se produjo el menor contenido con 7.43 ± 0.22 $\mu\text{g/ml}$. El tratamiento de 20 mg/L de CSM presentó el mayor contenido de carotenoides totales por volumen con 0.50 ± 0.04 $\mu\text{g/ml}$, siguiendo de forma descendente con los tratamientos 30, 40 mg/L de CSM y el control. Los valores más bajos fueron alcanzados con los tratamientos de 50 y 60 mg/L de CSM, con 0.34 ± 0.02 y 0.30 ± 0.01 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2 Parámetros de crecimiento y concentración de pigmentos de *D. salina* en relación con los tratamientos con CSM.

Tratamientos (mg/L)	MDC \pm DS (10^6 cel.ml ⁻¹)	μ (div/día)	Td (días)	CTFL ($\mu\text{g/ml}$)	CTsFL ($\mu\text{g/ml}$)
20	6.50 ± 0.77^A	0.52 ± 0.03^A	1.33 ± 0.04^C	12.6 ± 0.26^A	0.50 ± 0.04^A
30	4.87 ± 0.27^B	0.39 ± 0.017^B	1.77 ± 0.02^B	10.94 ± 0.10^B	0.45 ± 0.04^B
40	5.50 ± 0.15^B	0.20 ± 0.01^C	3.46 ± 0.16^A	12.3 ± 0.06^A	0.43 ± 0.03^B
50	4.41 ± 0.27^C	0.33 ± 0.02^B	2.10 ± 0.24^B	9.76 ± 0.36^B	0.34 ± 0.02^C
60	3.75 ± 0.27^C	0.34 ± 0.036^B	2.03 ± 0.10^B	7.43 ± 0.22^C	0.30 ± 0.01^C
Control (0)	5.17 ± 0.17^B	0.37 ± 0.13^B	1.87 ± 0.08^B	10.14 ± 0.05^B	0.40 ± 0.02^B

MDC = Máxima densidad celular, μ = Tasa específica de crecimiento, Td = Tiempo de duplicación, CTFL = Clorofila total en fase logarítmica, CTsFL = Carotenoides totales en fase logarítmica. Valores expresados en \pm DS; Test de Tukey: Los valores que presentan diferente letra suscrita en la misma columna revelan diferencia significativa ($p < 0,05$).

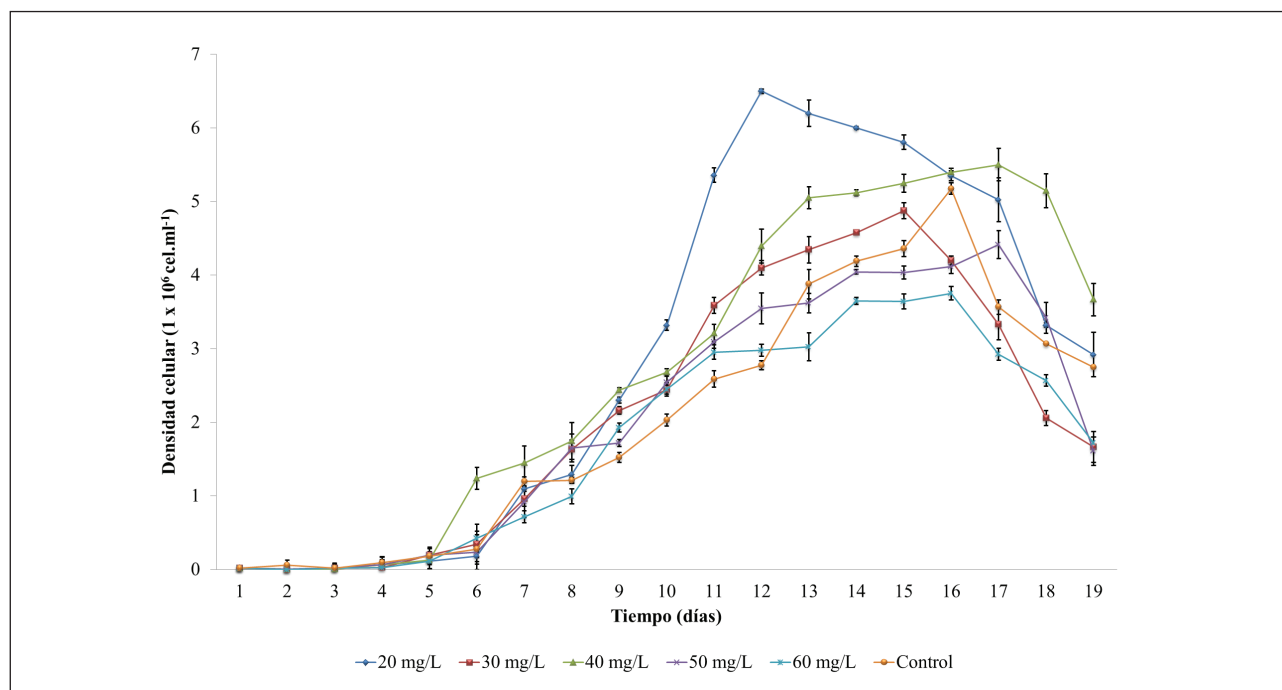


Figura 2. Crecimiento discontinuo de *D. salina* en función de las concentraciones de CSM cultivada en un FMCO.

El índice de correlación de Pearson calculado entre las variables MDC, producción de clorofila total y carotenoides totales de *D. salina* durante la fase logarítmica en función del CSM, indica que la MDC de la microalga en esta fase presenta una correlación significativa con el contenido por volumen de clorofila total y carotenoides totales: $r_{\text{MDC, chla. total.}} = 0,918$ y $r_{\text{MDC, carot. totales}} = 0,919$ con niveles de significancia ($p < 0.01$).

DISCUSIÓN

Crecimiento

Entre todas las comparaciones, la cepa de *D. salina* presenta diferencias en relación con las velocidades de crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación (Td), corroborando lo planteado por Borowitzka y Borowitzka (1988), quienes sugieren que no todas las cepas de *Dunaliella*, aunque sean de la misma especie, poseen la capacidad de responder de forma similar a iguales condiciones de cultivo.

Preliminarmente, Gómez (2000) utilizó partículas de CSM en estado natural y modificado químicamente -sulfonado y nitrogenado- en cultivos discontinuos de una cepa de *D. salina* aislada de las salinas de Galerazamba (Dpto. del Atlántico), y reportó que el CSM en estado natural a una dosis de 20 mg/L influyó en el aumento de la población celular a un 95 % en relación con el cultivo control alcanzando una MDC en fase estacionaria temprana de $87.16 \pm 0.23 \times 10^4$ cel.ml⁻¹. Seguidamente, Gallego et al. (2005) en dos bioensayos consecutivos determinaron el efecto de concentraciones de CSM en su estado natural sobre el crecimiento y producción de pigmentos de una cepa de *D. salina* aislada de las salinas de Tasajeras (Dpto. del Magdalena). En el primer bioensayo obtuvieron una MDC de $3.98 \pm 0.45 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ con 50 mg/L de CSM; lo que representó un 65 % de mayor rendimiento con respecto al cultivo control con $2.40 \pm 0.12 \times 10^6$ cel.ml⁻¹; y en el segundo, en el cual se ampliaron los intervalos de concentración (45, 50 y 55 mg/L), evidenciaron que el tratamiento de 45 mg/L produjo el mayor rendimiento del cultivo con una MDC de $4.22 \pm 0.56 \times 10^6$ cel.ml⁻¹, con un 21 % de rendimiento sobre el cultivo control, y con una MDC de $3.49 \pm 0.76 \times 10^6$ cel.ml⁻¹.

Luque et al. (2008) evaluaron el efecto sobre el crecimiento y la producción de pigmentos de las concentraciones de 45 y 55 mg/L de CSM en estado natural, adicionadas en cultivos a gran escala de *D. salina* en un medio de cultivo no convencional (0.34

ml/L de fertilizante agrícola Nutrifoliar + 1.5mM de KNO₃), y obtuvieron una MDC de $2.82 \pm 0.34 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ a una concentración de CSM de 45 mg/L. Con especial atención, la MDC alcanzada durante la fase exponencial tardía del tratamiento de 20 mg/L de CSM con una densidad de $6.50 \pm 0.77 \times 10^6$ cel. ml⁻¹, superó las obtenidas en los estudios anteriores, lo cual sugiere que el CSM ejerce una influencia positiva sobre el crecimiento de *D. salina* cultivada a diferentes concentraciones de partículas, tipos de medios y sistemas de cultivos. Esta condición se debe probablemente a las condiciones de cultivo establecidas en sus respectivos diseños experimentales, como el pH e inóculo inicial, tipo de mezclado y turbulencia, tratamiento del CSM y condiciones ambientales que afectan directamente los parámetros de crecimiento de la cepa.

El proceso de pretratamiento del CSM previo a su adición en los cultivos, específicamente la inmersión de las partículas en agua destilada durante 20 días -periodo en el que la solución acuosa alcanza la estabilidad del pH-, secado por 24 horas a 60°C y esterilizado en autoclave por 2 horas, probablemente coadyuvó en el aumento del grado de oxidación de la estructura carbonácea y con ello en la concentración de grupos carboxílicos (COOH) que se constituyen en sitios activos para el intercambio iónico (Angulo et al., 2005). El efecto positivo de la adición de partículas de CSM en la solución nutriente de esta prueba, que indujo a un mayor crecimiento poblacional de *D. salina*, se puede explicar probablemente por la capacidad de intercambio iónico del CSM que fue mejorada al ser oxidado.

Los esfuerzos en el desarrollo de procesos tecnológicos, que brinden un mejoramiento eficiente del rendimiento de los cultivos microalgales fundamentados en el uso de sustancias inertes con propiedades estructurales específicas como el intercambio iónico, regulación de pH del cultivo y capaces de formar complejos micelares como fuente intermediaria de macro y micronutrientes, se han venido incrementando en los últimos años (Andrade et al., 2009; Amaro et al., 2011; Ortiz et al., 2012).

En relación al uso de carbón fósil como sustancia estimulante del rendimiento poblacional en los cultivos de microalgas con fines biotecnológicos, las investigaciones reportadas indican que este tópico apenas está en su inicio, teniendo en cuenta que existen muchas variedades de carbón natural, y además, estos carbones fósiles están siendo modificados química y físicamente para la obtención de derivados aplicados en actividades agronómicas y en procesos

de descontaminación (Hayes y Graham, 2000; Sharif et al., 2002).

En lo concerniente al uso de sustancias derivadas de material carbonoso, se ha reportado que extractos de ácidos húmicos solubles en agua derivados de fuentes del lignito natural oxidado (leonardita), adicionadas a bajas concentraciones (1, 10 y 100 ppm) en *Chlorella vulgaris* en condiciones de oscuridad, coadyuvaron al crecimiento y síntesis de clorofila del alga, lo cual fue atribuido a la habilidad del extracto de suministrar Fe^{++} al alga (Pouneva, 2005). De igual forma, se ha experimentado con extractos de ácidos húmicos del suelo para enriquecer medios de cultivos que estimulan el crecimiento de microalgas marinas (Perumal y Subramanian, 1989), donde el componente húmico actuó como un material quelante con la propiedad de disminuir la toxicidad o aumentar la disponibilidad de los elementos trazas en los medios de cultivo.

Teniendo en cuenta la compleja composición química natural del CSM, y con respecto al contenido del análisis mineralógico de este carbón, se encontró una gran variedad de cenizas de óxidos y especies de azufre que podrían ser fuente de elementos micronutrientes para *D. salina*. Además, al comparar el contenido mineral de este carbón con otras sustancias inertes de origen mineral, por ejemplo, con productos de naturaleza zeolítica o zeolitas naturales (Nieves, 2000; Fachini y Vasconcelos, 2006), se observa que este tipo de material carbonoso contiene una importante cantidad y variedad de óxidos en su estructura. Sumado a lo anterior, los carbones subbituminosos son carbones heterogéneos conformados por una red entrecruzada y conjunto de diversos componentes de carácter alifático-aromático que le brindan la propiedad de intercambiador natural (Colpas et al., 2000). Estas propiedades fisicoquímicas observadas del CSM, son unas de las posibles causas que inciden en acelerar e incrementar el crecimiento poblacional de *D. salina*, razón por la cual este tipo de carbón es una sustancia adecuada para el uso y aplicación en procesos biotecnológicos de cultivos de microalgas y probablemente en otros campos acuícolas.

De acuerdo con Gallego et al. (2007), otra hipótesis que explicaría el marcado crecimiento poblacional de *D. salina* estaría dado por el desencadenamiento de una serie de mecanismos químicos, que ligados al rango, estructura y contenido de minerales podrían interactuar con los nutrientes del medio J/1. En este caso, se cree que las partículas de CSM han podido actuar como un material de intercambio iónico, capaz

de suministrar, captar y/o intercambiar iones con la solución nutriente y de favorecer así la disponibilidad de los mismos para el metabolismo nutricional de la microalga, así como también de reaccionar con las sales del medio y retransformarlas en componentes más simples que influyan favorablemente sobre la capacidad de asimilación de los elementos nutrientes de *D. salina*.

Cabe aclarar, que el mecanismo real sobre cómo los grupos funcionales presentes en el carbón realizan el intercambio iónico con los cationes del medio J/1, aún no está totalmente esclarecido, lo cual, siguiendo las recomendaciones planteadas por Arteca (1996), obliga a ampliar la base de estudios sobre nuevas sustancias y sobre las causas que inciden en los mejores rendimientos observados en el cultivo de organismos fotosintéticos. Del mismo modo, se requiere ampliar la base de estudios realizados con las sustancias carbonosas aplicadas en cultivos de microalgas, ya que como se indicó, existen muchas variedades de carbones fósiles que pueden ser modificados químicamente con fines aplicados en cultivos de microorganismos fotosintéticos.

No siendo objeto de análisis el tipo de biorreactor utilizado, el sistema de agitación del FMCO descrito por Leal y Mancilla (2001) resultó apropiado para coadyuvar en el efecto del CSM sobre el crecimiento de *D. salina*. El tipo de agitación turbulento proporcionado por el FMCO -diferente al de flujo laminar característico de los cultivos movidos mediante uso de bombas hidráulicas- permite homogenizar el mezclado de la solución del cultivo, así como ejercer una activa y azarosa circulación de las partículas de CSM en las cámaras de cultivo. Además, posibilita potenciar de manera favorable la interacción de diversos factores fisicoquímicos y bioingenieriles que inciden en el proceso fotosintético, en el metabolismo general y en el crecimiento poblacional de las microalgas, tales como régimen de luz (Niels, 2008; Fernández et al., 2010), asimilación de nutrientes, remoción de oxígeno fotosintético, incremento de la temperatura, y fotooxidación (Chini et al., 2000; Contreras et al., 2003; Chisti, 2007).

En relación con lo expuesto, se propone la continuación de este estudio para dilucidar los mecanismos físicos y químicos involucrados en la interacción entre las partículas carbonosas (CSM), el medio de cultivo y las células de *D. salina*. Así mismo, extender estas investigaciones a otros tipos de sustancias carbonosas y especies microalgales de interés para las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética del país.

Concentración de pigmentos

Con base en las condiciones de cultivo establecidas en el experimento, la producción elevada de clorofila total por volumen cultivo en relación con las bajas producciones de carotenoides, tanto en la fase logarítmica *-entre los días 8 y 16-* como en la estacionaria final *-días 16 hasta el 18-*, se deduce que dichos valores fueron determinados por el tamaño de inóculo utilizado en los bioensayos, el cual pudo haber influenciado la eficiencia fotosintética de la cepa en el cultivo (Cifuentes et al., 1996), como también el suministro de nutrientes que en niveles óptimos $-KNO_3$ 1.0g (10mM) y KH_2PO_4 0.025 g- influye directamente sobre el incremento del contenido de clorofila, concomitante al rendimiento poblacional (Serpa y Calderón, 2006). Del mismo modo, el medio de cultivo utilizado (Borowitzka y Borowitzka, 1988), las condiciones fisicoquímicas como pH de 8.20 ± 1.10 , salinidad 37‰ (58 g/L de NaCl), y temperatura de 26.5 ± 0.2 °C, sugeridas por otros autores, también mostraron producciones de clorofila total por volumen superior a carotenoides (Gómez, 1997; Guevara et al., 2005; Venkatesan et al., 2013).

La amortiguación de la alta intensidad lumínica solar incidente a las cámaras de cultivo mediante uso de polisombra, pudo haber tenido el efecto de producir altos valores en la relación clorofila/carotenoide respecto a los tratamientos con CSM, hecho que se explica con base en la capacidad adaptativa de la microalga, por ejemplo en el aumento del número de unidades fotosintéticas (Fakowski, 1980). Las variaciones del contenido de pigmentos se expresan como cambios específicos en el tamaño y el número de la unidad fotosintética por célula, la cual comprende los centros de reacción, en conjunto con las moléculas de clorofila-pigmento antena, los pigmentos accesorios y los transportadores de electrones. Para las especies del género *Dunaliella*, los reportes indican que a baja intensidad luminosa la microalga experimenta un aumento en el número de unidades fotosintéticas por célula. Estudios de la intensidad luminosa en diferentes cepas de *Dunaliella* demostraron que se presenta un efecto acumulativo de la intensidad luminosa sobre el crecimiento de la microalga (Ginzburg, 1988).

Universidad de La Guajira; a la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Magdalena; al Centro de Investigación de la Universidad de La Guajira; y al Grupo de Investigación de Carboquímica de la Universidad del Atlántico por facilitar el material carbonoso utilizado en la prueba experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Ediciones Universidad de La Coruña, España. 26-210 pp.
- Amaro, H., C. Guedes y X. Malcata. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. 4(12): 1-9.
- Andrade, Ch., A. Vera, C. Cardenas y E. Morales. 2009. Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus sp.* utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. 32(2):126-134.
- Angulo, R., J. Maury y F. Bernal. 2005. Extracción e hinchamiento de carbones del Caribe colombiano en diferentes solventes a temperatura ambiente. *Dugandia* 1: 129-141.
- Arteca, R. 1996. *Plant Growth Substances: Principles and Applications*. Eds. Chapman & Hall. New York City. 5-11 pp.
- Ben-Amotz, A. y M. Avron. 1983. On the factors which determine massive β -Carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiologic*. 72: 593 – 597.
- Borowitzka, M. 1988. Algal growth media and sources of algal cultures. pp 456-465. En: Borowitzka M. y L. Borowitzka. (Ed). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 680p.
- Borowitzka, M. y L. Borowitzka. 1988. *Dunaliella*. pp 27-58. En: Borowitzka MA y LJ Borowitzka (eds.) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 680 p.
- Cifuentes, A., M. González, O. Parra y M. Zúñiga. 1996. Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. *Revista Chilena de Historia Natural*. 69: 105-112.
- Colpas, F., R. Angulo, R. Fernández, M. Palencia y L. Rodríguez, 2000. Obtención y caracterización de fertilizantes nitrogenados a partir de carbones de bajo rango procedentes de Montelíbano (Córdoba). Grupo de Carboquímica. *Memorias: V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Carbón*. 1: 123-140.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Estudios Ambientales y Aprovechamiento de Agua de la Universidad de La Guajira (INESAG); a la Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas de la



- Contreras, C., J. Peña, L. Flores y R. Cañizares. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 28(8): 450-456.
- Chini, Z., R. Pastorelli y M. Tredici, 2000. A Modular Flat Panel Photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination. *Journal of Applied Phycology*. 12(3-5): 521-526.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294-30.
- Dipak, P. y S. Lele. 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*. 4(8): 476-483.
- Fachini, A. y M. Vasconcelos. 2006. Effects of zeolites on cultures of marine microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*. 13(6): 361-446 p.
- Fakowski, P. 1980. Light-shade adaptation in marine phytoplankton. *Journal Plant Physiological*. 66(4): 592-595.
- Fernández, B., G. Dragoner y J. Teixeira. 2010. Light regime characterization in airlift of photobioreactor for production of microalgae with high starch content. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 61: 218-226.
- Gallego E., S. Suarez, E. Leal y C. Vargas. 2005. Estudio de un carbón subbituminoso como promotor de crecimiento de *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* 17: 13-70.
- Gallego, E., E. Leal y C. Vargas. 2007. Posible mecanismo de interacción entre el carbón subbituminoso y la solución del medio nutriente para el crecimiento de *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* 19: 1-46.
- Gavrilescu, M. y Y. Chisti. 2005. Biotechnology -a sustainable alternative for chemical industry-. *Biotechnology Advances* 23: 471-499.
- Ginzburg, M. 1988. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research* 14:93-183.
- Gómez, L. M. 1997. Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. Tesis doctoral. España: Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña. 175 p.
- Gómez, G. 2000. Efecto del carbón Montelíbano sobre el crecimiento de *Dunaliella salina*. Tesis de grado. Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia. 86 p.
- Guedes, A., H. Amaro y F. Malcata. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs* 9(1): 625-644.
- Guevara, M., C. Lodeiros, O. Gómez, N. Lemus, P. Núñez, L. Romero, A. Vásquez y N. Rosales. 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista Biología Tropical*. 53(3-4): 331-337.
- Guillard, R. 1973. Division rates. pp 289-312. En: Stein, J. R. (Ed), *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, 423 p.
- Hayes, M. y C. Graham, 2000. Procedures for the Isolation and Fractionation of Humic Substances. pp 106-110 En: E.A. Ghabbour and G. Davies. (Ed). *Humic Substances: Versatile Components of Plants, Soil and Water*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 390 p.
- Jeffrey, S. y G. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *d*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical Physiology Pflanzen* 167:191-194.
- Jezequiel, M., M. Hildebrand y M. Brzezinski. 2000. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *Journal of Phycology* 36(5):821-40.
- Leal, E. y J. Mancilla. 2001. Diseño y construcción un fotobiorreactor cerrado para la producción intensiva de microalgas. Trabajo de grado. Facultad de ingeniería. Universidad del Atlántico, Barranquilla. 120 p.
- Leal, S., R. Nodar, G. Delgado y Y. Almaguer. 2004. Efecto de cinco tipos de productos zeolíticos sobre el crecimiento de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana*. *Revista de investigaciones marinas* 25(3): 242-244.
- Luque, M, L. Almanza, E. Leal y C. Vargas, 2008. Influencia del carbón subbituminoso sobre el crecimiento de *Dunaliella salina* en un medio de cultivo no convencional a gran escala. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* 19: 13-46.
- Mendiola, L.J.A. 2007. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España. 39 p.
- Mimouni, V., L. Ulmann, V. Pasquet, M. Mathieu, L. Picot, G. Bougaran, J.P. Cadoret, A. Morant y B. Schoefs. 2012. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13(15): 2733-2750.
- Montero, L., R. Angulo, I. Mejía y M. Peralta. 1998. Remoción de metales pesados mediante carbones sulfonados. Grupo de Investigación del Carbón (GIC) Departamento de Ingeniería Química. Universidad del Atlántico. En: *Memorias: V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Carbón*. Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia. 24 p.



- Moreno, J. y V. Albarraçín. 2012. Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)* 5(5): 79-93.
- Nieves, S. 2000. Efecto de productos de naturaleza zeolítica sobre el crecimiento y la calidad dietética de microalgas para la acuicultura. Tesis de doctorado, Universidad de Colima, México. 8-123 p.
- Niels, E. 2008. The technology of microalgal culturing. *Journal Biotechnology Letters* 30:1525-1536.
- Nishibori, N., M. Niitsu, S. Fujihara, T. Sagara, S. Nishio y I. Imai. 2009. Occurrence of the polyamines caldopentamine and homocaldopentamine in axenic cultures of the red tide flagellates *Chattonella antiqua* and *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). *FEMS Microbiology Letters*. 298:74-78.
- Norsker, N., M. Barbosa, M. Vermüe y R. Wijffels. 2011. Microalgal production: A close look at the economics. *Biotechnology Advances* 29(1): 24-27.
- Ortiz, M., C. Cortés, J. Sánchez, J. Padilla y A. Otero. 2012. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*. 16(1): 11-20.
- Perumal, P. y P. Subramanian. 1989. Photosynthetic pigments and humic acids in tropical coastal board ecosystems. *Revista Ciencias Marinas* 15(2): 67-77.
- Pouneva, I.D. 2005. Effect of humic substances on the growth of microalgal cultures. *Journal of Plant Physiology* 52(3): 410- 413.
- Priyadarshani, I. y B. Rath. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae: A review. *Journal of Algal Biomass Utilization* 3(4): 89-100.
- Serpa, R. y A. Calderón. 2006. Effect of different nitrogen sources on the carotenoid and chlorophyll content of four peruvian strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Ecología Aplicada* 5(1-2): 93-99.
- Sharif, M., R. Khattak y M. Sarir. 2002. Effect of lignitic coal derived humic acid on growth and yield of wheat and maize in alkaline soil. Tesis Doctoral. Universidad de Peshawar. Facultad de Ciencias en Producción de Cultivos. 156 p.
- Strickland, J. y .R. Parsons. 1972. Capítulo IV: Pigment analysis spectrophotometric determination of Chlorophylls and total carotenoids, pp 185-190. En: *A Practical Handbook of Seawater Analysis Fisheries Research Board of Canada*. Segunda Edición. Ottawa. 310 p.
- Sun, B., Y. Tanji y H. Unno. 2005. Influences of iron and humic acid on the growth of the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Biochemical Engineering Journal* 24(5):195-201.
- Tarakhovskaya, E., Maslov Y. y M. Shishova. 2007. Phytohormones in Algae. *Journal of Plant Physiology* 54(2): 186-194.
- Venkatesan, S., M. Senthil, Ch. Senthil, S. Bashkar y R. Rengasamy. 2013. Culturing marine green microalgae *Dunaliella salina* Teod. and *Dunaliella tertiolecta* Masjuk in Dewalne's Medium for valuable feeds stock. *Journal of modern biotechnology* 2(2): 40-45.
- Wegmann, K. y H. Metzner, 1971. Synchronization of *Dunaliella salina* cultures. *Archiv für Mikrobiologie* 78: 360-367.

Fecha de recepción: 13/06/2013
Fecha de aceptación: 02/12/2013

Para citar este artículo: Gallego, E., L. Manjarrés, L. Herrera y E.J. Leal. 2013. Efecto de un carbón subbituminoso sobre el crecimiento y concentración de pigmentos de *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) cultivada en fotobiorreactor de múltiples cámaras oscilantes. *Revista Intrópica* 8: 69 - 78