

Crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* en un cultivador *Raceway* en condiciones de laboratorio

Growth of the *Dunaliella salina* microalga in a *Raceway* cultivator in laboratory conditions

Cindy Mayorga¹ & Leopoldo Manso^{2*}

¹Licenciatura en Ingeniería en Alimentos – Facultad de Ciencias y Tecnología – Universidad Tecnológica de Panamá

²Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales – Universidad Tecnológica de Panamá

85

Resumen Se llevó a cabo un estudio en el crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* en un cultivador de tipo *raceway* en condiciones bajo techo y se evaluó su crecimiento celular con métodos de medición como el recuento de células en cámara de Neubauer, densidad óptica por espectrofotometría y peso seco. En los días 9, 12 y 15 se presentaron los valores de crecimiento de células más altos con promedios de 7.15×10^6 cel/mL y de masa seca de 1.11 g/mL, haciendo a su vez cosechas periódicas típicas de los cultivos semicontinuos. La dinámica de crecimiento para cada uno de los métodos de medición celular se dio como la dinámica de crecimiento en los microorganismos. El uso de diversos métodos de medición celular de forma simultánea permitió obtener resultados más confiables. Se demostró que para cada método de recuento celular hubo un comportamiento y velocidad de crecimiento parecidos entre cosechas. Llevar a cabo un cultivo semicontinuo bajo techo de *Dunaliella salina* permitió obtener grandes cantidades de biomasa, lo que permitiría obtener productos de gran valor comercial.

Palabras claves Cultivo masivo, crecimiento celular, *Dunaliella salina*, microalga.

Abstract A study was conducted on the growth of the microalgae *Dunaliella salina* in a "raceway" system in indoor conditions and cell growth was studied using measurement methods such as cell count in Neubauer chamber, optical density by spectrophotometric and dry weight. In the days 9, 12 and 15 higher values of cell growth with averages of 7.15×10^6 cells/mL and dry weight of 1.11 g/mL were presented, making typical periodic extractions of semi-continuous cultures. Growth dynamics for each cell measuring method was like the growth dynamic of the microorganisms. The use of various methods of cell measurement simultaneously allowed more reliable results. It was shown that for each cell counting method there was a similar growth behavior and growth rate between harvests. Carrying out a semi-continuous culture of *Dunaliella salina* made it possible to obtain large amounts of biomass, which would allow to obtain products of great commercial value.

Keywords Mass culture, growth cell, *Dunaliella salina*, microalgae.

* Corresponding author: leopoldo.manso@utp.ac.pa

1. Introducción

Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos que crecen en ambientes de agua salada o dulce [1].

La productividad de las microalgas está determinada por el pH, la salinidad, los nutrientes, la luz y la temperatura [2].

La dinámica de crecimiento en los cultivos de microalgas es como la que se presenta en los microorganismos como se esquematiza en la figura. 1:

- 1) Fase *lag* o de adaptación
- 2) fase exponencial
- 3) fase de declinación del crecimiento
- 4) fase estacionaria y
- 5) fase de muerte [3]

Las microalgas pueden ser producidas por una variedad de métodos como el cultivo *batch*, semicontinuo y continuo. El tipo *batch* consiste en una única inoculación de células dentro de un contenedor con medio de cultivo por un período de crecimiento y finalmente cosechado.

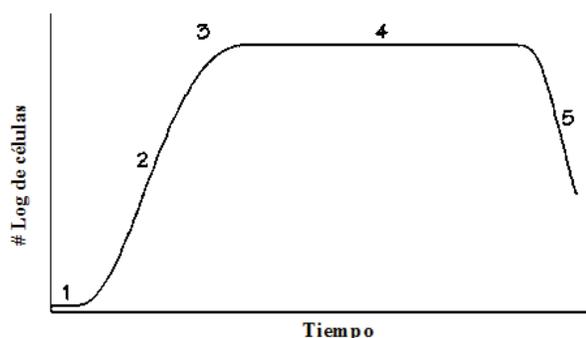


Figura 1. Dinámica de crecimiento en microalgas.

El semicontinuo prolonga el uso de cultivos en tanques por cosechas periódicas parciales, seguido inmediatamente de llenado al volumen original y suplementando con los nutrientes para alcanzar el nivel original de enriquecimiento.

El cultivo continuo consiste en suministrar medio enriquecido constantemente en una cámara de crecimiento y el exceso de cultivo se extrae de forma simultánea de manera que el factor de dilución iguale la velocidad de crecimiento, permitiendo el mantenimiento de cultivos muy cerca de la máxima velocidad de crecimiento [4].

El creciente interés en los últimos años por la producción de microalgas es debido a los productos que se pueden obtener a partir de ellas como proteínas, lípidos, carbohidratos, carotenoides o vitaminas para la salud, alimentos y cosméticos [5] y son fuentes comerciales de químicos de alto valor como β -caroteno, astaxantina y extractos de algas. Estos compuestos y sus productos derivados han sido utilizados para aplicaciones específicas como: aditivos alimentarios y suplementos nutricionales, farmacéuticos, acuicultura y piensos [6].

El objetivo de este trabajo es estudiar el crecimiento masivo de la microalga *Dunaliella salina* en un modelo de cultivador en condiciones de laboratorio.

Para esto, se ha estudiado las condiciones de crecimiento de la microalga (figura 2) en un cultivador de tipo *raceway* y aplicando diversas metodologías para cuantificar el crecimiento de células por día.



Figura 2. *Dunaliella salina* bajo el microscopio.

2. Materiales y métodos

2.1 Cepa

Se utilizó una cepa de *Dunaliella salina* aislada en las salinas de Aguadulce, Provincia de Coclé, República de Panamá.

La microalga es mantenida los laboratorios del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA) de la Universidad Tecnológica de Panamá.

2.2 Propagación

Se llevó a cabo en un frasco de vidrio de 1000 mL (figura 3) añadiendo 500 mL del medio de cultivo Borowitzka [7] ajustado a un 13% de sal para su crecimiento.

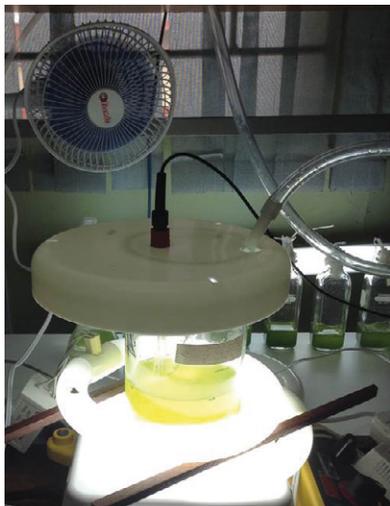


Figura 3. Cultivo de *Dunaliella salina* en frasco.

Luego, se colocó el frasco en un agitador magnético con tres lámparas fluorescentes blancas de 18 cm de diámetro a su alrededor con una densidad de flujo fotones PAR de $193.02 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un tubo para proporcionar la inyección de CO_2 , un medidor de pH y un pequeño abanico para la regulación de la temperatura de 26-35 °C.

2.3 Control del cultivo

Se realizó un control del pH con un sistema *on-off* con registro automático cada 10 s utilizando un potenciómetro con salida digital conectado a un controlador Arduino Uno. Como actuador se utilizó una bomba peristáltica adaptada a un caudal de 15 mL/min de KOH 1M para el ajuste del pH en un rango de 8.00-9.00.

2.4 Cultivo en cultivador *raceway*

Se inoculó a partir del cultivo del frasco en un cultivador tipo *raceway* de 140 x 15 x 15 cm (figura 4) que contaba con una paleta giratoria a motor y un prototipo para la inyección de CO_2 de calidad médica.

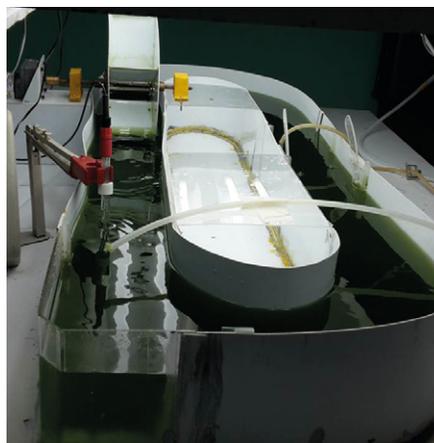


Figura 4. Cultivo de *Dunaliella salina* en cultivador *raceway*.

Para la iluminación se colocaron sobre el cultivador 4 lámparas de luz fluorescente largas blancas aportando una densidad de flujo fotones PAR de $47.08 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 10 focos de luces tipo LED azules (5) y rojas (5) aportando una densidad de flujo fotones PAR de $37.41 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El cultivador contiene un volumen de 45 litros con el medio de Borowitzka para una altura de 15 cm a una salinidad deseada del 12-13%. Se llevó a cabo un cultivo semicontinuo.

2.5 Medición del crecimiento celular

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células, por cambios de densidad óptica o peso seco.

2.5.1 Recuento celular

Se llevó a cabo utilizando una cámara de recuento de Neubauer y con la ayuda de una pipeta se tomó una alícuota para colocar la muestra al borde del cubreobjetos en el extremo de la cámara dejando que el líquido penetrara por capilaridad.

Posteriormente, se colocó la cámara en un microscopio óptico con el ocular de 10X y sobre la cuadrícula para el conteo de células pequeñas.

Para el conteo, se utilizó la cámara incorporada al microscopio tomando fotos en

las 4 esquinas y en el centro de la cuadrícula (figura 5). Se seleccionó un (1) cuadrante de cada foto de manera aleatoria y se contaron las células dentro de cada cuadrante [8].

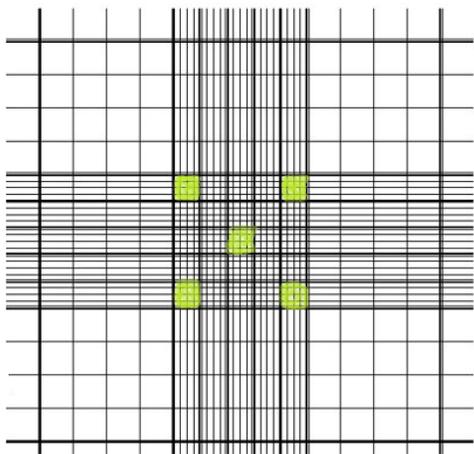


Figura 5. Cultivo de *Dunaliella salina* en frasco.

2.5.2 Densidad óptica

Se utilizaron dos celdas de cuarzo en una colocando el volumen de agua destilada como blanco y en la otra, el volumen necesario de muestra del cultivo. Luego, se ubicaron las celdas en los espacios de un espectrofotómetro UV-VIS y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 650 nm [8].

2.5.3 Método gravimétrico

En un tubo de centrifuga limpio y previamente pesado, se añade una alícuota de 5 mL del cultivo. Seguido, se coloca el tubo en una centrifuga por 15 minutos a 2500 RPM.

Se decantó el medio suspendido y se resuspendió con una solución salina al 3%. Se hizo por triplicado.

Una vez lista la muestra, se colocó el tubo en un horno de convección durante 24 horas a 105 °C y por diferencia se obtiene el peso seco.

3. Resultados y discusión

Las condiciones de cultivo se mantuvieron iguales a lo largo del estudio para establecer los sistemas de controles y los métodos de medición. Los niveles de pH en un rango de 8.00-9.00 y salinidad por arriba del 13% se

establecieron por ser las condiciones selectivas para el crecimiento de *Dunaliella salina* lo que permite tener un cultivo unialgar.

Las condiciones de iluminación son las posibles para cultivos bajo techo. El uso de luces fluorescentes, luces rojas y azules permiten un espectro de luz más completo y la absorción por los pigmentos fotosintéticos.

En la tabla 1 se detallan las mediciones realizadas por día para el conteo de células en la cámara de Neubauer, densidad óptica y masa seca.

En los días 9, 12 y 15, la concentración celular en promedio fue de 7.15×10^6 cel/mL equivalentes a una densidad óptica de 0.965 y de 1.11 g/L de masa seca y con ello las cosechas periódicas típicas en los cultivos semicontinuos.

La medición de la biomasa por masa seca no se realizó los primeros dos días debido a que la biomasa acumulada en esos dos días no era significativa para realizar la cuantificación.

Para el cálculo del número de células se utilizó la siguiente ecuación:

$$\# \text{ de células (cel/mL)} = \frac{\text{promedio de células contadas}}{0.2 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}} \times \frac{1 \times 10^3 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} \quad (1)$$

Las figuras 6, 7 y 8 muestran los valores del número de células por mililitro, la densidad óptica medida en absorbancia y la masa seca con respecto al tiempo respectivamente, utilizando los datos de la tabla 1.

En el punto A de las gráficas 6 y 7 donde comienza la desaceleración del crecimiento, se añadieron nutrientes equivalentes a un volumen de 20 L y se observó un cambio en el crecimiento del cultivo; lo que implica que la desaceleración del cultivo no se debía a que la luz era una limitante, sino a los nutrientes. Por ese motivo, la adición de nutrientes tuvo un efecto de incremento en el crecimiento del cultivo y una mayor biomasa.

La velocidad de crecimiento específico es otra forma de representar la cinética considerando el incremento en el número de células en un intervalo de tiempo.

Tabla 1. Medición celular por día

Día	N.º cel (cel/mL)	Densidad óptica (abs)	Masa seca (g/ mL)
1	5.50 x 10 ⁵	0.103	--
2	6.50 x 10 ⁵	0.172	--
3	1.63 x 10 ⁶	0.303	0.53
4	3.00 x 10 ⁶	0.507	0.59
5	3.60 x 10 ⁶	0.572	0.65
6	4.25 x 10 ⁶	0.663	0.77
7	5.60 x 10 ⁶	0.796	0.85
8	7.05 x 10 ⁶	0.970	0.99
9	7.10 x 10 ⁶	0.980	1.07
9	3.60 x 10 ⁶	0.577	0.75
10	4.80 x 10 ⁶	0.717	0.90
11	6.10 x 10 ⁶	0.892	1.10
12	6.90 x 10 ⁶	0.940	1.19
12	3.20 x 10 ⁶	0.555	0.83
13	4.75 x 10 ⁶	0.668	0.85
14	6.10 x 10 ⁶	0.824	0.97
15	7.45 x 10 ⁶	0.976	1.08
15	3.60 x 10 ⁶	0.540	0.77

En el día 9, se observa el máximo crecimiento de células en el cultivo por el punto de inflexión que se observa del día 8 al día 9 en las figuras 6 y 7, dando inicio a la fase de declinación de crecimiento del cultivo.

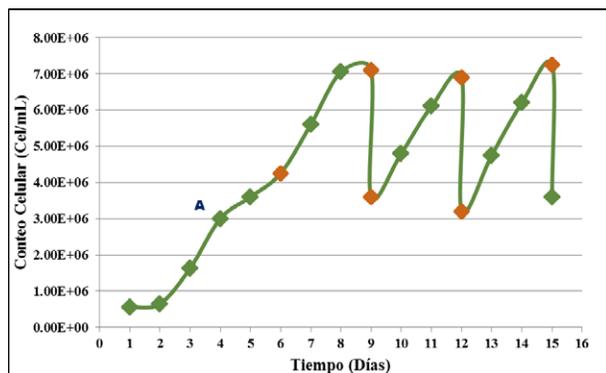


Figura 6. Densidad de células de *Dunaliella salina* determinadas por día en cultivo semicontinuo en prototipo de cultivador.

Al realizar cada una de las cosechas se observa como el crecimiento se da de manera más rápida debido a que el cultivo se encontraba en la velocidad de crecimiento más avanzada, volviendo a alcanzar el máximo crecimiento cada 3 días en los días 12 y 15.

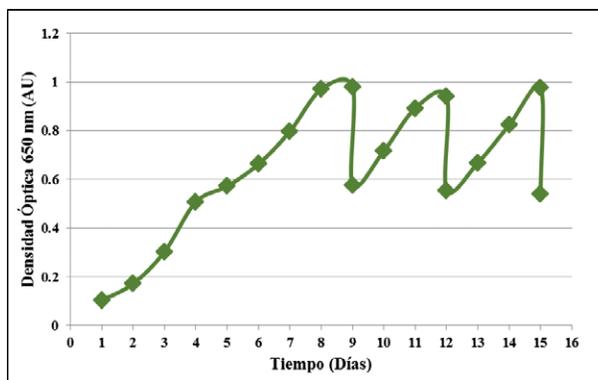


Figura 7. Concentración celular de *Dunaliella salina* determinando la absorbancia por día en un cultivo semicontinuo en prototipo de cultivador.

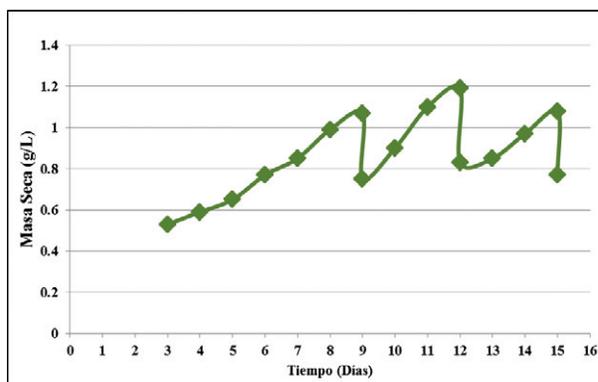


Figura 8. Perspectiva de crecimiento de *Dunaliella salina* por día en prototipo de cultivador basado en datos de masa seca.

Los puntos utilizados para calcular la velocidad de crecimiento específico son los marcados en anaranjado en la figura 6. El cálculo de la velocidad de crecimiento específico está dado por la siguiente ecuación:

$$\mu(d^{-1}) = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \tag{2}$$

Donde: μ : velocidad de crecimiento específico, x : número de células y t : tiempo.

Vorst [9] reporta una velocidad de crecimiento de 0.8 d⁻¹ de *Dunaliella salina* con un aporte de luz de 100 μ mol fotones m⁻² s⁻¹ de luz blanca [9].

La velocidad de crecimiento específico máximo alcanzado por el cultivador en cada una de las cosechas de biomasa es baja comparado

con lo reportado por Vorst. Esto puede deberse principalmente por la potencia de las luces aportadas al cultivo que fue de 47.08 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca. Por lo que el aporte de luces es un parámetro muy importante para la producción de las células de *Dunaliella salina*.

Como cada metodología tiene sus inconvenientes, es necesario llevar a cabo más de un método de medición de crecimiento celular en microalgas para obtener resultados más confiables, razón por la que se llevaron a cabo varios métodos de manera simultánea.

El comportamiento de las curvas de crecimiento entre las cosechas de biomasa y su recuperación nuevamente hasta el valor más alto de células registrado en la primera cosecha, fue similar para las tres metodologías. De igual manera, la dinámica de crecimiento del cultivo fue parecida a la que se presenta en otros microorganismos.

Observando las mediciones de conteo celular y densidad óptica se puede determinar una relación muy alta entre ambas medidas ($R^2 = 0.9863$) como se muestra en la figura 9.

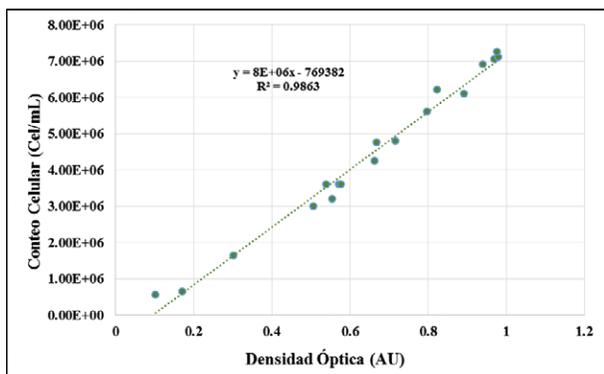


Figura 9. Relación conteo celular vs densidad óptica en un prototipo de cultivador.

A través de la densidad óptica se puede estimar un valor para el número de células, lo que para procesos industriales significaría resultados más rápidos con respecto a las mediciones por conteo celular y masa seca.

Finalmente, el crecimiento de las células de *D. salina* se puede notar primariamente con la variación del color verde (figura 10); el verde

más claro es una concentración más baja de las células de la microalga y el verde más intenso una concentración muy alta de células.



Figura 10. Evolución del crecimiento de *Dunaliella salina*. Día 1: cultivo en etapa inicial. Día 2-10 aumento en el crecimiento de la biomasa. Día 11: biomasa antes y después de extracción.

4. Conclusiones

El cultivo semicontinuo es una alternativa apropiada para el crecimiento de *Dunaliella salina* por su estado de equilibrio en forma uniforme y constante, permitiendo obtener biomasa en grandes cantidades.

Se demostró que para cada método hubo un comportamiento de crecimiento y velocidad de crecimiento parecidos entre cosechas, cumpliendo con la dinámica de crecimiento de las microalgas.

Para fines industriales, se puede estimar el crecimiento celular de *Dunaliella salina* con la densidad óptica por su alta relación con respecto al conteo celular, debido a sus rápidos resultados.

Estudiar el crecimiento en un cultivo de *Dunaliella salina* permitiría obtener productos de gran valor comercial a partir de su biomasa. Esta investigación permite abrir paso para el cultivo y aplicación de otras microalgas en Panamá, lo que posibilita estudios posteriores en diferentes áreas de investigación relacionadas con este tema muy poco estudiado en nuestro país.

Agradecimiento

Agradecemos al Ing. Jorge Serrano por toda su colaboración en los sistemas de control que requirió el proyecto. Y al Centro de Producción e

Investigaciones Agroindustriales por permitirnos el uso de sus laboratorios para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] A. Carlsson, J. Beilen, R. Moller, D. Clayton. "Micro and Macro-algae: utility for industrial applications", University of York, ISBN 13: 978-1-872691-29-9, 2007.
- [2] AST Ingeniería S.L., "Aplicaciones de las Microalgas: Estado de la Técnica", Fondo Social Europeo, 2013.
- [3] E.W. Becker. Microalgae: Biotechnology and microbiology, 2nd Edition, Cambridge University Press, USA, 1995.
- [4] Lavens P. and Sorgeloos P. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361. Ghent City, Belgium. Online Available: <http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e06.htm>
- [5] I. Priyadarshani I. and R. Biswajit, Commercial and industrial applications of micro algae. Journal Algal Biomass vol. 4, pp. 89-100, 2012.
- [6] R. Shields, K. Flynn, B. Lovitt, C. Greenwell, I. Ratcliffe, P. Facey, R. Jarvis. 2010. "A Technology Review and Roadmap for Microalgal Biotechnology in Wales". Centre for Sustainable Aquaculture Research. Swansea University, United Kingdom, 2010.
- [7] Borowitzka M. 1990. The mass culture of Dunaliella salina. FAO, Regional seafarming development and demonstration project. Cebu City, Phillipines. Online Available: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB728E/AB728E00.htm#TOC>
- [8] Arredondo-Vega B y Voltolina, D. 2006. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Editor Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S., México. Capítulo 2:21-30.
- [9] Vorst, Pieter. 1995. Production carotene with chemostat cultures of Dunaliella. Tesis de Doctorado. Swammerdam Institute for Life Sciences, The Netherlands: 23-33.