

CULTIVO DE *DUNALIELLA SALINA* EN MEDIO ORGÁNICO

GERARDO SUÁREZ¹, TERESITA LÓPEZ ROMERO¹ Y
M. A. BOROWITZKA²

¹ Centro de Investigaciones Pesqueras, Ministerio de la Industria
Pesquera, Barlovento, Sta. Fe. Playa, C. Habana 10900, Cuba.
E-mail: terges@mixmail.com; fax: 53-7-249827

² Murdoch University, Algal Biotechnology Laboratory, Perth W. A.,
Australia. E-mail: borowitz@possum.murdoch.edu.a,
fax: 61-8-9360-6303

RESUMEN.- Partiendo de resultados obtenidos en el cultivo de *Dunaliella salina* en residuales líquidos procedentes del procesamiento de túnidos de la industria pesquera cubana, se procedió a comprobar su crecimiento en medio orgánico utilizando glicerol, acetato de sodio y el propio residual como fuente de carbono en comparación con el medio sintético de Johnson modificado, el cual se utiliza para su producción comercial. Se emplearon salinidades entre 5,0 y 22,0 g de NaCl/100 ml de medio de cultivo. La cepa utilizada para las pruebas iniciales con residuales de la industria pesquera provino de Chile y la de comprobación fue la utilizada comercialmente por la Western Biotechnology Limited (WBL) de Australia. Paralelamente a esto se midió la producción de β -caroteno y la evolución de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Se comprobó que la cepa utilizada de *D. salina* creció más rápido y con mayor acumulación de carotenos en los cultivos sometidos a medio orgánico, notándose una marcada diferencia con los controles. El crecimiento máximo encontrado antes de pasar a la fase de decaimiento fue sobre el 1.000.000 cel/ml, concentración superior a la que usualmente se cosecha esta especie por las firmas que la comercializan. *Recibido:* 22 Junio 1998, *aceptado:* 18 Noviembre 1999.

Palabras claves: Aguas residuales, acuicultura, carotenos, Cuba, cultivo, *Dunaliella salina*, microalgas.

CULTIVATION OF *DUNALIELLA SALINA* IN ORGANIC MEDIA

ABSTRACT.- Based on results obtained in the cultivation of *Dunaliella salina* in waste waters from the Cuban tuna fishing industry, we studied *D. salina* growth in organic media (using glycerol, sodium acetate and the waste waters as a source of carbon), versus synthetic, modified Johnson media, normally used in commercial production. Salinities between 5 and 22 g/100 ml of NaCl were employed. The strain used for the initial tests with fishing industry waste water came from Chile, and for the control, we used a commercial strain from Western Biotechnology Limited (WBL), Australia. We measured Betacarotene production, carbohydrates, lipids and proteins. The *D. salina* strain grew faster and with a greater accumulation of carotene in the organic medium, and varied widely from the controls. Maximum growth before the decay phase was over 1,000,000 cell/ml, resulting in higher concentrations than normally obtained for this species by commercial growers. *Received:* 22 June 1998, *accepted:* 18 Noviembre 1999.

Key words: Aquaculture, carotene, Cuba, cultivation, *Dunaliella salina*, microalgae, wastewater.

INTRODUCCIÓN

La tecnología del cultivo de microalgas dulceacuícolas para la purificación de aguas residuales es bien conocida desde hace varios años (Oswald y Gottaas, 1957). En el caso de las algas salinas como *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales), su cultivo se ha centrado en la utilización de un medio sintético (Borowitzka *et al.* 1984) logrando su escalado comercial en diferentes países, fundamentalmente en Australia e Israel (Ben-Amotz y Avron 1990 y Borowitzka 1998). En Cuba se ha intentado combinar el efecto de purificación con el de obtención de subproductos (β -caroteno o provitamina A) y se han comenzado varios proyectos de cultivo de *Dunaliella salina* en aguas residuales de la industria procesadora de pescado y otras fuentes de compuestos de carbón orgánico. Estos estudios se iniciaron en el Ministerio de Industria pesquera (MIP) y

en este momento se cosechan estas algas en una planta piloto ubicada en una empresa pesquera cubana. Actualmente, se está trabajando en diferentes líneas de investigación con el fin de reducir su ciclo de vida y aumentar la concentración de carotenos. La planta piloto posee un sedimentador y separador de grasa, dos lagunas de alta velocidad agitadas con paletas y cada una con un volumen de 3 m, construidas con láminas de asbesto cemento y cubiertas con pintura plástica, para evitar la porosidad de las paredes y protegerlas de la alta salinidad del medio de cultivo. La cosecha se realiza por centrifugación continua, después de disminuir la salinidad del medio para evitar la ruptura de las células y propiciar una separación eficiente.

Con el propósito de comprobar si esta microalga era capaz de desarrollarse heterotróficamente, se procedió a cultivarla en un medio que utiliza glicerol, acetato de sodio y azúcar como fuente de carbono orgánico, estos resultados se comparan con los obtenidos con el medio Johnson para establecer su patrón de crecimiento con relación a una fuente de cultivo convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa *Dunaliella salina* para la primera serie de experimentos con agua residual de la industria pesquera utilizada en este trabajo se obtuvo de la colección del cepario del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) y es de procedencia chilena. En la segunda serie, la cepa utilizada (MUR-8), pertenece al cepario del Laboratorio de Biotecnología Algal (ABL), de la Universidad de Murdoch, Western Australia. Parte de los experimentos se efectuaron en Australia y para la última serie la prueba se realizó con una cepa (HFI-1) obtenida en el MIP (Ministerio de la Industria Pesquera) de Cuba, por el cruzamiento sexual entre ambas cepas (Chilena y Australiana). El diseño experimental fue el siguiente:

Para la cepa chilena se efectuaron cinco series de pruebas, con cuatro tratamientos cada uno y tres réplicas. La siembra se realizó

agregando $3,0 \times 10^4$ células/ml en erlenmeyers de 1 L con 500 ml de agua residual pretratada (sin grasa ni aceite) procedente del proceso de túndidos la cual fue salinizada mediante adición de NaCl como sal común de mesa; hasta obtener concentraciones entre 4,5 y 10,5%.

La segunda serie se realizó con medio Johnson modificado (Borowitzka y Borowitzka 1988a). En la Tabla 1 se presenta el resumen de estas pruebas. Como fuente de carbono se empleó el acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa}_3$) y el glicerol ($\text{CH}_2\text{OH-CHOH-CH}_2\text{OH}$). Las células utilizadas para el cultivo estaban en su fase carotenogénica y de crecimiento exponencial. Los procedimientos experimentales se repitieron sobre un segundo y tercero lote de cultivos que crecieron bajo iluminación continua con 59.530 lux ($1.145 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$). La concentración inicial para todos los frascos se ajustó a $3,9 \times 10^4$ células/ml.

TABLA 1. Diseño experimental para la segunda serie.

		SALINIDAD EN % de NaCl		
		12,5%	17,5%	20%
Control	Medio Johnson	1-1	1-2	1-3
Na Acetato	0,5 g/L	2-1	2-2	2-3
Na Acetato	1,0 g/L	3-1	3-2	3-3
Glicerol	0,5 g/L	4-1	4-2	4-3
Glicerol	1,0 g/L	5-1	5-2	5-3

La tercera serie experimental consistió en 12 reacciones que utilizaron los valores más representativos de la segunda serie y la distribución del diseño puede observarse en la Tabla 2. Para esta corrida se utilizó el medio Johnson modificado (Borowitzka 1988) y agua residual cruda (ARP), todos con una concentración de NaCl igual al 20,0%. La intensidad luminosa durante todo el experimento fue continua y la rotación de los frascos permitió que recibieran un valor medio de 9.850 lux ($189 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$). Esta serie se realizó con agua residual cruda y enriquecida con carbohidratos, específicamente azúcar refinada comestible o miel de purga como

suplemento de nitrato y carbón orgánico, así como nitrato de amonio y sodio como fuente de nitrógeno. Ésta se comparó con algas cultivadas en el medio Johnson modificado, al cual se le agregó azúcar, glicerol, acetato de sodio, miel de purga y ácido acético. La salinidad como NaCl de los cultivos fue de 20%. El conteo de células, para todas las series, se realizó con ayuda de un Hematocitómetro Neubauer con 1 mm² de área útil.

Se utilizaron muestreos separados para determinar el peso seco, el análisis de pigmentos y la composición química como proteína, carbohidratos y lípidos, en células previamente separadas por filtración al vacío con filtros de vidrio Whatmann GF/C.

Los pigmentos β -caroteno y clorofila se extrajeron con acetona y se determinaron según los métodos estándares del ABL. El análisis de proteína fue por el método de Lowry *et al.* (1951).

TABLA 2. Diseño experimental para la tercera serie. (MJ = Medio Johnson; ARP = Agua residual de la industria pesquera).

CLAVE	MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN	FUENTE DE C o N
1	MJ		
2	MJ	0,5 g/L	Azúcar
3	MJ	0,5 g/L	Glicerol
4	MJ	0,5 g/L	Na Acetato
5	MJ	0,5 g/L	Miel de Purga
6	MJ	0,5 g/L	Acido Acético
7	ARP		
8	ARP	0,5 g/L	Azúcar
9	ARP	0,5 g/L	KNO ₃
10	ARP	0,5 g/L	Miel de Purga
11	ARP	0,5 g/L	NaNO ₃
12	ARP	0,5 g/L	NH ₄ NO ₃

Los carbohidratos se extrajeron en solución de HCl (2N) y se determinaron por el método del fenol ácido (Kochert 1978). Los lípidos se determinaron gravimétricamente según la metodología propuesta por Bligh y Dyer (1959).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo de *D. salina* en función del tiempo, según la Figura 1, fue parecido al reportado por Borowitzka y Borowitzka (1988a). En bioensayos con un medio de 6% de NaCl, se alcanzó una concentración celular de $10,0 \times 10^4$ a $20,0 \times 10^4$ cel/ml después del quinto día de cultivo. Esta serie experimental se efectuó bajo luz natural difusa, no más de 5.000 lux ($96,2 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$), lo que al parecer no fue suficiente para acelerar su crecimiento, así como también la baja salinidad del medio de cultivo, fue la causa de que no se desarrollara satisfactoriamente. Este fenómeno está representado por un número bajo de células, según se reporta. Todas estas razones indicaron que era necesario incrementar la salinidad y la intensidad luminosa de los cultivos (Romero *et al.* 1984). Los

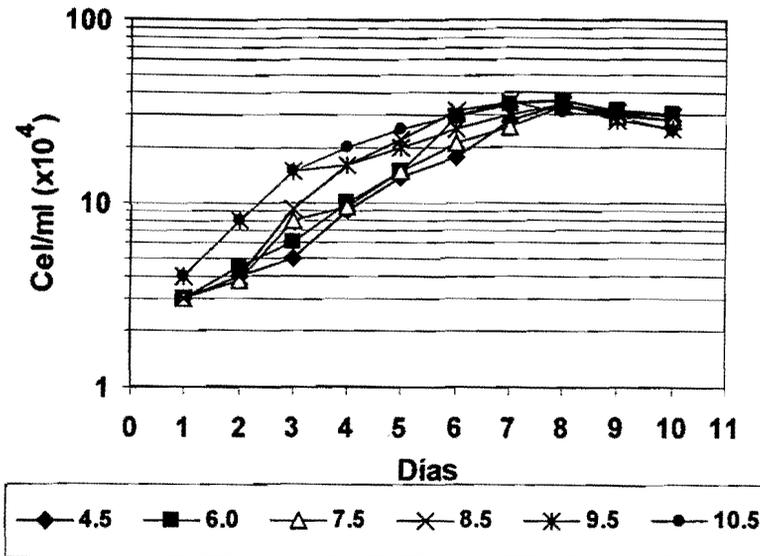


FIGURA 1. Crecimiento de *Dunaliella salina* en concentraciones diferentes de NaCl, en luz natural difusa.

valores de "k" o velocidad de crecimiento, oscilaron entre 0,03 y 0,9, correspondiendo los más altos a la fase de crecimiento exponencial, similares a los encontrados para otros géneros de microalgas

cultivadas en aguas del mismo origen y reportadas por Becker y Venkataraman (1982).

Un ANOVA realizado con un 95% de confianza entre las concentraciones celulares diarias para cada salinidad probó que el comportamiento para todos los cultivos en el rango experimentado fue similar, lo que ofreció la posibilidad de sugerir el empleo de salinidades por encima del 10% a fin de continuar las investigaciones en esta dirección con una escalado mayor. Aunque no existen diferencias entre las curvas de crecimiento, se ha hecho evidente que el crecimiento mayor estaba en la serie con 10,5% de NaCl. Estos resultados, aunque no del todo satisfactorios, dan un indicio de que estas algas pueden cultivarse en un medio cuya fuente de carbón sea orgánica como el de las aguas de desecho de la industria pesquera, o sea heterotróficamente y no sólo autotróficamente.

En la segunda serie experimental, los datos de crecimiento celular en número se ponen de manifiesto en las Figuras 2, 3 y 4 para salinidades entre 12,5, 17,5 y 20,0% de NaCl. En esas figuras es posible apreciar que la concentración mayor fue de aproximadamente de $100,0 \times 10^4$ células/ml, donde se estabilizó el crecimiento y posteriormente comenzó a decaer. Este valor se logró en 19 días a 12,5% de salinidad; 21 días a 17,5% y 24 días a 20,0%, resaltándose que a la concentración menor de sal se alcanzó en menos tiempo. Pero hay que enfatizar que en el medio con una fuente de carbón orgánico (glicerol), fue donde se alcanzaron los mejores valores. En todos los casos las células del medio Johnson modificado crecieron más lentamente, demostrando que esta cepa en cuestión puede aprovechar el carbón de una fuente orgánica y no sólo la inorgánica como se ha planteado con anterioridad en las diferentes referencias bibliográficas que recopilan Borowitzka y Borowitzka (1988a). El glicerol posee un peso molecular mayor al del acetato de sodio y posee una molécula con 3 átomos de carbón que aparentemente ofrece posibilidades mayores de ser asimilado por *D. salina* y este hecho parece reforzar los datos reportados por

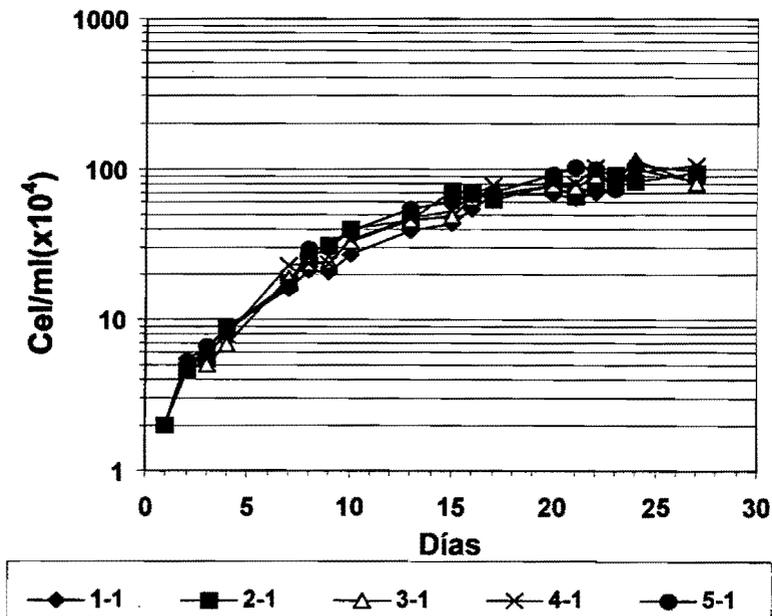


FIGURA 2. Crecimiento de *Dunaliella salina* en 12,5% de NaCl.

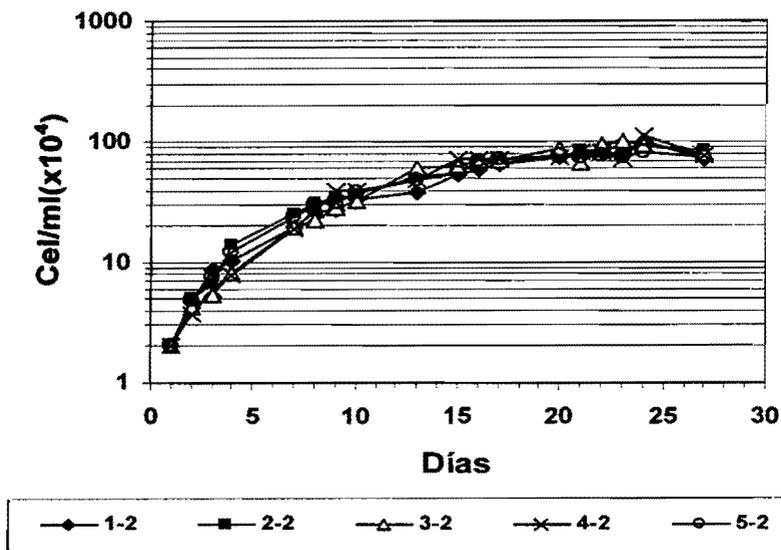


FIGURA 3. Crecimiento de *Dunaliella salina* en 17,5% de NaCl.

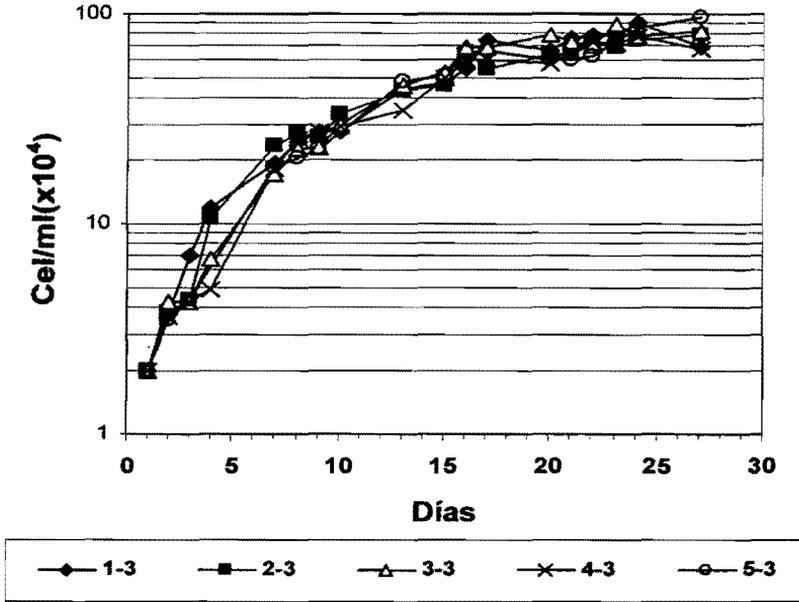


FIGURA 4. Crecimiento de *Dunaliella salina* en 20,0% NaCl.

Lewin (1962), indicando que el glicerol puede penetrar rápidamente en las células de las algas *Talypotrix distonta* y *Oscillatoria lemosa*.

Las mediciones de β -caroteno, en pg β -caroteno/cel, se realizaron a 14, 21 y 28 días durante el periodo de crecimiento exponencial y estacionario. En la Tabla 3, se observa que a los 14 días las concentraciones mayores fueron reportadas para las salinidades menores (12,5%) con adición de glicerol (serie 4 y 5) y acetato de sodio a razón de 1,0 g/L (serie 3), como fuente de carbón orgánico; este efecto fue real pero enfatizado entre todos los tratamientos o series a 17,5%, para no mostrar diferencias en todas las series a los 20 días. Un análisis de varianza de doble entrada mostró que no había diferencias significativas entre la adición de la fuente de carbón orgánico con el control (Medio Johnson), con una F calculada de 2,9 menor a la de 3,8 de la tabla para un 95% de significación, sin embargo la diferencia fue significativa entre los tratamientos con variación de la salinidad, con un F calculado de

13,9 mayor a 4,5 de tabla con un 95% de probabilidad. Borowitzka y Borowitzka (1988b), encontraron en experimentos a 17; 20 y 24% de salinidad que los niveles más altos de β -caroteno se presentaron a salinidades intermedias de 20% y las menores a 24%.

En los experimentos que se describen en este trabajo, al parecer el glicerol interactúa con la concentración de NaCl y provoca efectos similares a los reportados para la salinidad al 20% que describen Borowitzka y Borowitzka (1988b), hecho que habrá que profundizar en experimentos posteriores.

TABLA 3. Concentración celular de carotenos (pg β -caroteno/cel).

SERIE	12,50%	17,50%	20,00%
1	0,895	0,421	0,919
2	0,785	0,464	0,856
3	1,150	0,564	0,854
4	1,137	0,838	1,014
5	0,937	0,680	0,672

Las concentraciones mayores de proteínas estaban entre 6 y 10 $\mu\text{g} / \text{cel} * 10^{-5}$, por lo que la misma puede utilizarse como fuente de alimentación para la acuicultura y se muestra en el cultivo sometido a la concentración de 12,5% (NaCl), donde este fenómeno no guardó ninguna relación con el contenido de carotenos. En la Tabla 4, se señala la concentración proteica celular para los cinco diseños ensayados con tres diferentes medios salinos.

TABLA 4. Concentración celular de proteínas (pg P/cel).

SERIE	12,50%	17,50%	20,00%
1	0,775	0,364	0,397
2	0,785	0,386	0,370
3	0,919	0,385	0,332
4	0,727	0,491	0,335
5	0,900	0,436	0,288

La concentración de carbohidratos fluctuó entre 50 y 20 $\mu\text{g}/\text{cel}$ (Tabla 5), pero los valores mayores siempre estaban en la serie de menor cantidad de sal, que contenían glicerol.

TABLA 5. Concentración celular de carbohidratos en $\text{pg } \beta\text{-caroteno}/\text{cel}$.

SERIE	12,50%	17,50%	20,00%
1	101,55	72,24	101,50
2	99,22	71,62	64,36
3	178,65	64,38	67,31
4	91,99	73,20	78,77
5	114,86	85,88	64,17

De todos los experimentos, de la tercera serie, los de valores más bajos, fueron aquéllos donde se añadió NH_4NO_3 , y a la que se le agregó acetato (ácido acético) como fuente de carbono orgánico, en cuya serie todas las células habían muerto al cabo de dos días, resultando que éste no es bueno para el cultivo de esta especie, tal como reportan Borowitzka y Borowitzka (1988a). En la Figura 5, se observan las curvas correspondientes a donde se empleó el medio Johnson, notándose que ningún crecimiento alcanzó valores superiores a las $50 \cdot 10^4 \text{ cel}/\text{l}$. En esta misma serie experimental, los valores más altos, respecto al crecimiento en número, se observaron en los cultivos con agua residual (Figura 6), y de éstos los que tenían azúcar, miel de purga y NaNO_3 fueron los mayores, alcanzando concentraciones cercanas a $200 \cdot 10^4 \text{ cel}/\text{ml}$; aunque los realizados con agua residual cruda sola y con adición de KNO_3 también mostraron valores altos. Un ANOVA entre los experimentos con agua residual (ARP), excluyendo la serie con NH_4NO_3 , ofreció que no había diferencias significativas entre ellas con un F calculado de 0,50; menor a la F de tabla de 2,61; demostrándose que el agua residual favorece la velocidad del crecimiento de *D. salina*.

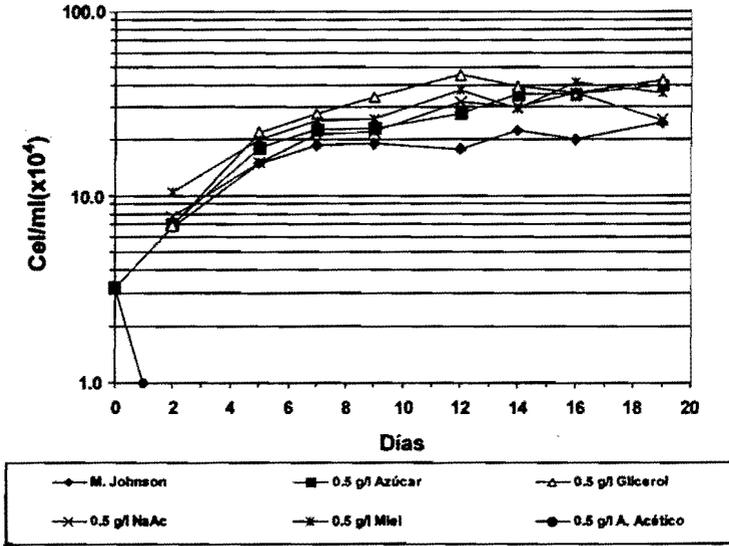


FIGURA 5. Crecimiento de *Dunaliella salina* en medio Johnson (3ra. serie)

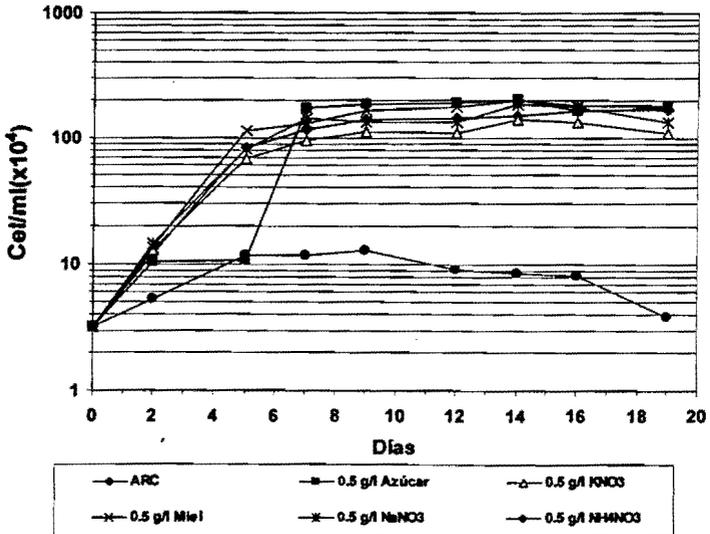


FIGURA 6. Crecimiento de *Dunaliella salina* en agua residual (3ra. serie).

CONCLUSIONES

El nivel de amonio y fosfato de las aguas de desecho de las industrias procesadoras de pescado parecen estar en la gama recomendada para un crecimiento adecuado de *Dunaliella salina*.

El rango de salinidades utilizado para los bioensayos realizados entre 4,5 y 10,5% de NaCl, no fueron limitantes para el cultivo de esta especie.

Estas algas crecieron mejores y más rápido en los medios de cultivo a los cuales se les añadió carbón orgánico, que aquéllas que utilizaron el medio Johnson.

La adición de glicerol facilitó la producción de β -caroteno, el pigmento más valioso de esta especie, lo que representa una ventaja para su cultivo comercial.

La concentración de proteínas de esta alga, que tienen un valor medio de $6-10 \mu\text{g}/\text{cel} \cdot 10^{-5}$ permite su utilización como fuente de alimentación.

Las aguas de desecho de la industria pesquera utilizadas para el cultivo y crecimiento de *D. salina* fueron mejores que las que emplearon el medio sintético.

La concentración de β -caroteno fue mayor en el cultivo con medio sintético que la determinada en los que se realizaron con agua de desecho, pero la biomasa fue mayor en la cultivada en agua residual.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias al Proyecto "Purificación de Residuales Líquidos de la Industria Pesquera por Medio de Microalgas TCP/CUB/2356", patrocinado por la FAO, por lo que agradecemos a dicha institución todo el apoyo prestado. De igual

manera no podemos dejar de señalar toda la ayuda brindada por la dirección de la Asociación Pesquera INDIPES, en cuyas instalaciones desarrollamos la mayor parte de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- BECKER, E. W. Y VENKATARAMAN, L. V. 1982. Biotechnology and exploitation of algae. The Indian Approach. Central Food. Tech. Res. Inst. Mysore. India, 216 pp.
- BEN-AMOTZ, A Y AVRON. 1990. The biotechnology of cultivation the halotolerant alga *Dunaliella*. Trends in Biotechnology. 8(5): 121-125.
- BLIGH, F. G. Y DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- BOROWITZKA, M. A. 1988. Algal growth media and sources of algal cultures. Pp. 456-465, en M. A. Borowitzka, y L. J. Borowitzka (eds.), Microalgal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- BOROWITZKA, M. A. 1998. Appropriate technology in large scale algal culture systems. Congreso latinoamericano de Ficología. Anais do IV Congresso Latino-americano de Ficología, Brasil 5(2): 1-12.
- BOROWITZKA, L. J; M. A. BOROWITZKA Y J. P. MOULTON. 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemical: From laboratory to pilot plant. Hydrobiologia 116/117: 115-134.
- BOROWITZKA, M. A. Y L. J. BOROWITZKA. 1988a. Microalgal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 460 pp.
- BOROWITZKA, M. A. Y L. J. BOROWITZKA. 1988b. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *Dunaliella salina*. Pp. 31-381, en: T. Stadler, J.

- Mollion, M. C. Verdus, Y. Karamanos, H. Morvan y D. Christiaen (eds.), *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Sciences, Barking.
- KOCHERT, A. G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. Pp. 95-97, *en*: J. A. Hellebant y J. S. Craigh (eds.). *Handbook of phycological methods*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- LEWIN, R. A. 1962. *Physiology and biochemistry of algae*. Academic Press, 930 pp.
- LOWRY, O. H., H. J. ROSEBROUGH, A. L. FARN Y R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- OSWALD, W. Y H. B. GOTTAAS. 1957. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Amer. Soc. Civ. Engr.* 122: 73-105.
- ROMERO, T, G. SUÁREZ Y B. AMIÓN. 1984. Cultivo de *Scenedesmus obliquus* y *Dunaliella salina* en residuales de la industria pesquera a escala de laboratorio. Informe MIP/CIP, Cuba, 15 pp.