

**CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* CON POLVILLO DE
HORNO DE CEMENTO SUBPRODUCTO DE LA
FABRICACIÓN INDUSTRIAL DEL CEMENTO**

Edgardo Leal Fernandez¹, Claudia Tapia Larios², Carmiña L. Vargas Zapata³
Grupo de Investigación Biología de Nutrientes

¹Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad de La Guajira

^{2,3} Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología, Universidad del Atlántico. Email: ¹acuabios2003@yahoo.es; ³cvargas@uniatlantico.edu.co

Resumen. Las investigaciones aplicadas microalgales orientadas a la producción industrial de metabolitos de interés económico tienen la finalidad de optimizar el crecimiento y reducir los costos de producción. Este estudio tuvo como objetivo investigar el posible uso de un subproducto de la industria del cemento, el polvillo de cemento, como fertilizante para el crecimiento a gran escala de *Dunaliella salina*. El experimento consistió en adicionar diferentes concentraciones de solución de polvillo de horno del proceso de fabricación del cemento (20-50 mg/200ml. de medio de cultivo de agua de mar) como fuente de macronutrientes y agua de mar, enriquecida con nitrato, fosfato y sulfato similares a las concentraciones del Medio Johnson (Borowitzka, 1981). Los experimentos se realizaron por triplicado y se mantuvieron a 28.5 ± 3 °C, iluminación de 6000 lux y foto período natural de 12:12h. Se realizaron dos ensayos para determinar la concentración más apropiada para el crecimiento de *D. salina*. Se alcanzó una máxima densidad celular de 128×10^4 cel/ml a una concentración de 40 mg de polvillo de solución de nutriente del polvillo de horno de cemento (SNPHC) enriquecido con N, P, y S en un volumen total de 200 ml de cultivo. Los resultados demostraron la factibilidad de utilizar este subproducto de la fabricación industrial del cemento como un sustrato apropiado para fertilizar cultivos de *D. salina* a gran escala, cuya complementación con los macronutrientes nitrato, fosfato y sulfato, aunado a mejoramiento de otras condiciones de cultivo, elevarían su potencial uso como medio alternativo.

Palabras Claves: *Dunaliella salina*, polvillo de horno de la industria cementera, cultivo microalgal.

Abstract. The investigations microalgales applied guide to industrial production of economic interest metabolites with the purpose of optimize the growth and reduce production costs. This study had as objective to investigate the possible use of a by-product of cement industry, powder keg, as fertilizer for the growth to great scale of *Dunaliella salina*. The experiment consisted on adding of different concentrations of a solution of powder keg (20-50 mg/200ml. in medium of seawater) as macronutrientes source and seawater, enriched with nitrate, phosphate and similar sulfate in concentrations similar

to medium Johnson (Borowitzka, 1981). The experiments were carried out for triplicate and they stayed to 28.5 °C, illumination of 6000 lux and photo period of 12:12h. Two test were carried out to determine the appropriated concentrations by the *D. salina* growth. The maximal cellular density was reached from 128×10^4 cel/ml with addition of powder keg of 40 mg in solution (SNPHC) enriched with N, P, and S in a total volume of 200 cultivation ml. The results demonstrated feasibility of using this by-product of cement industrial production like an appropriate substratum to fertilize cultivations by *D. salina* to great scale whose complementation with nitrate, phosphate and sulfate, that improvement others cultivation conditions would elevate their potential use like medium alternative.

Keywords: *Dunaliella salina*, powder keg of cement industry, cultivation microalgal

1. Introducción

El cultivo industrial de las microalgas y cianobacterias es un campo que en las últimas décadas están tomando creciente interés en muchos países debido a la particularidad especial que exhiben la bioproducción de su biomasa y metabolitos de aplicación en la industria de alimentos saludables, farmacéuticos y biomedicina.

D. salina, es una microalga sobreproductora de β -caroteno, pigmento carotenoides de interés económico con propiedades antioxidante y agente precursor de la vitamina; cultivada industrialmente para la producción y comercialización del metabolito en mención.

Las condiciones ambientales tropicales del Caribe Colombiano, son propicias para el cultivo a gran escala de cepas locales de *D. salina*; sin embargo, los estudios deben cubrir también aquellos factores que inciden significativamente en los costos de producción industrial, tal es el caso de las sales nutrientes requeridas para la preparación del medio de cultivo líquido. En este sentido, el presente reporte, es uno de los estudios que de manera sistemática ha estado haciendo el Grupo de Investigación Biología de Nutrientes en cepas locales de *D. salina*, con fines de contribuir a la información biotecnológica para el cultivo industrial en nuestro medio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de *D. salina*: El microorganismo ensayado *D. salina*, fue aislado de la Salina de Galerazamba a $10^{\circ}47'38''$ latitud norte y $75^{\circ}14'58''$ longitud oeste, al norte del Departamento de Bolívar, cepa mantenida en cultivo unialgal no axénico en Laboratorio de Acuicultura de la Universidad del Atlántico [5]

2.2. Agua de Mar Natural: El agua del mar fue colectada en las playas de Turipaná, Municipio de Juan de Acosta, Dpto. del Atlántico, trasladada al

Laboratorio de Acuicultura, pasada por filtro de 0.5 μm de poro, y envejecida por tres semanas.

2.3. Medio de Cultivo Sintético: El medio de cultivo sintético, utilizado como una de las unidades de cultivo experimental (tratamiento control) fue el Medio Johnson, (Borowitzka, 1978) (J/1), elaborado con agua destilada mas la adición de sales macro y micronutrientes de grado analítico.

2.4. Solución Nutriente de Polvillo Hornos de Cemento (SNPHC): Esta solución fue preparada mediante la adición de 100 g de SNPHC. Este medio, sirvió de solución madre para preparar las diversas concentraciones de los tratamientos con los cuales se experimentó el crecimiento de la microalga. El sustrato e información sobre composición química del SNPHC (Tabla 1) fueron aportados por la empresa Cementos del Caribe S. A.

TABLA 1. Composición química del polvillo de hornos de cemento

COMPUESTO	%
FeCl_3	2.46
CaCO_3	46.32
MgO	0.75
K_2O	7.01
Na_2O	1.69
Si_2O_3	13.3
AlO_3	3.43
Alcalis	6.31
Piedras ígneas	18.7.

2.4. Estimación de los Parámetros de Crecimiento:

El crecimiento de *D. salina* se monitoreó mediante recuento celular cada dos días hasta alcanzar el inicio de la fase estacionaria y utilizando cámara Neubauer. La velocidad de crecimiento en la fase exponencial (μ) y el tiempo de duplicación (Td) fueron calculados según Borowitzka y Borowitzka, 1988.

2.5 Bioensayos:

2.5.1. Efecto de la Concentración de SNPHC sobre el Crecimiento de *D. salina*.

A partir de la solución madre de SNPHC, se sustrajeron las siguientes alícuotas: 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, y 5.0 ml., cada una, sirvió de base para preparar un tratamiento, efectuado a su vez por triplicado; la respectiva alícuota se adicionaba a un volumen previo de agua de mar natural (previamente filtrada, envejecida y esterilizada en autoclave), y con la misma se aforaba hasta completar un volumen de 200 ml(SNPHC/1) Las alícuotas de SNPHC son equivalentes a 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mg del sustrato polvo hornos de cemento. Se diseñaron siete tratamientos para totalizar 21 unidades experimentales.

2.5.2. Efecto de la Concentración de SNPHC Enriquecidas con Nitrato, Fosfato y Sulfato sobre el Crecimiento de *D. salina*.

La solución madre de SNPHC fue enriquecida con sales de nitrato (KNO_3), fosfato (KH_2PO_4) y sulfato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a concentraciones similares a las encontradas en el Medio Johnson (SNPHC/2). Con esta particularidad, el diseño experimental de este bioensayo fue efectuado igual que el anterior, además de incluir un cultivo control, realizado con el medio sintético J/1. Se conformaron ocho tratamientos para totalizar 24 unidades experimentales.

2.5.3. Condiciones de Cultivo

Los dos bioensayos (SNPHC/1 y SNPHC/2) realizados, se efectuaron bajo el control de las siguientes condiciones de cultivo fijadas: Se empleó el método de cultivo discontinuo para el crecimiento de *D. salina*; los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $28.5 \pm 3^\circ\text{C}$; iluminación bilateral proporcionado por tubos fluorescentes de 40W a una intensidad de 6000 lux; el pH inicial se ajustó a 8.5 con buffer tris-HCl 50mM; inóculo inicial de 5.0×10^4 cel/ml; agitación manual tres veces al día.

2.6. Análisis Estadísticos

La significación estadística de las variaciones observadas en las concentraciones de SNPHC fue determinada mediante Análisis de Varianza de una vía ANOVA sobre tres replicas de cada uno de los bioensayos realizados, y cuando se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba de Scheffe's ($\alpha = 0.05$) de comparaciones múltiples entre medias [6]

3. RESULTADOS

Efecto de la Concentración de SNPHC/1 sobre el Crecimiento de *D. salina*.

En la tabla 2, se muestran los parámetros de crecimiento estimados de *D. salina* en función de la concentración de SNPHC/1. Entre los tratamientos se determinaron diferencias significativas ($p < 0.001$). Se observa que los cultivos fertilizados con concentraciones de 2.5 hasta 5.0 ml de SNPHC, mostraron similares tasas de crecimiento, y entre éstas, la tasa de crecimiento mas alta fue 0.038 div/día; así mismo, estos mostraron densidades celulares entre 26.79 y 30.7×10^7 cel/ml los cuales superaron casi el doble de los cultivos fertilizados con 2.0 y 2.5 ml de SNPHC.

Tabla 2. Valores promedios de los parámetros de crecimiento de *D. salina* en función de la concentración de SNPHC/1.

Concentración de SNPHC en Agua de Mar (Tratamientos)	μ (div/día)	Parámetros de Crecimiento Td (días)	Densidad Cel. Máx No cel. x 10 ⁴ /ml
2.0ml	0.018	7.89	16.76
2.5ml	0.019	7.82	17.53
3.0ml	0.035	4.40	26.79
3.5ml	0.035	4.36	28.80
4.0ml	0.038	4.33	30.70
4.5ml	0.036	4.34	29.00
5.0ml	0.037	4.38	28.70

Estos resultados coinciden con el análisis de rangos múltiples identificándose dos grupos homogéneos a SNPHC 20 y 25 y 30, 35, 40, 45 y 50 mg de SNPHC en 200 ml de cultivo de agua marina.

Efecto de la Concentración de SNPHC/2 sobre el Crecimiento de *D. salina*.

Los valores promedios de estos ensayos se encuentran en la tabla 3. Los análisis estadísticos mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$), entre los tratamientos con SNPHC en agua de mar natural enriquecida con nitrato, fosfato y sulfato, y, el medio J/1, donde: $J/1 = 4.0\text{ml} > 5.0\text{ml} = 4.5\text{ml} > 3.5\text{ml} > 3.0\text{ml} = 2.5\text{ml} > 2.0\text{ml}$. Según el análisis de rango múltiple, el tratamiento a 4.0 ml de SNPHC y el medio J/1 presentaron crecimientos similares, mostrando los valores mas altos de $\mu = 0.133$ y de 0.135 div/día, y, densidad celular de 128.08 y 131.40 cel/ml, respectivamente.

Tabla 3. Valores promedios de los parámetros de crecimiento de *D. salina* en función de la concentración de SNPHC/2.

Adición Solución Madre SNPHC	μ (div/día-)	Parámetros de crecimiento Td (días)	Densidad cel. Máxima No celx10 ⁴ .ml
2.0ml	0.042	4.15	37.06
2.5ml	0.081	3.79	68.39
3.0ml	0.083	3.75	72.74
3.5ml	0.083	3.70	83.46
4.0ml	0.133	3.25	128.08
4.5ml	0.125	3.41	114.25
5.0ml	0.121	3.38	110.29
J/1	0.135	3.21	131.40

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los cultivos sin la adición de nitrato, fosfato y sulfato demostraron que los tratamientos con el incremento de SNPHC de 3.0 a 5.0 ml no correspondieron a un incremento en la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento poblacional de *D. salina*. Sin embargo, la complementación

con los macronutrientes ausentes en el substrato (N, P y S), hizo evidente que la falta de estos macronutrientes en el polvillo de hornos de cemento (Tabla 1), fuera uno de los factores de cultivo que limitaron el crecimiento de *D. salina* a niveles casi inhibitorios (Tabla 2) de acuerdo a condiciones específicas en los cultivos. La diferencia no significativa al nivel de las tasas específicas de crecimiento entre el cultivo control (J/1), y el tratamiento de 4.0 ml de SNPHC/2, sugiere aparentemente que estos macronutrientes fueron aportados en concentraciones que se ajustaron dentro de los rangos de tolerancia y niveles óptimos requeridos para un buen crecimiento de *Dunaliella*, aunque, las tasas de crecimiento y las densidades celulares alcanzados muestran valores muy bajos a los obtenidos por esta misma cepa algal cuando las condiciones de optimización del crecimiento fueron estudiados mediante el método estadístico de optimización, Simplex, obteniéndose tasa específica de crecimiento de 0.26 div/día y de densidad celular de 198.6×10^4 cel/ml a una salinidad 1.73 M de NaCl, intensidad de luz de 6.500 lux, 6.5mM de KN_3 y pH 8.23 [5]. Estas mismas condiciones fijadas en un cultivo realizado dentro de un fotobiorreactor cerrado de la cepa en mención, alcanzó una densidad celular de 362.5×10^4 cel/ml, rendimiento atribuido al factor turbulencia del biorreactor [7].

Estos factores optimizados mediante el método Simplex al relacionarlos con las variaciones de las concentraciones de SNPHC, demuestran la flexibilidad de los efectos sinérgicos entre los parámetros de cultivo aplicados, resultando en la modificación de los rangos de tolerancia [8-10].

Una cepa de *D. salina* procedente de la salina en mención pero de aislamiento y purificación unialgal diferente a la cepa en estudio, cultivada con el medio J/1 con adición de carbón subbituminoso, mostró una densidad celular máxima de $87.16 \pm 5 \times 10^4$ cel/ml [11], valor bajo comparado con el tratamiento de 4.0 ml de SNPHC con nitrato, fosfato y sulfato, y con el cultivo J/1. Esta notable diferencia puede deberse a las diferencias de temperatura utilizadas en estos estudios [12].

La cinética de crecimiento observada en muchas cepas de *Dunaliella* abarca intervalos desde 0.002 hasta 1.17 div/día, correspondiente por lo general los valores bajos a cepas de *D. salina* sometidas a condiciones de estrés, las cuales incluyen sobretodo altas concentraciones de cloruro de sodio (> 2.0), altas intensidades de luz (> 8000 lux) y limitación de nitrógeno [1, 3, 12], caso contrario para la optimización del crecimiento cuyos valores mas bajos de salinidad e intensidad luminosa y concentración normal de nitrógeno fueron fijados en los tratamientos realizados con SNPHC, sin embargo estuvieron exentos de suministro con suficiencia de carbón inorgánico y agitación constante, efectos que favorecería la disponibilidad de la luz y de los nutrientes, además de regular el pH, lo cual podría explicar las bajas concentraciones celulares observadas.

Por tanto, se puede concluir que los macronutrientes contenidos en el polvillo de horno de cemento demostraron la factibilidad de utilizar este subproducto de la fabricación industrial del cemento como un substrato para el cultivo de *D. salina*, cuya complementación con los macronutrientes nitrato, fosfato y sulfato, aunado a mejoramiento de otras condiciones de cultivo, elevarían su potencial uso como medio alternativo.

AGRADECIMIENTOS: A la Empresa Cementos del Caribe S.A, por su contribución.

Referencias

- [1] Borowitzka, M. & L. Borowitzka. 1988. *Dunaliella*, p. 27-58. En M. Borowitzka & L. Borowitzka (eds.). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University, Cambridge, Inglaterra
- [2] Cohen, Z. Products from microalgae. 1996. En : RICHMOND, A (ED). *Handbook of microalgal mass culture*. Boca Raton-Florida. p 426-454
- [3] Leal, E. 1977. Efecto de algunos factores ambientales sobre la capacidad carotenogénica de una cepa de *Dunaliella salina*. Cumana, Venezuela. 1997. 145p. Tesis de magíster. Universidad de Oriente. Instituto Oceánico de Venezuela
- [4] Leal, E. 1996. Biotecnología microalgal. En: *Salud Uninorte* 13(1). p 44-46
- [5] Acuña, T. 2000. Optimización del cultivo en laboratorio de una cepa de *Dunaliella salina* (CHLOROPHITAS: VOLVOCALES) procedente de la salina de Galerazamba Departamento de Bolívar. Barranquilla, 70p. Trabajo de grado (Biólogo) Universidad del Atlántico. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Biología.
- [6] Sokal, R. & F. Rohlf. 1995. *The principles and practice of statistics in biological research*. Third edition. W. H. Freeman, Nueva York. 887 p
- [7] Peroza, C. 2000. Optimización del crecimiento en frascos de laboratorio y prueba de crecimiento y carotenogenesis en fotobiorreactor cerrado de una cepa colombiana de *Dunaliella salina*. Barranquilla, 106p. Trabajo de grado (Químico Farmacéutico), Universidad del Atlántico. Facultad de Química y Farmacia.
- [8] Avendaño, D. 1999. Ecofisiología de las microalgas halotolerantes del género *Dunaliella salina*. Seminario, Universidad de Zulia.
- [9] Ginzburg, M. 1987. *Dunaliella*. A green algae adapted to SALT. In: *Advances in Botanical Research*, 14, 1987. p 93-183.
- [10] Morales, E. 1990. Contribución al conocimiento de las condiciones óptimas de crecimiento de *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae Volvocales) en cultivos de laboratorio. Maracaibo Venezuela, Universidad de Zulia.
- [11] Leal, E; Gómez, G; Montero, L. 2001. Efecto del carbón de Montelibano sobre el crecimiento de *Dunaliella salina*. EN: II curso de microalgas y cianobacterias: aislamiento, cultivo y fisiología. INVEMAR, Santa Marta.

- [12] E. Ma, C.V. Thompson and Clevenger; *J. Appl. Phys.* **69**, 2211 (1991)
- [13] A.S. Edeltein, R.K. Everett, G.Y. Richardson, S.B. Qadri, E.I. Altman, J.C. Foley and J.H. Perepezko, *J. Appl. Phys.* **76**, 7850 (1994)
- [14] Hernandez Jorge E.; *Electrónica & Computadores*; Publicaciones Cedit S.A. **3**, 68 (1997)
- [15] *Modulated DSC Compendium. Basic Theory & Experimental Considerations; Thermal Analysis & Rheology*
- [16] *Inorganic Index to the Powder Diffraction File*, American Society for Testing and Materials, 1969
- [17] Ben-Amotz, A; Lers A; Avron M. 1990. Stereoisomers of betacarotene and phytoene in the algae *Dunaliella bardawil*. *EN: Trends in Biotechnology.* 6 (5), 1990.